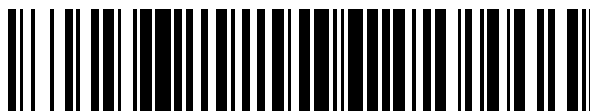


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 422 605**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

G01N 33/74 (2006.01)

A61P 3/04 (2006.01)

A61P 3/06 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 9/12 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.04.2008 E 08826247 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2013 EP 2139508**

54 Título: **Anticuerpo contra klotho-beta para utilizar en el tratamiento de tumores, cáncer o trastornos proliferativos celulares**

30 Prioridad:

02.04.2007 US 909699 P

04.05.2007 US 916187 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.09.2013

73 Titular/es:

GENENTECH, INC. (100.0%)

1 DNA Way

South San Francisco, CA 94080, US

72 Inventor/es:

DESNOYERS, LUC

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 422 605 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo contra klotho-beta para utilizar en el tratamiento de tumores, cáncer o trastornos proliferativos celulares.

5 SOLICITUDES RELACIONADAS

[0001] Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud de Patente de Estados Unidos No. De Serie 60/909,699 presentada el 2 de abril de 2007 y la solicitud de patente de Estados Unidos de No. De Serie 60/916,187 presentada el 4 de mayo del 2007.

10 CAMPO DE LA INVENCION

[0002] La presente invención se refiere en general a los campos de la biología molecular. Más específicamente, la invención se refiere a los usos de agentes anti-KLβ y la detección de KLβ y/o FGF 19 y/o FGFR4.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0003] Klotho beta ("KLβ", "KLB" o "beta klotho") es una proteína transmembrana de 130 kDa de tipo 1 con un dominio intracelular corto (29 aminoácidos) que no tiene una actividad quinasa prevista (Ito et al., Mech. Dev. 98 (2000) 115-119). KLβ tiene dos dominios glicosidasa extracelular que carecen de un residuo de ácido glutámico característico esencial para la actividad enzimática. Los ratones deficientes en Klb (ratones Klb - / -) presentan una expresión de CYP7A1 incrementada y un tamaño disminuido de la vesícula biliar, indicando que los ratones Klb - / - no pueden suprimir más la síntesis de ácido bilizir (Inagaki, T et al (2005) Cell Metab 2:217-25). La KLβ se expresa predominantemente en el hígado y el páncreas. Id. La alteración del gen que codifica KLβ en ratones da lugar a incrementos destacados en los niveles de ARNm de la colesterol 7alfa-hidroxilasa (CYP7A1), la primera enzima limitante de la velocidad en el mecanismo biosintético de los ácidos biliares. Ito et al (2005) J Clin Invest 115(8):2202-2208; Arrese et al (2006) Hepatology 43(1):191-193; Moschetta y Kliever (2005) J Clin Invest 115(8): 2075-2077.

[0004] La familia del factor de crecimiento de fibroblasto (FGF) está compuesta de 22 polipéptidos relacionados estructuralmente que se unen a 4 tirosina quinazas receptoras (FGFR1-4) y un receptor deficiente en quinasa (FGFR5) (Eswarakumar et al (2005) Cytokine Growth Factor Rev 16, 139-149; Omits et al (2001) Genome Biol 2, REVIEWS3005; Sleeman et al (2001) Gene 271, 171-182). La interacción de FGF con FGFR1-4 da lugar a una homodimerización y autofosforilación del receptor, el reclutamiento de adaptadores citosólicos, tales como FRS2 y el inicio de mecanismos de señalización múltiples (Powers et al (2000) Endocr Relat Cancer 7, 165-197; Schlessinger, J. (2004) Science 306, 1506-1507).

[0005] Los FGF y FGFR juegan papeles importantes en el desarrollo y la reparación de tejidos mediante la regulación de la proliferación celular, migración, quimiotaxis, diferenciación, morfogénesis y angiogénesis (Omits et al (2001) Genome Biol 2, REVIEWS3005; Augusteet al (2003) Cell Tissue Res 314, 157-166; Steiling et al (2003) Curr Opin Biotechnol 14, 533-537). Varios FGF y FGFR están asociados con la patogénesis de cánceres de mama, próstata, cuello uterino, estómago y colon (Jeffers et al (2002) Expert Opin Ther Targets 6, 469-482; Mattila et al. (2001) Oncogene 20, 2791-2804; Ruohola et al. (2001) Cancer Res 61, 4229-4237; Marsh et al (1999) Oncogene 18, 1053-1060; Shimokawa et al (2003) Cancer Res 63, 6116-6120; Jang (2001) Cancer Res 61, 3541-3543; Cappellen (1999) Nat Genet 23, 18-20; Gowardhan (2005) Br J Cancer 92, 320-327).

[0006] El FGF19 es un miembro de los más distantes de las siete subfamilias de los FGF. El FGF19 es un ligando de alta afinidad de FGFR4 (Xie et al (1999) Cytokine 11:729-735). El FGF19 se secreta normalmente por el epitelio biliar e intestinal. El FGF19 juega un papel en la homeostasis del colesterol mediante la represión de la expresión hepática de la colesterol-7-α-hidroxilasa 1 (Cyp7α1), la enzima limitante de la velocidad para la síntesis del colesterol y ácidos biliares (Gutierrez et al (2006) Arterioscler Thromb Vasc Biol 26, 301-306; Yu et al (2000) J Biol Chem 275, 15482-15489; Holt, JA, et al. (2003) Genes Dev 17(130):158). La expresión ectópica de FGF19 en un modelo de ratón transgénico incrementa la proliferación de hepatocitos, induce la displasia hepatocelular y da lugar a neoplasia en 10 meses de edad (Nicholes et al. (2002). Am J Pathol 160, 2295-2307). Se cree que el mecanismo del carcinoma hepatocelular inducido por FGF19 implica la interacción con FGFR4. La sobreexpresión de FGF19 en tejidos de tumores se describen la solicitud de patente de Estados Unidos en trámite de titularidad compartida de número de serie 11/673,411 (presentada el 9 de febrero de 2007). Los ratones transgénicos que expresan ectópicamente FGF19 pesan menos que sus miembros de la camada de tipo natural, debido en parte a la disminución en tejido adiposo blanco. Tomlinson, E et al. (2002) Endocrinology 143:1741-1747. Aunque los ratones transgénicos de FGF19 presentan una mayor ingesta de comida, también presentan una tasa metabólica más que elevada que es independiente de los incrementos en los niveles de leptina, IGF-1, hormona del crecimiento u hormona tiroideas. De manera similar, el tratamiento con FGF-19 incrementaba la tasa metabólica e invertía la diabetes dietética y deficiente de leptina. La administración de FGF 19 mejoró la tolerancia a la glucosa y disminuyó la insulina en suero, leptina, colesterol y triglicéridos. Fu et al (2004) 145:2594-2603. La administración de FGF19 recombinante a ratones ob/ob, o el cruzamiento de los ratones transgénicos de FGF19 sobre la base de ob/ob dio lugar a ratones que pesaban menos y presentaban niveles de glucosa en suero menores y mejoraba la sensibilidad

de la glucosa en comparación con ratones ob/ob. Id. El FGF-19 también se describe en, por ejemplo, Harmer et al (2004) Biochemistry 43:629-640.

[0007] La expresión de FGFR4 está ampliamente distribuida y se describió en el desarrollo de músculos esqueléticos, hígado, pulmón, páncreas, glándulas adrenales, riñón y cerebro (Kan et al. (1999) J Biol Chem 274, 15947-15952; Nicholes et al. (2002). Am J Pathol 160, 2295-2307; Ozawa et al. (1996) Brain Res Mol Brain Res 41, 279-288; Stark et al (1991) Development 113, 641-651). La amplificación de FGFR4 se describió en adenocarcinomas mamarios y de ovario (Jaakkola et al (1993) Int J Cancer 54, 378-382). La mutación y el truncamiento de FGFR4 se correlacionaban con el tumor y en algunos casos el pronóstico de adenocarcinomas de próstata y pulmón, carcinoma de célula escamosa de cabeza y cuello, sarcoma de tejido blando, astrocitoma y adenomas pituitarios (Jaakkola et al (1993) Int J Cancer 54, 378-382; Morimoto (2003) Cancer 98, 2245-2250; Qian (2004) J Clin Endocrinol Metab 89, 1904-1911; Spinola et al. (2005) J Clin Oncol 23, 7307-7311; Streit et al (2004) Int J Cancer 111, 213-217; Wang (1994) Mol Cell Biol 14, 181-188; Yamada (2002) Neurol Res 24, 244-248). La sobreexpresión de FGFR4 en tejidos de tumores se describe en WO2007/13693.

[0008] Está claro que existe de forma continua la necesidad de agentes que tienen características clínicas que son óptimas para el desarrollo como agentes terapéuticos. La invención aquí descrita cumple esta necesidad y proporciona otras ventajas.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

[0009] En el presente documento se demuestra que el FGF19 requiere que la KLβ se una a FGFR4, la señalización cascada abajo de FGFR4 y la modulación génica cascada abajo. De este modo, se muestra que la KLβ y su interacción con FGFR puede ser una diana única y ventajosa para un mayor ajuste en el diseño de estrategias profilácticas y/o terapéuticas contra condiciones patológicas asociadas con la señalización anormal o no deseada del mecanismo de FGF/FGFR. De este modo, la memoria proporciona métodos, composiciones, kits y artículos de fabricación para identificar y utilizar sustancias que son capaces de modular los mecanismos de FGF/FGFR a través de la modulación de la unión de KLβ a FGFR y la modulación de la unión de KLβ a FGFs, y para la modulación de actividades biológicas/fisiológicas asociadas con la señalización de FGF/FGFR. La KLβ se presenta como una diana terapéutica importante y ventajosa y la invención también proporciona composiciones y métodos basados en la unión de KLβ. Los agentes de unión a KLβ, tal como se describen aquí, proporcionan importantes agentes terapéuticos y de diagnóstico para utilizar en el reconocimiento de condiciones patológicas asociadas con la expresión y/o actividad de los mecanismos de KLβ-FGF-FGFR.

[0010] En un aspecto, la memoria proporciona métodos, composiciones, kits y artículos de fabricación relacionados con la unión a KLβ y la detección de la unión a KLβ y/o FGF19 y/o FGFR4.

[0011] En un aspecto, la presente memoria proporciona métodos y composiciones útiles para la modulación de estados patológicos asociados con la expresión y/o actividad de KLβ, tal como una mayor expresión y/o actividad o una expresión y/o actividad no deseada, comprendiendo dichos métodos la administración de una dosis eficaz de un antagonista de KLβ (tal como un anticuerpo contra KLβ) a un individuo con necesidad de dicho tratamiento.

[0012] En un aspecto, la invención proporciona un antagonista de KLβ para utilizar en un método de tratamiento de un trastorno asociado con la expresión o actividad de KLβ, comprendiendo el método la administración de una cantidad eficaz del antagonista de KLβ a un individuo, en el que el trastorno es un tumor, un cáncer, o un trastorno proliferativo celular y en el que el antagonista de es un anticuerpo contra KLβ.

[0013] En algunas realizaciones, el tumor, cáncer o trastorno proliferativo celular es carcinoma hepatocelular, cáncer pancreático, cáncer de pulmón de célula no pequeña, cáncer de mama o cáncer colorrectal.

[0014] En un aspecto, la memoria proporciona métodos para eliminar una célula (tal como una célula cancerosa o tumoral), comprendiendo los métodos la administración de una cantidad eficaz de un antagonista de KLβ (tal como un anticuerpo contra KLβ) a un individuo con necesidad de dicho tratamiento. En algunas realizaciones, la célula es una célula de carcinoma hepatocelular o una célula de carcinoma pancreática. En algunas realizaciones, la célula es una célula de hígado o pancreática.

[0015] En un aspecto, la memoria proporciona métodos para reducir, inhibir, bloquear o prevenir el crecimiento de un tumor o cáncer, comprendiendo los métodos la administración de una cantidad eficaz de un antagonista de KLβ (tal como un anticuerpo contra KLβ) a un individuo con necesidad de dicho tratamiento. En algunas realizaciones, el tumor, cáncer o trastorno proliferativo celular es carcinoma hepatocelular, cáncer pancreático, cáncer de pulmón de célula no pequeña, cáncer de mama, o cáncer colorrectal.

[0016] En un aspecto, la presente memoria proporciona métodos para el tratamiento y/o la prevención de un trastorno del hígado, comprendiendo los métodos la administración de una cantidad eficaz de un antagonista de KLβ (tal como un anticuerpo contra KLβ) a un individuo con necesidad de dicho tratamiento. En algunas realizaciones, el

trastorno del hígado es cirrosis.

[0017] En un aspecto, la presente memoria proporciona métodos para el tratamiento de un trastorno degenerativo que comprende la administración de una cantidad eficaz de un antagonista de KL β (tal como un anticuerpo contra KL β) a un individuo con necesidad de dicho tratamiento. En algunas realizaciones, el individuo tiene un tumor, un cáncer y/o un trastorno proliferativo celular.

[0018] En un aspecto, la memoria proporciona métodos para el tratamiento de la hipoglicemia que comprende la administración de una cantidad eficaz de un antagonista de KL β (tal como un anticuerpo contra KL β) a un individuo con necesidad de dicho tratamiento.

[0019] En un aspecto, la memoria proporciona métodos para el tratamiento de la colestasis o la desregulación del metabolismo de ácidos biliares que comprende la administración de una cantidad eficaz de un antagonista de KL β (tal como un anticuerpo contra KL β) a un individuo con necesidad de dicho tratamiento.

[0020] En un aspecto, la memoria proporciona métodos para el tratamiento de la obesidad o una condición relacionada con la obesidad que comprende la administración de una dosis eficaz de un agonista de KL β a un individuo con necesidad de dicho tratamiento. En algunas realizaciones, la condición relacionada con la obesidad es la diabetes melitus, enfermedad cardiovascular, resistencia a insulina, hipertensión, hipercolesterolemia, enfermedad tromboembólica (tal como apoplejía), aterosclerosis, dislipidemia (por ejemplo, niveles elevados de colesterol total o niveles elevados de triglicéridos), osteoartritis, enfermedad de la vesícula biliar, osteoartritis, y apnea del sueño y otros trastornos respiratorios.

[0021] En un aspecto, la memoria proporciona métodos para inducir un incremento en la sensibilidad a la insulina que comprende la administración de una dosis eficaz de un agonista de KL β a un individuo con necesidad de dicho tratamiento.

[0022] En un aspecto, la memoria proporciona métodos para reducir la masa corporal total que comprende la administración de una dosis eficaz de un agonista de KL β a un individuo con necesidad de dicho tratamiento.

[0023] En un aspecto, la memoria proporciona métodos para el tratamiento de la hiperglicemia que comprende la administración de una dosis eficaz de un agonista de KL β a un individuo con necesidad de dicho tratamiento.

[0024] En un aspecto, la memoria proporciona métodos para reducir por lo menos uno de los niveles de triglicéridos y ácidos grasos libres que comprende la administración de una dosis eficaz de un agonista de KL β a un individuo con necesidad de dicho tratamiento.

[0025] Los métodos de la presente invención se pueden utilizar para actuar sobre cualquier estado patológico adecuado. En el presente documento se describen enfermedades de ejemplo.

[0026] En una realización, una célula reconocida en un método es una célula cancerosa. Por ejemplo, una célula cancerosa puede ser una seleccionada del grupo que consiste en una célula de carcinoma hepatocelular o una célula de cáncer pancreático. En una realización, una célula reconocida es una célula hiperproliferativa y/o hiperplásica. En una realización, una célula reconocida es una célula displásica. En otra realización, una célula reconocida es una célula metastásica. En una realización, la célula reconocida es una célula de hígado cirrótico.

[0027] Los métodos de la presente memoria puede comprender adicionalmente etapas de tratamiento adicionales. Por ejemplo, en una realización, un método comprende adicionalmente una etapa en el que una célula y/o tejido objetivo (por ejemplo, una célula cancerosa) se exponen a tratamiento con radiación o un agente quimioterapéutico.

[0028] Los antagonistas y agonistas de KL β son conocidos en la técnica y algunos se describen y ejemplifican aquí. En algunas realizaciones, el antagonista de KL β es una molécula que se une a KL β y neutraliza, bloquea, inhibe, anula, reduce o interfiere con uno o más aspectos del efecto asociado a KL β .

[0029] En algunas realizaciones, el antagonista de KL β es un anticuerpo. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en un anticuerpo quimérico, un anticuerpo madurado por afinidad, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo humano. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab') $_2$, o scFv.

[0030] En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, por ejemplo, un anticuerpo que comprende secuencias de unión a antígeno de un donante no humano injertadas en una secuencia heteróloga no humana, humana o humanizada (por ejemplo, secuencias de armazón y/o dominio constante). En una realización, el donante no humano es un ratón. En una realización, una secuencia de unión a antígeno es sintética, por ejemplo, obtenida mediante mutagénesis (por ejemplo, cribado de expresión en fagos, etc.). En una realización, un anticuerpo quimérico tiene regiones V murinas y región C humana. En una realización, la región V de cadena ligera murina se

fusiona a una cadena ligera kappa humana. En una realización, la región V de cadena pesada murina se fusiona a una región C de IgG1 humana.

[0031] Los anticuerpos humanizados útiles en los métodos de la invención incluyen aquellos que tienen sustituciones de aminoácidos en la FR y variantes de la maduración por afinidad con cambios en las CDR injertadas. Los aminoácidos sustituidos en la CDR o FR no se limitan a los presentes en el anticuerpo donante o receptor. En otras realizaciones, los anticuerpos comprenden además cambios en los residuos de aminoácidos en la región Fc que conducen a una función efectora mejorada que incluye una función CDC y/o ADCC aumentada y la eliminación de células B. Otros anticuerpos incluyen aquellos que tienen cambios específicos que mejoran la estabilidad. En otras realizaciones, los anticuerpos útiles comprenden cambios en los residuos de aminoácidos en la región Fc que conducen a una función efectora disminuida, por ejemplo una función de CDC y/o ADCC disminuida y/o una eliminación de células B disminuida. En algunas realizaciones, los anticuerpos se caracterizan por una unión disminuida (tal como la ausencia de unión) al factor de complemento humano C1q y/o el receptor de Fc humana en células asesinas naturales (NK). En algunas realizaciones, los anticuerpos se caracterizan por una unión disminuida (tal como la ausencia de unión) a FcγRI, FcγRIIA, y/o FcγRIIIA humanas. En algunas realizaciones, el anticuerpo es de la clase IgG (por ejemplo, IgG1 o IgG4) y comprende por lo menos una mutación en E233, L234, L235, G236, D265, D270, N297, E318, K320, K322, A327, A330, P331 y/o P329 (numeración según el índice EU). En algunas realizaciones, los anticuerpos comprenden la mutación L234A/L235A o D265A/N297A.

[0032] En un aspecto, el antagonista de KLβ es un polipéptido anti-KLβ que comprende cualquiera de las secuencias de unión a antígeno proporcionadas aquí, donde los polipéptidos anti-KLβ se unen específicamente a KLβ.

[0033] En un aspecto, el antagonista de KLβ es un inmunoconjugado (denominado indistintamente como "conjugado de fármaco y anticuerpo" o "ADC") que comprende un polipéptido anti-KLβ (tal como un anticuerpo contra KLβ) conjugado a un agente, tal como un fármaco.

[0034] En un aspecto, el antagonista de KLβ es un ARNsi de KLβ. Ejemplos de ARNsi de KLβ se describen en el presente documento.

[0035] En algunas realizaciones, el antagonista de KLβ puede modular uno o más aspectos de los efectos asociados con KLβ, que incluyen, pero sin limitación la unión a FGFR (por ejemplo, FGFR4) (opcionalmente conjuntamente con heparina), la unión a FGF (por ejemplo, FGF19) (opcionalmente conjuntamente con heparina), la unión a FGFR4 y FGF19 (opcionalmente conjuntamente con heparina), la inducción de la inducción de cFos, Junb y/o Junc mediada por FGF-19 (in vitro o in vivo), la inducción de la señalización cascada abajo de FGFR4 y/o FGF19 (que incluyen, sin limitación, la fosforilación de FGFR, fosforilación de FRS2, fosforilación de ERK1/2 y activación del mecanismo de Wnt), y/o inducción de cualquier mecanismo biológico de KLβ y/o FGFR y/o FGF biológicamente relevante, y/o inducción de un tumor, trastorno proliferativo celular o un cáncer; y/o inducción de un trastorno asociado con la expresión y/o actividad de KLβ (tal como una expresión y/o actividad de KLβ incrementadas). En algunas realizaciones, el antagonista se une (tal como se une específicamente a KLβ). En algunas realizaciones, el antagonista se une a una región de unión a FGFR (tal como FGFR4) de KLβ. En algunas realizaciones, el antagonista se une a regiones de unión a FGF (por ejemplo, FGF19) de KLβ. En algunas realizaciones, el antagonista reduce, inhibe, y/o bloquea la actividad de KLβ in vivo y/o in vitro. En algunas realizaciones, el antagonista compite por la unión con FGFR4 (reduce y/o bloquea la unión de FGFR4 a KLβ). En algunas realizaciones, el antagonista compite por la unión con FGF19 (reduce y/o bloquea la unión de FGF19 a KLβ).

[0036] En otro aspecto, la memoria proporciona una composición que comprende uno o más antagonistas de KLβ (tal como un anticuerpo contra KLβ), y un vehículo. Esta composición puede comprender además un segundo medicamento, en el que el antagonista de KLβ es un primer medicamento. Este segundo medicamento, para el tratamiento del cáncer, por ejemplo, puede ser otro antagonista de KLβ (tal como un anticuerpo contra KLβ), agente quimioterapéutico, agente citotóxico, agente anti-angiogénico, agente inmunosupresor, profármaco, citoquinas, antagonista de citoquina, radioterapia citotóxica, corticosteroides, antieméticos, vacunas contra el cáncer, analgésico, agente anti-vascular, o agente inhibidor del crecimiento. En otra realización, se administra un segundo medicamento al sujeto en una cantidad eficaz, en el que el anticuerpo es un primer medicamento. Este segundo medicamento es más de un medicamento, y es preferiblemente otro anticuerpo, agente quimioterapéutico, agente citotóxico, agente anti-angiogénico, agente inmunosupresor, profármaco, citoquinas, antagonista de citoquina, radioterapia citotóxica, corticosteroides, anti-emético, vacuna contra el cáncer, analgésico, agente anti-vascular, o agente inhibidor del crecimiento. Agentes más específicos incluyen, por ejemplo, irinotecan (CAMPTOSAR®), cetuximab (ERBITUX®), fulvestrant (FASLODEX®), vinorelbina (NAVELBINE®), antagonistas del receptor de EFG, tales como erlotinib (TARCEVA®), antagonistas de VEGF, tales como bevacizumab (AVASTIN®), vincristina (ONCOVIN®), inhibidores de mTor (una serina/treonina proteína quinasa), tal como rapamicina y CCI-779, y antagonistas anti-HER1, HER2, ErbB, y/o EGFR, tales como trastuzumab (HERCEPTIN®), pertuzumab (OMNITARG™), o lapatinib, y otros agentes citotóxicos que incluyen agentes quimioterapéuticos. En algunas realizaciones, el segundo medicamento es un fármaco antiestrógeno, tal como tamoxifeno, fulvestrant, o un inhibidor de aromatasa, un antagonista para el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o para ErbB o el receptor de Efb, o Her-1 o Her-2. En algunas realizaciones, el segundo medicamento es tamoxifeno, letrozol, exemestano, anastrozol, irinotecan, cetuximab, fulvestrant, vinorelbina, erlotinib, bevacizumab, vincristina, imatinib, sorafenib,

lapatinib, o trastuzumab, y preferiblemente, el segundo medicamento es erlotinib, bevacizumab, o trastuzumab.

[0037] En un aspecto, un artículo de fabricación que comprende un recipiente; y una composición contenida en el recipiente, en el que la composición comprende uno o más antagonistas de KL β (tal como un anticuerpo contra KL β proporcionado en el presente documento). En una realización, una composición que comprende un antagonista de KL β comprende además un vehículo, que en algunas realizaciones es farmacéuticamente aceptable. En una realización, un artículo de fabricación comprende además instrucciones para la administración de la composición (para, por ejemplo, un anticuerpo contra KL β) a un individuo (tal como instrucciones para cualquiera de los métodos aquí descritos).

[0038] En un aspecto, se proporciona aquí un kit que comprende un primer recipiente que comprende una composición que comprende uno o más antagonistas contra KL β ; y un segundo recipiente que comprende un tampón. Esta composición puede comprender además un segundo medicamento, en el que el antagonista de KL β es un primer medicamento. Los segundos medicamentos de ejemplo se describen anteriormente y en otros puntos de la memoria. En una realización, el tampón es farmacéuticamente aceptable. En una realización, una composición que comprende un anticuerpo comprende además un portador, que, en algunas realizaciones, es farmacéuticamente aceptable. En una realización, un kit comprende además instrucciones para administrar la composición (por ejemplo, el anticuerpo) a un individuo.

[0039] En otro aspecto, se proporcionan métodos para la detección de KL β , comprendiendo los métodos la detección de KL β en una muestra (tal como una muestra biológica). El término "detección" tal como se utiliza aquí incluye la detección cualitativa y/o cuantitativa (niveles de medición) con o sin referencia a un control. En algunas realizaciones, la muestra biológica es de un paciente que tiene o se sospecha que tiene un tumor, cáncer, y/o un trastorno proliferativo celular, tal como carcinoma hepatocelular, cáncer pancreático, cáncer de pulmón de célula no pequeña, cáncer de mama, o cáncer colorrectal. En algunas realizaciones, la muestra biológica es de un tumor. En algunas realizaciones, la muestra biológica expresa FGF (por ejemplo, FGF19) y/o FGFR (por ejemplo, FGFR4).

[0040] En otro aspecto, la presente memoria proporciona métodos para la detección de un trastorno asociado con la expresión y/o actividad de KL β , comprendiendo los métodos la detección de KL β en una muestra biológica de un individuo. En algunas realizaciones, la expresión de KL β es la expresión incrementada o la expresión anormal. En algunas realizaciones, el trastorno es un tumor, cáncer, y/o un trastorno proliferativo celular, tal como carcinoma hepatocelular, cáncer pancreático, cáncer de pulmón de célula no pequeña, cáncer de mama, o cáncer colorrectal. En algunas realizaciones, la muestra biológica es suero o de un tumor.

[0041] En otro aspecto, la memoria proporciona métodos para la detección de un trastorno asociado con la expresión y/o actividad de FGFR4 y KL β , comprendiendo los métodos la detección de FGFR4 y KL β en una muestra biológica de un individuo. En algunas realizaciones, la expresión de KL β es la expresión incrementada o la expresión anormal. En algunas realizaciones, la expresión de FGFR4 es la expresión incrementada o la expresión anormal. En algunas realizaciones, el trastorno es carcinoma hepatocelular, cáncer pancreático, cáncer de pulmón de célula no pequeña, cáncer de mama, o cáncer colorrectal. En algunas realizaciones, la muestra biológica es suero o es de un tumor. En algunas realizaciones, la expresión de FGFR4 se detecta en una primera muestra biológica, y la expresión de KL β se detecta en una segunda muestra biológica.

[0042] En otro aspecto, la memoria proporciona métodos para la detección de un trastorno asociado con la expresión y/o actividad de FGF 19 y KL β , comprendiendo los métodos la detección de FGF 19 y KL β en una muestra biológica de un individuo. En algunas realizaciones, la expresión de KL β es la expresión incrementada o la expresión anormal. En algunas realizaciones, la expresión de FGF19 es la expresión incrementada o la expresión anormal. En algunas realizaciones, el trastorno es un tumor, cáncer, y/o un trastorno proliferativo celular, tal como carcinoma hepatocelular, cáncer pancreático, cáncer de pulmón de célula no pequeña, cáncer de mama, o cáncer colorrectal. En algunas realizaciones, la muestra biológica es suero o es de un tumor. En algunas realizaciones, la expresión de FGF19 se detecta en una primera muestra biológica y la expresión de KL β se detecta en una segunda muestra biológica.

[0043] En otro aspecto, la memoria proporciona métodos para la detección de un trastorno asociado con la expresión y/o actividad de FGFR4, FGF19 y KL β , comprendiendo los métodos la detección de FGFR4, FGF19 y KL β en una muestra biológica de un individuo. En algunas realizaciones, la expresión de KL β es la expresión incrementada o la expresión anormal. En algunas realizaciones, la expresión de FGFR4 es la expresión incrementada o la expresión anormal. En algunas realizaciones, el trastorno es un tumor, cáncer, y/o un trastorno proliferativo celular, tal como carcinoma hepatocelular, cáncer pancreático, cáncer de pulmón de célula no pequeña, cáncer de mama, o cáncer colorrectal. En algunas realizaciones, la muestra biológica es suero o de un tumor. En algunas realizaciones, la expresión de FGFR4 se detecta en una primera muestra biológica, la expresión de FGF19 se detecta en una segunda muestra biológica y la expresión de KL β se detecta en una tercera muestra biológica.

[0044] En otro aspecto, la memoria proporciona métodos para el tratamiento de un individuo que tiene o se sospecha que tiene un cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo celular o un trastorno del hígado (tal como cirrosis) mediante la administración de una cantidad eficaz de un antagonista de KL β (por ejemplo, un anticuerpo

contra KL β), en el que una muestra biológica del cáncer, tumor y/o trastorno celular o trastorno del hígado expresa (i) KL β , (ii) KL β y FGFR4, (iii) KL β y FGF19, o (iv) KL β , FGFR4 y FGF19. En algunas realizaciones, el cáncer, tumor y/o trastorno proliferativo celular o trastorno del hígado es carcinoma hepatocelular, cáncer pancreático, cáncer de pulmón de célula no pequeña, cáncer de mama, o cáncer colorrectal.

[0045] En otro aspecto, la memoria proporciona métodos para el tratamiento de un individuo que tiene o se sospecha que tiene un cáncer, un tumor, y/o un trastorno proliferativo celular o un trastorno del hígado (tal como cirrosis) mediante la administración de una cantidad eficaz de un antagonista de FGF19 (por ejemplo, un anticuerpo contra FGF 19, en el que una muestra biológica del cáncer, tumor y/o trastorno celular o trastorno del hígado expresa (i) KL β , (ii) KL β y FGFR4, (iii) KL β y FGF19, o (iv) KL β , FGFR4 y FGF19. En algunas realizaciones, el cáncer, tumor y/o trastorno proliferativo celular o trastorno del hígado es carcinoma hepatocelular, cáncer pancreático, cáncer de pulmón de célula no pequeña, cáncer de mama, o cáncer colorrectal.

[0046] En otro aspecto, la memoria proporciona métodos para el tratamiento de un individuo que tiene o se sospecha que tiene un cáncer, un tumor, y/o un trastorno proliferativo celular o un trastorno del hígado (tal como cirrosis) mediante la administración de una cantidad eficaz de un antagonista de FGFR4 (por ejemplo, un anticuerpo contra FGFR4), en el que una muestra biológica del cáncer, tumor y/o trastorno celular o trastorno del hígado expresa (i) KL β , (ii) KL β y FGFR4, (iii) KL β y FGF19, o (iv) KL β , FGFR4 y FGF19. En algunas realizaciones, el cáncer, tumor y/o trastorno proliferativo celular o trastorno del hígado es carcinoma hepatocelular, cáncer pancreático, cáncer de pulmón de célula no pequeña, cáncer de mama, o cáncer colorrectal.

[0047] En otro aspecto, la presente memoria proporciona métodos para seleccionar un tratamiento para un individuo, comprendiendo los métodos: (a) determinar (i) la expresión de KL β , (ii) la expresión de KL β y FGF19, (iii) la expresión de KL β y FGFR4, o (iv) la expresión de KL β , FGF19 y FGFR4, si los hay, en una muestra biológica del individuo; y (b) después de la etapa (a), seleccionar el tratamiento para el individuo, en el que la selección del tratamiento se basa en la expresión determinada en la etapa (a). En algunas realizaciones, se determina la expresión incrementada de KL β en la muestra biológica del individuo en relación con un valor de referencia o muestra de control. En algunas realizaciones, se determina en el individuo la expresión disminuida de KL β en la muestra biológica del individuo en relación con un valor de referencia o una muestra de control. En algunas realizaciones, se determina la expresión de KL β y se selecciona el tratamiento con un anticuerpo contra KL β . En algunas realizaciones, se determina la expresión de KL β y se selecciona el tratamiento con un antagonista de FGF19 (tal como un anticuerpo contra FGF19). En algunas realizaciones, se determina la expresión de KL β y se selecciona el tratamiento con un antagonista de FGFR4 (tal como un anticuerpo contra FGFR4). Los antagonistas de FGFR4 son conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, el individuo tiene un tumor, cáncer, y/o un trastorno proliferativo celular, tal como carcinoma hepatocelular, cáncer pancreático, cáncer de pulmón de célula no pequeña, cáncer de mama, o cáncer colorrectal.

[0048] En otro aspecto, la memoria proporciona métodos para el tratamiento de un individuo que tiene o se sospecha que tiene un cáncer, un tumor, y/o un trastorno proliferativo celular o un trastorno del hígado (tal como cirrosis) mediante la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo contra KL β , en el que además se determina (i) la expresión de KL β , (ii) la expresión de KL β y FGF19, (iii) la expresión de KL β y FGFR4, o (iv) la expresión de KL β , FGF19 y FGFR4, en la muestra biológica del individuo, antes, durante o después de la administración de un anticuerpo contra KL β . En algunas realizaciones, la muestra biológica es del cáncer, tumor y/o trastorno proliferativo celular. En algunas realizaciones, la muestra biológica es suero. En algunas realizaciones, se determina la sobreexpresión de KL β antes, durante y/o después de la administración de un anticuerpo contra KL β . En algunas realizaciones, se determina la expresión de FGFR4 antes, durante y/o después de la administración de un anticuerpo contra KL β . La expresión se puede determinar antes; durante; después; antes y durante; antes y después; durante y después; o antes, durante y después de la administración de un anticuerpo contra KL β .

[0049] En otro aspecto, la memoria proporciona métodos para el tratamiento de un individuo que tiene o se sospecha que tiene un cáncer, un tumor, y/o un trastorno proliferativo celular o un trastorno del hígado (tal como cirrosis) mediante la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo contra FGF19, en el que además se determina (i) la expresión de KL β , (ii) la expresión de KL β y FGF19, (iii) la expresión de KL β y FGFR4, o (iv) la expresión de KL β , FGF19 y FGFR4, en la muestra biológica del individuo, antes, durante o después de la administración de un anticuerpo contra FGF19. En algunas realizaciones, la muestra biológica es del cáncer, tumor y/o trastorno proliferativo celular. En algunas realizaciones, la muestra biológica es suero. En algunas realizaciones, se determina la sobreexpresión de KL β antes, durante y/o después de la administración de un anticuerpo contra FGF19. En algunas realizaciones, se determina la expresión de FGFR4 antes, durante y/o después de la administración de un anticuerpo contra FGF19. La expresión se puede determinar antes; durante; después; antes y durante; antes y después; durante y después; o antes, durante y después de la administración de un anticuerpo contra FGF19. Los anticuerpos contra FGF19 y los métodos de tratamiento que comprenden la utilización de un anticuerpo contra FGF19 se describen en la solicitud de patente de Estados Unidos en trámite de titular compartida de número de serie 11/673,411 (presentada el 9 de febrero del 2007), el contenido de la cual se incorpora en la presente por referencia.

[0050] En las realizaciones que implican la detección, la expresión de la señalización molecular cascada abajo de

FGFR4 se puede detectar adicionalmente o como alternativa a la detección de la expresión de FGFR4. En algunas realizaciones, la detección de la señalización molecular cascada abajo de FGFR4 comprende una o más de la detección de fosforilación de MAPK, FRS2 o ERK1/2 (o ERK1 y/o ERK2).

[0051] En algunas realizaciones que implican la detección, la expresión de FGFR4 comprende la detección de la delección génica, amplificación génica y/o mutación génica de FGFR4. En algunas realizaciones que implican la detección, la expresión de KLβ comprende la detección de la delección génica, amplificación génica y/o mutación génica de KLβ. En algunas realizaciones que implican la detección, la expresión de FGF19 comprende la detección de la delección génica, amplificación génica y/o mutación génica de FGF19.

[0052] Algunas realizaciones que implica la detección comprenden además la detección de la activación del mecanismo de Wnt. En algunas realizaciones, la detección de la activación del mecanismo de Wnt comprende una o más de la fosforilación de tirosina de β-catenina, la expresión de genes diana de Wnt, mutación de β-catenina, y la unión de E-cadherina a β-catenina. La detección de la activación del mecanismo de Wnt es conocida en la técnica y aquí se describen y ejemplifican algunos ejemplos.

[0053] Aquí se describen muestras biológicas, por ejemplo, en la definición de Muestra biológica. En algunas realizaciones, la muestra biológica es suero o es de un tumor.

[0054] En las realizaciones que implican la detección de la expresión de KLβ y/o FGFR4 y/o FGF19, se puede detectar la expresión del polinucleótido de KLβ y/o FGFR4 y/o FGF19 y/o la expresión del polipéptido KLβ y/o FGFR4 y/o FGF19. En algunas realizaciones que implican la detección de la expresión de KLβ y/o FGFR4 y/o FGF19, se detecta la expresión del ARNm de KLβ y/o FGFR4 y/o FGF19. En otras realizaciones, se detecta la expresión del polipéptido KLβ y/o FGFR4 y/o FGF19 utilizando un agente contra KLβ y/o un agente contra FGFR4. En algunas realizaciones, se detecta la expresión del polipéptido KLβ y/o FGFR4 y/o FGF19 utilizando un anticuerpo. Se puede utilizar cualquier anticuerpo adecuado para la detección y/o diagnóstico, incluyendo anticuerpos monoclonales y/o policlonales, un anticuerpo humano, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo madurado por afinidad, un anticuerpo humanizado y/o un fragmento de anticuerpo. En algunas realizaciones, se utiliza para la detección un anticuerpo contra KLβ aquí descrito. En algunas realizaciones, se detecta la expresión del polipéptido KLβ y/o FGFR4 y/o FGF19 utilizando inmunohistoquímica (IHC). En algunas realizaciones, la expresión del polipéptido se valora en 2 o superior utilizando IHC.

[0055] En algunas realizaciones que implican la detección de la expresión de KLβ y/o FGFR4 y/o FGF19, se puede detectar la presencia y/o ausencia y/o el nivel de expresión de KLβ y/o FGFR4 y/o FGF19. La expresión de KLβ y/o FGFR4 y/o FGF19 se puede incrementar. Se entiende que la ausencia de la expresión de KLβ y/o FGFR4 y/o FGF19 incluye niveles insignificantes o mínimos. En algunas realizaciones, la expresión de la diana en la muestra biológica de análisis es superior a la observada para una muestra de control biológica (o nivel de expresión de referencia o control). En algunas realizaciones, La expresión de la diana es por lo menos aproximadamente 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 75 veces, 100 veces, 150 veces superior, o superior en la muestra biológica de análisis que en la muestra biológica de control. En algunas realizaciones, la expresión de polipéptido diana se determina en un ensayo de inmunohistoquímica ("IHC") con un valor de por lo menos 2 o superior para la intensidad de tinción. En algunas realizaciones, la expresión de polipéptido diana se determina en un ensayo IHC con un valor de por lo menos 1 o superior, o por lo menos 3 o superior para la intensidad de tinción. En algunas realizaciones, la expresión de la diana en la muestra biológica es inferior a la observada para una muestra biológica de control (o nivel de expresión del control).

[0056] En un aspecto, la presente invención proporciona métodos de identificación de una sustancia inhibidora candidata que inhibe la unión de KLβ a FGFR (por ejemplo, FGFR4), comprendiendo dicho método: (a) poner en contacto una sustancia candidata con una primera muestra que comprende FGFR, FGF (por ejemplo, FGF19) y KLβ, y (b) comparar la cantidad de actividad biológica de FGFR en la muestra con la cantidad de actividad biológica de FGFR en una muestra de referencia que comprende cantidades similares de KLβ, FGF y FGFR como la primera muestra, pero que no ha estado en contacto con dicha sustancia candidata, mediante lo cual una disminución en la cantidad de la actividad de biológica de FGFR en la primera muestra en comparación con la muestra de referencia indica que la sustancia candidata es capaz de inhibir la unión de KLβ a FGFR.

[0057] En otro aspecto, la memoria proporciona métodos de identificación de una sustancia inhibidora candidata que inhibe la unión de KLβ a FGFR (por ejemplo, FGFR4), comprendiendo dicho método: (a) poner en contacto una sustancia candidata con una primera muestra que comprende FGFR, FGF y KLβ, y (b) comparar la cantidad de complejo FGFR- KLβ en la muestra con la cantidad de complejo FGFR- KLβ en una muestra de referencia que comprende cantidades similares de KLβ, FGF y FGFR como la primera muestra, pero que no ha estado en contacto con dicha sustancia candidata, mediante lo cual una disminución en la cantidad de complejo FGFR- KLβ en la primera muestra en comparación con la muestra de referencia indica que la sustancia candidata es capaz de inhibir la unión de KLβ a FGFR.

[0058] En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos de determinación de si una sustancia candidata inhibe la unión de KLβ a FGFR (por ejemplo, FGFR4), comprendiendo dicho método: (a) poner en contacto una

sustancia candidata con una primera muestra que comprende FGFR, FGF y KL β , y (b) comparar la cantidad de actividad biológica de FGFR en la muestra con la cantidad de actividad biológica de FGFR en una muestra de referencia que comprende cantidades similares de KL β , FGF y FGFR como la primera muestra, pero que no ha estado en contacto con dicha sustancia candidata, mediante lo cual una disminución en la cantidad de actividad biológica de FGFR en la primera muestra en comparación con la muestra de referencia indica que la sustancia candidata es capaz de inhibir la unión de KL β a FGFR.

[0059] En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos de determinación de si una sustancia candidata inhibe la unión de FGF a KL β , comprendiendo dicho método: (a) poner en contacto una sustancia candidata con una primera muestra que comprende FGF, FGFR y KL β , y (b) comparar la cantidad de actividad biológica de FGFR en la muestra con la cantidad de actividad biológica de FGFR en una muestra de referencia que comprende cantidades similares de FGF, FGFR y KL β como la primera muestra, pero que no ha estado en contacto con dicha sustancia candidata, mediante lo cual una disminución en la cantidad de actividad biológica de FGFR en la primera muestra en comparación con la muestra de referencia indica que la sustancia candidata es capaz de inhibir KL β .

[0060] En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos de determinación de si una sustancia candidata induce la actividad biológica de KL β , comprendiendo dicho método: (a) poner en contacto una sustancia candidata con una primera muestra que comprende FGFR y KL β , y (b) comparar la cantidad de actividad biológica de FGFR en la muestra con la cantidad de actividad biológica de FGFR en una muestra de referencia que comprende cantidades similares de KL β y FGFR como la primera muestra, pero que no ha estado en contacto con dicha sustancia candidata, mediante lo cual un incremento en la cantidad de actividad biológica de FGFR en la primera muestra en comparación con la muestra de referencia indica que la sustancia candidata es capaz de inducir la unión de KL β a FGFR.

[0061] En el presente documento se describen las actividades biológicas de FGFR. En algunas realizaciones, FGFR, FGF, KL β están en una cantidad eficaz para la actividad biológica de FGFR.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0062]

FIGURA 1: KL β forma un complejo con FGF19, FGFR4, y heparina. (A) Se incubaron FGF19 (0,5 μ g), heparina (0,5 μ g), y diferentes proteínas de fusión FGFR-Fc (0,5 μ g) en medio acondicionado con KL β Δ TM durante 18 horas a 4°C. Las interacciones de las proteínas se determinaron mediante precipitación con proteína A-agarosa y análisis de inmunotransferencia. (B) Se incubó el medio acondicionado con KL β Δ TM o control en presencia o ausencia de FGF19 (0,5 μ g), heparina (0,5 μ g), o la proteína de fusión FGFR4-Fc (0,5 μ g) durante 18 horas a 4°C. Las interacciones de proteínas se determinaron mediante precipitación con proteína A-agarosa y análisis de inmunotransferencia. Se incubaron los lisados (C) y (D) de células HEK293 transfectadas con vectores de expresión vacíos (vector de control), FGFR4, KL β -Flag, o una combinación de vectores de expresión de FGFR4 y KL β -Flag en presencia o ausencia de heparina y FGF19. Las interacciones de proteínas se analizaron mediante inmunoprecipitación de FGFR4 (C) y KL β -Flag (D) e inmunotransferencia. (E) La interacción de FGFR4-KL β en lisados de células HEPG2 se analizó mediante inmunoprecipitación e inmunotransferencia.

FIGURA 2: Se requiere la KL β para la señalización de FGF19. El efecto de KL β en la señalización de FGF19 se analizó utilizando células HEK293 transfectadas con vectores de expresión vacíos (vector de control) (A), KL β (B), FGFR4 (C), o una combinación de los vectores de expresión de FGFR4 y KL β (D). Las células transfectadas se incubaron con vehículo (PBS) o FGF19 (0-500 μ g/mL) durante 10 minutos, se lisaron, y la fosforilación de FRS2 y ERK1/2 se analizó mediante inmunotransferencia.

FIGURA 3: Se requiere la KL β para la modulación cascada abajo de la expresión génica de FGF19. (A) FGF19 reprime la expresión de KL β . Las líneas celulares se incubaron con FGF19 (100 μ g/mL; 0-24 horas) y los niveles de expresión de KL β se analizaron mediante RT-PCR. Todos los valores se compararon con los niveles de expresión de KL β en células HEP3B a tiempo 0. Se analizó el grupo de datos por triplicado para cada condición. Los datos se presentan como la media $\pm$ SEM. (B-D) FGF19 induce la expresión de c-Fos, JunB, y c-Jun. Las líneas celulares se incubaron con FGF19 (100 μ g/mL; 0-24 horas) y se analizó la expresión de c-Fos (B), JunB (C), y c-Jun (D) mediante RT-PCR. Los valores representan la proporción relativa del incremento en la expresión de un gen particular en comparación con su expresión antes de la exposición a FGF19. (E) La transfección de ARNsi de KL β reprime la síntesis de KL β . Se analizaron las células HEP3B transfectadas con cada uno de los cuatro ARNsi de KL β diferentes por la expresión de KL β mediante inmunotransferencia. (F) La inhibición de la expresión de KL β mediante la transfección de ARNsi de KL β inhibe la señalización de FGF19. Se incubaron las células HEP3B transfectadas con cada uno de los cuatro ARNsi de KL β diferentes con vehículo (PBS) o FGF19 (100 μ g/mL) durante 10 minutos y se analizó la fosforilación de FRS2 y ERK 1/2 mediante inmunotransferencia. (G) La inhibición de la expresión de KL β por la transfección de ARNsi de KL β inhibe la inducción de c-Fos mediada por FGF19. Las células HEP3B transfectadas con cada uno de los cuatro ARNsi de KL β diferentes se incubaron con FGF19 (100 μ g/mL) durante 90 minutos y se analizaron los niveles de expresión de KL β y c-Fos mediante RT-PCR. Los valores representan la expresión relativa de cada gen particular en comparación con la de células transfectadas con ARNsi de control. (H)

Las células HEK293 transfectadas con los vectores de expresión vacíos (vector de control), KLβ, FGFR4, o una combinación de los vectores de expresión de FGFR4 y KLβ se incubaron con PBS o FGF19 (100 µg/mL) durante 90 minutos; la expresión de c-Fos se analizó mediante RT-PCR. Los valores representan la proporción relativa del incremento en la expresión de c-Fos en comparación con los niveles de expresión antes de la exposición de las células a FGF19

FIGURA 4: La distribución de KLβ y FGFR4 determina la actividad específica de tejido de FGF19. Distribución de KLβ y FGFR4 en tejidos humanos. Las diagramas de cajas muestran la expresión de KLβ (A) y FGFR4 (B) en tejidos humanos, tal como se determina mediante análisis de ARNm de la base de datos de BioExpress. La línea central indica la mediana; la caja representa el rango intercuartílico entre cuartiles entre el primer y tercer cuartil. Los bigotes se extienden desde el rango intercuartílico a las posiciones de los valores extremos. La expresión de KLβ (C) y FGFR4 (D) en un panel de tejidos de ratones se determinaron mediante RT-PCR. El valor para cada órgano representa la expresión promedio (n = 3 ratones), proporción relativa con el nivel de expresión observado en tejidos del cerebro. (E) La especificidad de tejido de FGF19 in vivo se determinó mediante el análisis de la expresión de c-Fos en varios tejidos de órganos 30 minutos después de los ratones (n = 3) de inyectarlos con PBS o FGF19 (1 mg/kg). Los valores representan la expresión de c-Fos en ratones inyectados con FGF19, en comparación con los niveles de expresión en ratones inyectados con PBS. (F) Expresión de CYP7A1 en hígados de ratón 30 minutos después de la inyección con FGF19 (1 mg/kg) o PBS. Los valores representan la expresión de CYP7A1 en ratones inyectados con FGF 19 en comparación con la expresión hallada en ratones inyectados con PBS. Se analizó e grupo de datos por triplicado para cada condición. Los datos se representan como la media ± SEM.

FIGURA 5: Se requiere la KLβ para la modulación cascada abajo de la expresión génica de FGF19 en células HEPG2. (A) La transfección de ARNsi de KLβ reprime la síntesis de KLβ. Se analizó la expresión de KLβ en células HEPG2 transfectadas con cada uno de los cuatro ARNsi de KLβ diferentes mediante inmunotransferencia. (B) La transfección de ARNsi de KLβ inhibe la señalización de FGF19. Las células HEPG2 transfectadas con cada uno de los cuatro ARNsi de KLβ diferentes se incubaron con PBS o FGF19 (100 µg/mL) durante 10 minutos, se lisaron y analizó los niveles de fosforilación de FRS2 mediante inmunotransferencia. (C) La transfección de ARNsi de KLβ inhibe c-Fos mediada por FGF19. Las células HEP3B transfectadas con cada uno de los cuatro ARNsi de KLβ diferentes se incubaron con FGF19 (100 µg/mL) durante 90 minutos y se analizó la expresión de KLβ y c-Fos mediante RT-PCR. Los valores representan la expresión de cada gen en comparación con su expresión en células transfectadas con ARNsi de control.

FIGURA 6: El tratamiento con anticuerpo contra KLβ inhibe la inducción de c-Fos mediada por FGF19. Se trataron células HEPG2 con un anticuerpo de control o un anticuerpo policlonal contra KLβ que se desarrolló contra KLβ de ratón, pero que reacciona de forma cruzada con KLβ humana (10 µg/ml). La inducción de c-Fos estimulada por FGF19 se midió mediante RT-PCR. El tratamiento con anticuerpo contra KLβ inhibió la inducción de c-Fos mediada por FGF19, mientras que el anticuerpo de control no tenía ningún efecto significativo.

FIGURA 7: La mutación del sitio activo de KLβ inhibe la activación del mecanismo de FGF19. Las células HEK293 no se transfectaron o se transfectaron con el mutante E416A de KLβ (sitio activo) o el mutante E693A de KLβ (sitio no activo). Se evaluó la actividad estimulada por FGF19 mediante la inmunodetección de FRS2 fosforilado y ERK1/2 fosforilado. El tratamiento con FGF19 (100 µg/ml; 10 min) produjo un incremento en la señal de FRS2 fosforilado y ERK1/2 fosforilado en células transfectadas con KLβ de tipo natural (wt), mientras que estas señales eran indetectables en células no transfectadas. La fosforilación de FRS2 y ERK1/2 en células transfectadas con el mutante E693A de KLβ era comparable con la fosforilación de FRS2 y ERK1/2 en las células transfectadas con KLβ de tipo natural. La estimulación de FGF19 en células transfectadas con E416A de KLβ se redujo ampliamente en comparación con la KLβ de tipo natural. Estos hallazgos corroboran el aumento de la señalización de FGF19 por KLβ y sugieren además la necesidad de actividad enzimática de KLβ para la señalización de FGF19.

FIGURA 8: El tratamiento con anticuerpo contra KLβ inhibe la inducción de c-Fos dependiente de FGF19 en hígado de ratón. La inducción de c-Fos dependiente de FGF19 se midió en el hígado de un ratón tratado con un anticuerpo contra KLβ (2,2 mg/kg) durante 0, 3, 9 ó 24 horas. El tratamiento con anticuerpo contra KLβ durante 3, 9 ó 24 horas antes de una inyección de FGF19 (1 mg/kg) redujo la inducción de c-Fos mediada por FGF19 específica de hígado en un 58%, 68% y 91 %, respectivamente.

FIGURAS 9: La expresión de ARNm de KLβ se determinó en tejidos tumorales.

FIGURA 10: La expresión de ARNm de FGFR4 se determinó en tejidos tumorales.

FIGURA 11: Representa una secuencia de ácido nucleico de KLβ de ejemplo (SEQ ID NO:1).

FIGURA 12: Representa una secuencia de aminoácidos de KLβ de ejemplo (SEQ ID NO:2).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0063] En un aspecto, la presente memoria proporciona composiciones y métodos basados en la unión a KLβ. Los agentes de unión a KLβ, tal como se describen aquí, proporcionan importantes agentes terapéuticos y de diagnóstico para utilizar en el reconocimiento de condiciones patológicas asociadas con la expresión y/o actividad de los mecanismos de KLβ-FGF19-FGFR4. Por consiguiente, la presente memoria proporciona métodos, composiciones, kits y artículos de fabricación relacionados con la unión a KLβ. En otro aspecto, la memoria proporciona métodos basados en la detección de KLβ de FGF (tal como FGF19) y/o FGFR (tal como FGFR4).

Técnicas generales

[0064] Las técnicas y procedimientos descritos o referenciados aquí, en general, son entendidos y utilizados habitualmente con metodologías convencionales por los expertos en la materia, tales como, por ejemplo, las metodologías ampliamente utilizadas descritas en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd. edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY* (F. M. Ausubel, et al. eds., (2003)); the series *METHODS IN ENZYMOLOGY* (Academic Press, Inc.): *PCR 2: A PRACTICAL APPROACH* (M. J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) *ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL*, and *ANIMAL CELL CULTURE* (R. I. Freshney, ed. (1987)).

Definiciones

[0065] Un anticuerpo "aislado" es aquel que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su medio natural. Los componentes contaminantes de su medio natural son materiales que interferirían con usos de diagnóstico o terapéutico para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En realizaciones preferidas, se purificará el anticuerpo (1) más del 95% en peso de anticuerpo determinado mediante el método de Lowry, y lo más preferiblemente más del 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de una secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante la utilización de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta una homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* en el interior de células recombinantes, ya que por lo menos un componente del medio natural del anticuerpo no estará presente. Normalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante por lo menos una etapa de purificación.

[0066] Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de por lo menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está asociada normalmente en el medio natural del ácido nucleico que codifica el anticuerpo. Una molécula de ácido nucleico aislada está en una forma o composición diferente de la que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas se diferencian de la molécula de ácido nucleico tal y como existen en células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que normalmente expresan el anticuerpo cuando, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales.

[0067] El término "residuo de dominio variable que se enumera como en Kabat" o "posición de aminoácido que se enumera como en Kabat", y variaciones de los mismos, se refiere al sistema de numeración utilizado para los dominios variables de cadena pesada o los dominios variables de cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991). Utilizando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales correspondientes a un recorte o una inserción en una FR o CDR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de cadena pesada puede incluir una inserción de un único aminoácido (residuo 52a según Kabat) después del residuo 52 de H2 y residuos insertados (por ejemplo, los residuos 82a, 82b y 82c, etc. según Kabat) después del residuo 82 de FR de la cadena pesada. La numeración de residuos Kabat se puede determinar para un anticuerpo determinado mediante la alineación en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia enumerada Kabat "estándar".

[0068] La frase "sustancialmente similar" o "sustancialmente el mismo/la misma", tal como se utiliza aquí, indica un grado suficientemente elevado de similitud entre dos valores numéricos (generalmente uno asociado con un anticuerpo y el otro asociado con un anticuerpo de referencia/comparación), de manera que un experto en la materia consideraría que la diferencia entre los dos valores tiene una significancia biológica y/o estadística escasa o nula en el contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores de Kd). La diferencia entre dichos dos valores es preferiblemente inferior a aproximadamente el 50%, preferiblemente inferior a aproximadamente el 40%, preferiblemente inferior a aproximadamente el 30%, preferiblemente inferior a aproximadamente el 20%, preferiblemente inferior a aproximadamente el 10% en función del valor para el anticuerpo de referencia/comparación.

[0069] "Afinidad de unión" se refiere en general a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un

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

[0070] En una realización, " K_d " o "el valor K_d " según la presente invención se mide mediante un ensayo de unión a antígeno radiomarcado (RIA) realizado con una versión Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno tal como se describe en el siguiente ensayo que mide la afinidad de unión en solución de Fabs por el antígeno mediante el equilibrio de Fab con una concentración mínima de antígeno marcado (^{125}I) en presencia de una serie de titulaciones de antígeno no marcado, a continuación se captura el antígeno unido con una placa recubierta de anticuerpo anti-Fab (Chen, et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881). Para establecer las condiciones para el ensayo, las placas de microtitulación (Dynex) se recubren toda la noche con 5 $\mu\text{g/ml}$ de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en carbonato de sodio 50 mM (pH 9,6), y posteriormente se bloquea con albúmina de suero bovino al 2% (p/v) en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23°C). En una placa no adsorbente (Nunc #269620), 100 pM o 26 pM de [^{125}I]-antígeno se mezclan con diluciones en serie de un Fab de interés (por ejemplo, consistentes con la evaluación de un anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta et al., (1997) Cancer Res. 57:4593-4599). El Fab de interés se incubaba a continuación durante toda la noche; aunque sin embargo la incubación puede continuar durante un periodo de tiempo más largo (por ejemplo, 65 horas) para asegurar que se alcanza el equilibrio. A continuación, las mezclas se transfieren a la placa de captura para la incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). A continuación, se extrae la solución y se lava la placa ocho veces con Tween-20 al 0,1% en PBS. Cuando se han secado las placas, se añaden 150 μl / pocillo de centelleador (MicroScint-20; Packard), y se recuentan las placas en un contador gamma Topcount (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que produce menos o igual a un 20% de la unión máxima se eligen para su uso en ensayos de unión competitiva. Según otra realización, K_d o el valor de K_d se mide utilizando ensayos de resonancia de plasmón superficial utilizando un BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C con chips CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (RU). Brevemente, se activan chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) según las instrucciones del suministrador. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, en 5 $\mu\text{g/ml}$ (~0,2 μM) antes de la inyección a una velocidad de flujo de 5 $\mu\text{l/min}$ para conseguir aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Tras la inyección de antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos no reaccionados. Para mediciones cinéticas, se inyectaron diluciones en serie de dos veces de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con Tween 20 al 0,05% (PBST) a 25°C a una velocidad de flujo de aproximadamente 25 $\mu\text{l/min}$. Las velocidades de asociación (k_{on}) y velocidades de disociación (k_{off}) se calculan utilizando un modelo de unión simple de Langmuir uno a uno (BIAcore Evaluation Software version 3.2) mediante el ajuste simultáneo del sensograma de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (K_d) se calcula como la proporción $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$. Véase, por ejemplo, Chen, Y., et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881. Si la velocidad "on" supera $10^6 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ mediante el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior, entonces la velocidad "on" se puede determinar utilizando una técnica de "quenching" fluorescente que mide el incremento o descenso en la intensidad de emisión por fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda 16 nm) a 25°C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno medidas en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con flujo interrumpido (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro 8000-series SLM-Aminco (ThermoSpectronic) con una cubeta de agitación.

[0071] Una "velocidad on" o "velocidad de asociación o " k_{on} " según la presente invención también se puede determinar con la misma técnica de resonancia de plasmón superficial descrita anteriormente utilizando un BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25°C con chips CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (RU). Brevemente, se activan chips biosensores de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore Inc.) con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) según las instrucciones del suministrador. El antígeno se diluye con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, en 5 $\mu\text{g/ml}$ (~0,2 μM) antes de la inyección a una velocidad de flujo de 5 $\mu\text{l/min}$ para conseguir aproximadamente 10 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada. Tras la inyección de antígeno, se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos no reaccionados. Para mediciones cinéticas, se inyectaron diluciones en serie de dos veces de Fab (0,78 nM a 500 nM) en PBS con Tween 20 al 0,05% (PBST) a 25°C a una velocidad de flujo de aproximadamente 25 $\mu\text{l/min}$. Las velocidades de asociación (k_{on}) y velocidades de disociación (k_{off}) se calculan utilizando un modelo de unión simple de Langmuir uno a uno (BIAcore Evaluation Software version 3.2) mediante el ajuste simultáneo del sensograma de asociación y disociación. La constante de disociación en equilibrio (K_d) se calculó como la proporción $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$. Véase, por ejemplo, Chen, Y., et al., (1999) J. Mol Biol 293:865-881. sin embargo, si la velocidad "on" supera $10^6 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ mediante el ensayo de resonancia de plasmón superficial anterior,

entonces la velocidad "on" se puede determinar utilizando una técnica de "quenching" fluorescente que mide el incremento o descenso en la intensidad de emisión por fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, paso de banda 16 nm) a 25°C de un anticuerpo antiantígeno 20 nM (forma Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno medidas en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con flujo interrumpido (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro 8000-series SLM-Aminco (ThermoSpectronic) con una cubeta de agitación.

[0072] El término "vector," tal como se utiliza aquí, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido" que se refiere a un bucle de ADN de doble cadena circular en el que pueden estar unidos segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector de fago. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que los segmentos de ADN adicionales pueden estar unidos en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de la replicación autónoma en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores de mamífero episomales). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episomales) pueden estar integrados en el genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula huésped, y de este modo se replican junto con el genoma huésped. Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que están unidos operativamente. Dichos vectores se refieren en el presente documento como "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores recombinantes"). En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de plásmidos. En la presente memoria, "plásmido" y "vector" se utilizan indistintamente ya que el plásmido es la forma de vector más utilizada habitualmente.

[0073] "Polinucleótido" o "ácido nucleico", utilizados indistintamente aquí, se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos modificados o bases y/o sus análogos, o cualquier sustrato que se puede incorporar en un polímero mediante ADN o ARN polimerasa, o mediante una reacción sintética. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, la modificación en la estructura de nucleótidos se puede realizar antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos se puede interrumpir mediante componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido se puede modificar adicionalmente después de la síntesis, tal como mediante la conjugación con un marcador. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, "bloqueadores", sustitución de uno o más nucleótidos naturales con un análogo, modificaciones internucleótidos, tales como, por ejemplo, aquellas con uniones no cargadas (por ejemplo, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con uniones cargadas (por ejemplo, fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), aquellas que contienen grupos colgando, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, poli-L-lisina, etc.), aquellas con intercaladores (por ejemplo, acridina, psoralen, etc.), aquellas que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radioactivos, boro, metales oxidantes, etc.), aquellas que contienen alquilantes, aquellas con uniones modificadas (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa anoméricos, etc.), así como formas no modificadas del polinucleótido o polinucleótidos. Además, se puede sustituir cualquier grupo hidroxilo presente normalmente en los azúcares, por ejemplo, por grupos fosfonato, grupos fosfato, protegidos por grupos protectores estándar o activados para preparar uniones adicionales a nucleótidos adicionales, o se pueden conjugar a soportes sólidos o semisólidos. El OH 5' y 3' terminal se puede fosforilar o sustituir con aminas o restos de grupos de bloqueo orgánicos de 1 a 20 átomos de carbono. También se pueden derivar otros hidroxilos a grupos protectores estándar. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares de ribosa o desoxirribosa que son conocidas generalmente en la técnica, incluyendo, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alil-, 2'-fluoro o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares alfa-anoméricos, azúcares epiméricos, tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósidos básicos, tales como metil ribósido. Se pueden sustituir uno o más enlaces fosfodiéster por grupos de unión alternativos. Estos grupos de unión alternativos incluyen, pero sin limitación, realizaciones en las que el fosfato se sustituye por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("ditiato"), "(O)NR₂" ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ ("formacetal"), en que cada R o R' es independientemente H o alquilo sustituido o no sustituido (1-20 C) que opcionalmente contienen una unión éter (-O-), arilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno o araldilo. No todas las uniones en un polinucleótido necesitan ser idénticas. La descripción anterior se aplica a todos los polinucleótidos referidos aquí, incluyendo ARN y ADN.

[0074] "Oligonucleótido," tal como se utiliza aquí, se refiere a polinucleótidos cortos, de una cadena, generalmente sintéticos, que tienen, en general, pero no necesariamente menos de 200 nucleótidos de longitud. Los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" no se excluyen mutuamente. La descripción anterior para polinucleótidos es igualmente y totalmente aplicable a oligonucleótidos.

[0075] El término "Klotho beta" (indistintamente denominado "KLβ" o "Beta Klotho" o βKlotho), tal como se utiliza aquí, se refiere, a menos que se especifique o contextualmente indique lo contrario, a cualquiera polipéptido KLβ nativo o variante (si es nativo o sintético). El término "secuencia nativa" comprende específicamente formas naturales truncadas o secretadas (por ejemplo, una secuencia de dominio extracelular), formas variantes naturales (por ejemplo, formas alternativas empalmadas) y variantes alélicas naturales. El término "KLβ de tipo natural" se refiere en general a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una proteína KLβ natural. El término "secuencia de KLβ de tipo natural" se refiere en general a una secuencia de aminoácidos hallada en el KLβ natural.

[0076] El término "FGF 19" (indistintamente denominado "factor de crecimiento de fibroblastos 19"), tal como se utiliza aquí, se refiere, a menos que se especifique o contextualmente indique lo contrario, a cualquiera polipéptido KLβ nativo o variante (si es nativo o sintético). El término "secuencia nativa" comprende específicamente formas naturales truncadas o secretadas (por ejemplo, una secuencia de dominio extracelular), formas variantes naturales (por ejemplo, formas alternativas empalmadas) y variantes alélicas naturales. El término "KLβ de tipo natural" se refiere en general a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una proteína KLβ natural. El término "secuencia de KLβ de tipo natural" se refiere en general a una secuencia de aminoácidos hallada en el KLβ natural.

[0077] Un "antagonista de FGF19" se refiere a una molécula capaz de neutralizar, bloquear, inhibir, anular, reducir o interferir con las actividades de un FGF19 que incluye, por ejemplo, la unión a KLβ (opcionalmente conjuntamente con heparina), unión a FGFR4 (opcionalmente conjuntamente con heparina), unión a KLβ y FGFR4 (opcionalmente conjuntamente con heparina), la inducción de la inducción de cFos, Junb y/o Junc mediada por FGF-19 (in vitro o in vivo), la inducción de la señalización cascada abajo de FGFR4 y/o FGF19 (que incluyen, sin limitación, la fosforilación de FRS2, fosforilación de ERK1/2 y activación del mecanismo de Wnt), y/o inducción de cualquier mecanismo biológico de FGF19 y/o FGFR4 biológicamente relevante, y/o inducción de un tumor, trastorno proliferativo celular o un cáncer; y/o inducción de un trastorno asociado con la expresión y/o actividad de FGF (tal como una expresión y/o actividad de FGF19 incrementadas). Los antagonistas de FGF19 incluyen anticuerpos y fragmentos de los mismos de unión a antígeno, proteínas, péptidos, glicoproteínas, glicopéptidos, glicolípidos, polisacáridos, oligosacáridos, ácidos nucleicos, moléculas bioorgánicas, peptidomiméticos, agentes farmacológicos y sus metabolitos, secuencias de control de la transcripción y traducción, y similares. Los antagonistas también incluyen inhibidores de molécula pequeña de una proteína, y proteínas de fusión, moléculas receptoras y derivados que se unen específicamente a proteína, secuestrando así su unión a su diana, variantes de antagonista de la proteína, moléculas de ARNsi dirigidas a una proteína, moléculas antisentido dirigidas a una proteína, aptámeros de ARN, y ribozimas contra una proteína. En algunas realizaciones, el antagonista de FGF19 es una molécula que se une a FGF19 y neutraliza, bloquea, inhibe, anula, reduce o interfiere con una actividad biológica de FGF19.

[0078] Un "antagonista de KLβ" se refiere a una molécula capaz de neutralizar, bloquear, inhibir, anular, reducir o interferir con las actividades de KLβ que incluye, por ejemplo, la unión a FGFR (por ejemplo, FGFR4) (opcionalmente conjuntamente con heparina), unión a FGF (por ejemplo, FGF19) (opcionalmente conjuntamente con heparina), unión a FGFR4 y FGF19 (opcionalmente conjuntamente con heparina), la inducción de la inducción de cFos, Junb y/o Junc mediada por FGF-19 (in vitro o in vivo), la inducción de la señalización cascada abajo de FGFR4 y/o FGF19 (que incluyen, sin limitación, la fosforilación de FRS2, fosforilación de ERK1/2 y activación del mecanismo de Wnt), y/o inducción de cualquier mecanismo biológico de KLβ y/o FGFR4 biológicamente relevante, y/o inducción de un tumor, trastorno proliferativo celular o un cáncer; y/o inducción de un trastorno asociado con la expresión y/o actividad de KLβ (tal como una expresión y/o actividad de KLβ incrementadas). Los antagonistas de KLβ incluyen anticuerpos y fragmentos de los mismos de unión a antígeno, proteínas, péptidos, glicoproteínas, glicopéptidos, glicolípidos, polisacáridos, oligosacáridos, ácidos nucleicos, moléculas bioorgánicas, peptidomiméticos, agentes farmacológicos y sus metabolitos, secuencias de control de la transcripción y traducción, y similares. Los antagonistas también incluyen inhibidores de molécula pequeña de una proteína, y proteínas de fusión, moléculas receptoras y derivados que se unen específicamente a proteína, secuestrando así su unión a su diana, variantes de antagonista de la proteína, moléculas de ARNsi dirigidas a una proteína, moléculas antisentido dirigidas a una proteína, aptámeros de ARN, y ribozimas contra una proteína. En algunas realizaciones, el antagonista de KLβ es una molécula que se une a KLβ y neutraliza, bloquea, inhibe, anula, reduce o interfiere con una actividad biológica de KLβ.

[0079] El término "FGFR4" (indistintamente denominado "receptor del factor de crecimiento de fibroblasto"), tal como se utiliza aquí, se refiere, a menos que se especifique o contextualmente indique lo contrario, a cualquiera polipéptido FGFR4 nativo o variante (si es nativo o sintético). El término "secuencia nativa" comprende específicamente formas naturales truncadas o secretadas (por ejemplo, una secuencia de dominio extracelular), formas variantes naturales (por ejemplo, formas alternativas empalmadas) y variantes alélicas naturales. El término "FGFR4 de tipo natural" se refiere en general a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una proteína FGFR4 natural. El término "secuencia de FGFR4 de tipo natural" se refiere en general a una secuencia de aminoácidos hallada en el FGFR4 natural.

[0080] Un "antagonista de FGFR" se refiere a una molécula capaz de neutralizar, bloquear, inhibir, anular, reducir o interferir con las actividades de un receptor de FGF ("FGFR") que incluye, por ejemplo, la unión a KLβ (opcionalmente conjuntamente con heparina), unión a FGF (por ejemplo, FGF19) (opcionalmente conjuntamente con heparina), unión a KLβ y FGF (por ejemplo, FGF19) (opcionalmente conjuntamente con heparina), la inducción de la inducción de cFos, Junb y/o Junc mediada por FGF-19 (in vitro o in vivo), la inducción de la señalización cascada abajo de FGFR y/o FGF (que incluyen, sin limitación, la fosforilación de FRS2, fosforilación de ERK1/2 y activación del mecanismo de Wnt), y/o inducción de cualquier mecanismo biológico de FGF y/o FGFR biológicamente relevante, y/o inducción de un tumor, trastorno proliferativo celular o un cáncer; y/o inducción de un trastorno asociado con la expresión y/o actividad de FGFR (tal como una expresión y/o actividad de FGFR incrementadas). Los antagonistas de FGFR incluyen anticuerpos y fragmentos de los mismos de unión a antígeno, proteínas,

péptidos, glicoproteínas, glicopéptidos, glicolípidos, polisacáridos, oligosacáridos, ácidos nucleicos, moléculas bioorgánicas, peptidomiméticos, agentes farmacológicos y sus metabolitos, secuencias de control de la transcripción y traducción, y similares. Los antagonistas también incluyen inhibidores de molécula pequeña de una proteína, y proteínas de fusión, moléculas receptoras y derivados que se unen específicamente a proteína, secuestrando así su unión a su diana, variantes de antagonista de la proteína, moléculas de ARNsi dirigidas a una proteína, moléculas antisentido dirigidas a una proteína, aptámeros de ARN, y ribozimas contra una proteína. En algunas realizaciones, el antagonista de FGFR (por ejemplo, antagonista de FGFR4) es una molécula que se une a FGFR y neutraliza, bloquea, inhibe, anula, reduce o interfiere con una actividad biológica de FGFR.

[0081] Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se utilizan indistintamente en el sentido más amplio e incluyen anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales de longitud completa o intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, siempre que muestren la actividad biológica deseada), y también pueden incluir ciertos fragmentos de anticuerpos (tal como se describe en detalle aquí). Un anticuerpo puede ser humano, humanizado y/o madurado para afinidad.

[0082] El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas partes de los dominios variables difieren ampliamente en la secuencia entre anticuerpos y se utilizan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye de manera uniforme a lo largo de los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos denominados regiones determinantes de complementariedad (CDRs) o regiones hipervariables, ambas en los dominios variables de la cadena ligera y la cadena pesada. Las partes más altamente conservada de los dominios variables se denominan la región armazón ("framework") (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas comprenden cuatro regiones FR, que mayoritariamente amplamente una configuración de lámina β , conectadas por tres CDRs, que forman bucles que conectan, y en algunos casos conforman, la estructura de lámina β . Las CDRs en cada cadena se mantiene juntas de manera próxima por las regiones FR y, con las CDRs de la otra cadena, contribuyen a la formación de sitios de unión a antígeno de anticuerpos (véase Kabat et al., NIH Publ. No. 91-3242, Vol. I, páginas 647-669 [1991]). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero muestran varias funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpo.

[0083] La digestión de anticuerpos con papaína produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", cada uno de los cuales posee un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de combinación a antígeno y que incluso es capaz de entrecruzar el antígeno.

[0084] "Fv" es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio completo de unión y reconocimiento a antígeno. En una especie Fv de dos cadenas, esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera en asociación estrecha no covalente. En una especie de una cadena, un dominio variable de cadena pesada y uno de cadena ligera pueden estar unidos covalentemente por un péptido enlazador flexible, de manera que las cadenas ligera y pesada se pueden asociar en una estructura "dimérica" análoga a la de una especie de Fv de dos cadenas. Es en esta configuración que las tres CDR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, las seis CDR confieren al anticuerpo una especificidad de unión a antígeno. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de una Fv que comprende sólo tres CDR específicas de antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse a antígeno, aunque con una menor afinidad que el sitio de unión completo.

[0085] El fragmento Fab contiene también el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de una serie de residuos en el extremo carboxi terminal del dominio CH1 de la cadena pesada que incluyen 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 residuo o residuos de cisteína de los dominios constantes transportan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpos $F(ab')_2$ se produjeron originalmente como parejas de fragmentos de Fab' que tienen cisteínas bisagras entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

[0086] Las "cadenas ligeras" de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado se puede asignar a uno de dos tipos claramente distintos, denominadas kappa (κ) y lambda (λ), en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

[0087] Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de éstas se pueden dividir además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan α , δ , ϵ , γ , y μ , respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

[0088] "Fragmentos de anticuerpos" comprenden sólo una parte de un anticuerpo intacto, en los que la parte

mantiene preferiblemente por lo menos una, preferiblemente la mayoría o todas, las funciones normalmente asociadas con la parte cuando está presente en un anticuerpo intacto. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpo se incluyen Fab, Fab', F(ab')₂ y fragmentos Fv; diabodies; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena única; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. En una realización, un fragmento de anticuerpo comprende un sitio de unión a antígeno del anticuerpo intacto y de este modo mantiene la capacidad de unirse a antígeno. En otra realización, un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, uno que comprende la región Fc, mantiene por lo menos una de las funciones biológicas normalmente asociadas con la región Fc cuando está presente en un anticuerpo intacto, tal como la unión a FcRn, modulación de la vida media del anticuerpo, la función de ADCC y la unión a complemento. En una realización, un fragmento de anticuerpo es un anticuerpo monovalente que tiene una vida media in vivo sustancialmente similar a un anticuerpo intacto. Por ejemplo, dicho fragmento de anticuerpo puede comprender un brazo de unión a antígeno unido a una secuencia de Fc capaz de conferir estabilidad in vivo al fragmento.

[0089] El término "región hipervariable", "HVR" o "HV", cuando se utiliza aquí, se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en la secuencia y/o forman bucles definidos estructuralmente. En general, los anticuerpos comprenden seis regiones hipervariables; tres en VH (H1, H2, H3), y tres en VL (L1, L2, L3). En el presente documento se utilizan y se comprende un conjunto de delineaciones de la región hipervariable. Las regiones determinantes de complementariedad de Kabat (CDR) se basan en la variabilidad de la secuencia y son las más utilizadas habitualmente (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia se refiere en cambio a la localización de los bucles estructurales (Chothia y Lesk J. *Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Las regiones hipervariables de AbM representan un compromiso entre las CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y son utilizadas por el software de modelaje de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Las regiones hipervariables de "contacto" se basan en un análisis de las estructuras de cristales complejos disponibles.

[0090] Las regiones hipervariables pueden comprender "regiones hipervariables extendidas" de la siguiente manera: 24-36 (L1), 46-56 (L2) y 89-97 (L3) en VL y 26-35 (H1), 49-65 o 50 a 65 (H2) y 93-102 (H3) en VH. Los residuos de los dominios variables se enumeran según Kabat et al., supra para cada una de estas definiciones.

[0091] Residuos de "armazón" o "FR" son aquellos residuos del dominio variable diferentes de los residuos de la región hipervariable tal como se define aquí.

[0092] Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murino) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Para la mayoría, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) donde los residuos de una región hipervariable del receptor se sustituyen por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo dador), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región armazón ("framework") (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo dador. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente la acción del anticuerpo. En general, un anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de por lo menos uno, y habitualmente dos, dominios variables, en que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a aquellos de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente por lo menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, habitualmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986), Reichmann et al., *Nature* 332: 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992). Véase también los siguientes artículos de revisión y referencias citadas en las mismas: Vaswani y Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurler and Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994).

[0093] Los anticuerpos (inmunoglobulinas) "quiméricos" tienen una parte de la cadena pesada y/o ligera idéntica con u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de cadena o cadenas es idéntico con u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre y cuando muestren la actividad biológica deseada (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567; y Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)). El anticuerpo humanizado tal como se utiliza aquí es un subgrupo de anticuerpos quiméricos.

[0094] Los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena única" o "sFv" comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo, en los que estos dominios se presentan en una única cadena de polipéptido. Generalmente, el polipéptido scFv comprende además un polipéptido enlazador entre los dominios V_H y V_L que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de sFv véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, páginas 269-315 (1994).

[0095] Un "antígeno" es un antígeno predeterminado al que se puede unir selectivamente un anticuerpo. La diana

puede ser un polipéptido, carbohidrato, ácido nucleico, lípido, hapteno u otro compuesto natural o sintético. Preferiblemente, la diana es un polipéptido.

[0096] El término "diabodies" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena de polipéptido ($V_H - V_L$). Utilizando un enlazador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crean dos sitios de unión a antígeno. Los diabodies se describen más detalladamente en, por ejemplo, EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993).

[0097] Un "anticuerpo humano" es aquel que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde con la de un anticuerpo producido por un humano y/o se ha fabricado utilizando cualquiera de las técnicas para producir anticuerpos humanos tal como se describen en este documento. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprenda residuos de unión a antígeno no humanos.

[0098] Un anticuerpo "madurado para afinidad" es aquel con una o más alteraciones en una o más de CDR del mismo que dan lugar a una mejora en la afinidad del anticuerpo para el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee esta alteración o alteraciones. Los anticuerpos madurados para afinidad preferidos tienen afinidades nanomolares o incluso picomolares para la diana. Los anticuerpos madurados para afinidad se producen mediante procedimientos conocidos en la técnica. Marks et al. *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) describe la maduración para afinidad por mezcla aleatoria de los dominios de V_H y V_L . La mutagénesis aleatoria de los residuos de CDR y/o armazón se describe por: Barbas et al. *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994); Schier et al. *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton et al. *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson et al., *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); y Hawkins et al, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

[0099] Las "funciones efectoras" de anticuerpo se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o una región Fc de una variante en la secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo y varían con el isotipo del anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen la unión a C1q y la citotoxicidad dependiente de complemento; la unión a receptor de Fc; citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; subregulación de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de células B); y la activación de células B.

[0100] "Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" o "ADCC" se refieren a una forma de citotoxicidad en que la Ig secretada unida a receptores de Fc (FcRs) presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo, células asesinas ("killer") naturales (NK), neutrófilos, y macrófagos) permite que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana que porta el antígeno y, posteriormente, eliminan la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos "arman" las células citotóxicas y son absolutamente necesarias para dicha eliminación. Las células primarias para mediar la ADCC, las células NK, expresan FcγRIII solo, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991). Para determinar la actividad de ADCC de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo ADCC in vitro, tal como el descrito en las patentes de Estados Unidos 5.500.362 ó 5.821.337 o Presta patente de Estados Unidos No. 6.737.056. Células efectoras útiles para estos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células asesinas naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede determinar in vivo, por ejemplo en un modelo animal, tal como el descrito en Clynes et al. *PNAS (USA)*, 95:652-656 (1998).

[0101] "Células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcRs y realizan funciones efectoras. Preferiblemente, las células expresan por lo menos FcγRIII y realizan la función efectora ADCC. Ejemplos de leucocitos humanos que median la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células asesinas naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos; prefiriéndose las células PBMCs y NK. Las células efectoras se pueden aislar de una fuente nativa, por ejemplo, de sangre.

[0102] Los términos "receptor Fc" o "FcR" describen 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 aquel que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII, y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas alternativamente empalmadas ("spliced") de estos receptores. Los receptores FcγRIII incluyen FcγRIIA (un "receptor de activación") y FcγRIIB (un "receptor de inhibición"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en sus dominios citoplásmicos. El receptor de activación FcγRIIA contiene un motivo de activación del inmunoreceptor basado en tirosina (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor de inhibición FcγRIIB contiene un motivo de inhibición del inmunoreceptor basado en tirosina (ITIM) en su dominio citoplásmico. (Véase revisión en Daëron, *Annu. Rev. Immunol.*, 15:203-234 (1997)). Los FcRs se revisan en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods*, 4:25-34 (1994); y de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41 (1995). Otros FcRs, incluyendo los que se identifiquen en el futuro, están comprendidos por el término "FcR" del presente documento. El término "receptor Fc" o "FcR" también incluye el receptor neonatal FcRn, que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) y

Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)) y regula la homeostasis de inmunoglobulinas. WO00/42072 (Presta) describe variantes de anticuerpo con una unión mejorada o disminuida a FcR. Véase también Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001).

- 5 **[0103]** Los métodos para medir la unión a FcRn son conocidos (véase, por ejemplo, Ghetie 1997, Hinton 2004). Se pueden analizar la unión a FcRn humano in vivo y la semivida en suero de polipéptidos de unión con afinidad elevada a FcRn humano, por ejemplo, en ratones transgénicos o líneas celulares humanas transfectadas que expresan FcRn human, o en primates administrados con los polipéptidos variantes de Fc.
- 10 **[0104]** "Citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" se refieren a la lisis de una célula diana en presencia del complemento. La activación del mecanismo de complemento clásico se inicia mediante la unión del primer componente del sistema de complemento (C₁q) a anticuerpos (de la subclase apropiada) que están unidos a su antígeno afin. Para determinar la activación del complemento se puede realizar un ensayo CDC, por ejemplo tal como se describe en Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods, 202:163 (1996).
- 15 **[0105]** Las variantes de polipéptidos con las secuencias de aminoácidos de la región Fc alteradas y la capacidad de unión a C₁q aumentada o disminuida se describen en la patente de Estados Unidos No. 6,194,551B1 y WO99/51642. Véase, también, Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).
- 20 **[0106]** Un anticuerpo "que bloquea" o un anticuerpo "antagonista" es aquel que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que se une. Los anticuerpos de bloqueo o anticuerpos antagonistas preferidos inhiben sustancialmente o completamente la actividad biológica del antígeno.
- 25 **[0107]** "Muestra biológica" (indistintamente denominada "muestra" o "muestra de tejido o célula") comprende una variedad de tipos de muestra obtenidas de un individuo y se puede utilizar en un ensayo de diagnóstico o monitorización. La definición comprende sangre y otras muestras líquidas de origen biológico, muestras de tejido sólido, tales como muestras de biopsia o cultivos de tejido o células derivadas de las mismas, y la progenie de las mismas. La definición también incluye muestras que se han manipulado de cualquier modo después de su obtención, tal como mediante tratamiento con reactivos, solubilización o enriquecimiento de ciertos componentes,
- 30 tales como proteínas o polinucleótidos, o que se sumergen en una matriz semisólida o sólida con fines de separación. El término "muestra biológica" comprende una muestra clínica y también incluye células en cultivo, sobrenadantes celulares, lisados celulares, suero, plasma, fluido biológico y muestras de tejido. La fuente de la muestra biológica puede ser tejido sólido de una muestra de órgano o tejido o biopsia o aspirado fresco, congelado y/o conservado; sangre o cualquier constituyente de la sangre; fluidos corporales, tales como fluido espinal cerebral,
- 35 fluido amniótico, fluido peritoneal o fluido intersticial; células de cualquier momento en la gestación o desarrollo del sujeto. En algunas realizaciones, la muestra biológica se obtiene de un tumor primario o metastásico. La muestra biológica puede contener compuestos que no se entremezclan de forma natural con el tejido en la naturaleza, tal como conservantes, anticoagulantes, tampones, fijadores, nutrientes, antibióticos o similares.
- 40 **[0108]** Para los objetivos de la presente invención, una "sección" de una muestra de tejido significa una parte individual o trozo de una muestra de tejido, por ejemplo, una tira delgada de tejido o células cortada de una muestra de tejido. Se entiende que se pueden tomar múltiples secciones de muestras de tejido y someterse a un análisis según la presente invención. En algunas realizaciones, la misma sección de muestra de tejido se analiza a niveles morfológicos y moleculares, o se analiza con respecto a la proteína y ácido nucleico.
- 45 **[0109]** La palabra "marcador" cuando se usa aquí, se refiere a un compuesto o composición que se conjuga o fusiona directa o indirectamente a un reactivo, tal como una sonda de ácido nucleico o un anticuerpo y facilita la detección del reactivo al que se conjuga o fusiona. El marcador puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, marcadores de radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la modificación química de un compuesto o una composición de sustrato que es detectable.
- 50 **[0110]** Un "medicamento" es un fármaco activo para tratar el trastorno en cuestión o sus síntomas, o efectos secundarios.
- 55 **[0111]** Un "trastorno" o "enfermedad" es cualquier condición que se beneficiaría del tratamiento con una sustancia/molécula o método de la invención. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas que incluyen las condiciones patológicas que predisponen el mamífero al trastorno en cuestión. Ejemplos no limitantes de trastornos a tratar aquí incluyen tumores malignos y benignos; carcinoma, blastoma y sarcoma.
- 60 **[0112]** Los términos "trastorno proliferativo celular" y "trastorno proliferativo" se refieren a trastornos que están asociados con cierto grado de proliferación celular anormal. En una realización, el trastorno proliferativo celular es cáncer.
- 65 **[0113]** "Tumor", tal como se utiliza aquí, se refiere a todo crecimiento y proliferación de células neoplásicas, ya sean malignas o benignas y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos. Los términos "cáncer", "canceroso", "trastorno proliferativo celular", "trastorno proliferativo" y "tumor" no se excluyen mutuamente tal como se refieren

aquí.

[0114] Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la condición fisiológica en mamíferos que se caracterizan habitualmente por un crecimiento/proliferación celular no regulada. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Más ejemplos particulares de dichos cánceres incluyen el cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de hipófisis, cáncer de esófago, astrocitoma, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de pulmón de célula no pequeña, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma escamoso de pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o uterino, carcinoma de glándula salival, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, cáncer de cerebro, cáncer de endometrio, cáncer de testículo, colangiocarcinoma, carcinoma de la vesícula biliar, cáncer gástrico, melanoma, y varios tipos de cáncer de cabeza y cuello. La desregulación de la angiogénesis puede conducir a muchos trastornos que se pueden tratar mediante composiciones y métodos de la invención. Estos trastornos incluyen condiciones no neoplásicas y neoplásicas. Las neoplásicas incluyen, pero no se limitan a, los descritas anteriormente. Los trastornos no neoplásicos incluyen, pero no se limitan a, la hipertrofia no deseada o aberrante, artritis, artritis reumatoide (AR), psoriasis, placas de psoriasis, sarcoidosis, aterosclerosis, placas ateroscleróticas, retinopatías proliferativas diabéticas y otras, incluyendo retinopatía de premadurez, fibroplasia retrolental, glaucoma neovascular, degeneración macular relacionada con la edad, edema macular diabético, neovascularización corneal, neovascularización del injerto de córnea, rechazo del injerto de córnea, neovascularización retinal/coroidea, neovascularización del ángulo (rubeosis), enfermedad neovascular ocular, reestenosis vascular, malformaciones arteriovenosas (MAV), meningioma, hemangioma, angiofibroma, hiperplasias tiroideas (incluyendo la enfermedad de Grave), el trasplante de córnea y otros tejidos, la inflamación crónica, la inflamación pulmonar, lesión pulmonar aguda/ARDS, sepsis, hipertensión pulmonar primaria, efusiones malignas pulmonares, edema cerebral (por ejemplo, asociado con accidente cerebrovascular agudo/lesión cerrada de cabeza/trauma), inflamación sinovial, formación de pannus en RA, miositis osificante, formación ósea hipertrófica, osteoartritis (OA), ascitis refractaria, enfermedad de ovario poliquístico, endometriosis, tercer espaciamiento de enfermedades de fluidos (pancreatitis, síndrome compartimental, quemaduras, enfermedad del intestino), fibromas uterinos, parto prematuro, inflamación crónica como IBD (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), rechazo del injerto renal, enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome nefrótico, crecimiento de masa de tejido no deseado o aberrante (no cáncer), articulaciones hemofílicas, cicatrices hipertróficas, inhibición del crecimiento del pelo, síndrome de Osler-Weber, fibroplasias retrolentales granuloma piógeno, esclerodermia, tracoma, adherencias vasculares, sinovitis, dermatitis, preeclampsia, ascitis, efusión pericárdica (tal como la asociada con la pericarditis), y efusión pleural.

[0115] El término trastornos "debilitantes" (por ejemplo, síndrome debilitante, caquexia, sarcopenia) se refiere a un trastorno causado por la pérdida indeseable y/o insana de peso o pérdida de masa celular corporal. En la vejez, así como en pacientes con SIDA y cáncer, la enfermedad debilitante puede dar lugar a una pérdida indeseada de peso corporal, que incluye los compartimentos de grasa y libres de grasa. Las enfermedades debilitantes pueden ser el resultado de la captación inadecuada de alimento y/o cambios metabólicos relacionados con la enfermedad y/o el proceso de envejecimiento. Los pacientes con cáncer y los pacientes con SIDA, así como los pacientes después de cirugía extensiva o con infecciones crónicas, enfermedades inmunológicas, hipertiroidismo, enfermedad de Crohn, enfermedad psicogénica, insuficiencia cardíaca crónica u otros traumas graves, padecen frecuentemente de la enfermedad debilitante que a veces se refiere como caquexia, un trastorno metabólico y, a veces, de la alimentación. La caquexia se caracteriza adicionalmente por el hipermetabolismo y el hipercatabolismo. Aunque la caquexia y la enfermedad debilitante se utilizan frecuentemente de manera indistinta para referirse a condiciones de debilitamiento, existe a menos un cuerpo de investigación que diferencia la caquexia del síndrome debilitante como la pérdida de masa libre de grasa y particularmente la masa celular corporal (Mayer, 1999, J. Nutr. 129(Suppl.):256S-259S). La sarcopenia, aunque es otro trastorno que puede afectar al envejecimiento del individuo, se caracteriza habitualmente por la pérdida de masa muscular. La enfermedad debilitante en la fase final tal como se describe anteriormente puede desarrollarse en individuos que padecen de caquexia o sarcopenia.

[0116] Tal como se utiliza aquí, "tratamiento" se refiere a la intervención clínica en un intento por alterar la evolución natural del individuo o la célula en tratamiento, y se puede realizar por profilaxis o durante la evolución de la patología clínica. Los efectos deseables del tratamiento incluyen la prevención de la aparición o reaparición de la enfermedad, alivio de los síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, disminución de la velocidad de progresión de la enfermedad, mejora o cura parcial del estado patológico y remisión o pronóstico mejorado. En algunas realizaciones, se utilizan los anticuerpos para retrasar el desarrollo de una enfermedad o trastorno.

[0117] Un "agente antiangiogénesis" o "inhibidor de la angiogénesis" se refieren a un sustancia de peso molecular pequeño, un polinucleótido, un polipéptido, una proteína aislada, una proteína recombinante, un anticuerpo, o conjugados o proteínas de fusión de los mismos, que inhiben la angiogénesis, vasculogénesis o la permeabilidad vascular no deseable, ya sea directa o indirectamente. Por ejemplo, un agente antiangiogénesis es un anticuerpo u otro antagonista para un agente angiogénico, tal como se define anteriormente, por ejemplo, anticuerpos para VEGF, anticuerpos para receptores de VEGF, moléculas pequeñas que bloquean la señalización del receptor de

VEGF (por ejemplo, PTK787/ZK2284, SU6668, SUTENT/SU11248 (malato de sunitinib), AMG706). Los agentes antiangiogénesis también incluyen inhibidores de angiogénesis nativos, por ejemplo, angiostatina, endostatina, etc. Véase, por ejemplo, Klagsbrun y D'Amore, *Annu. Rev. Physiol.*, 53: 217-39 (1991); Streit y Detmar, *Oncogene*, 22:3172-3179 (2003) (por ejemplo, tabla 3 que indica terapia antiangiogénica en melanoma maligno); Ferrara & Alitalo, *Nature Medicine* 5(12):1359-1364 (1999); Tonini et al., *Oncogene*, 22:6549-6556 (2003) (por ejemplo, tabla 2 que indica factores antiangiogénicos); y, Sato *Int. J. Clin. Oncol.*, 8:200-206 (2003) (por ejemplo, tabla 1 indica agentes antiangiogénicos utilizados en pruebas clínicas).

[0118] Un "individuo" es un vertebrado, preferiblemente, un mamífero, más preferiblemente, un ser humano. Entre los mamíferos se incluyen, pero sin limitaciones, animales de granja (como vacas), animales de competición, mascotas (como gatos, perros o caballos), primates, ratones y ratas.

[0119] "Mamífero" para los fines de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo humanos, animales domésticos y de granja, animales de zoológico, eventos deportivos o mascotas, tales como perros, caballos, gatos, vacas. Etc. Preferiblemente, el mamífero es humano.

[0120] Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosis y durante periodos de tiempo necesarios, para alcanzar el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

[0121] Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una sustancia/molécula de la invención, agonista o antagonista, puede variar según factores, tales como el estado patológico, edad, sexo y peso del individuo, y la capacidad de la sustancia/molécula agonista o antagonista para inducir una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también aquella cantidad en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial de la sustancia/molécula, agonista o antagonista, se ve superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosis y durante periodos de tiempo necesarios, para alcanzar el resultado profiláctico deseado. Habitualmente, pero no necesariamente, puesto que se usa una dosis profiláctica en sujetos antes o en una etapa más temprana de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz sería menor que la cantidad terapéuticamente eficaz.

[0122] "Condiciones relacionadas con la obesidad" se refieren a condiciones que son el resultado de o que se exasperan por la obesidad, tales como, pero sin limitación, trastornos dermatológicos, tales como infecciones, venas varicosas, Acanthosis nigricans, y eczema, intolerancia al ejercicio, diabetes mellitus tipo II, resistencia a insulina, hipertensión, hipercolesterolemia, colelitiasis, osteoartritis, lesión ortopédica, enfermedad tromboembólica, cáncer, y enfermedad coronaria (o cardiovascular), en particular, aquellas condiciones cardiovasculares asociadas con triglicéridos y ácidos grasos libres llevados en un individuo.

[0123] "Obesidad" se refiere a una condición mediante la cual un mamífero tiene un Índice de Masa Corporal (IMC), que se calcula como el peso (kg) entre la altura² (metros), de por lo menos 25,9. Convencionalmente, aquellas personas con un peso normal tienen un IMC de 19,9 a menos de 25,9. La obesidad en el presente documento puede ser debida a cualquier causa, ya sea genética o medioambiental. Ejemplos de trastornos que pueden dar lugar a obesidad o ser la causa de la obesidad incluyen la sobrealimentación y bulimia, enfermedad de ovario poliquístico, craneofaringioma, el síndrome de Prader-Willi, síndrome de Frohlich, diabetes tipo II, sujetos deficientes en GH, estatura corta variante normal, síndrome de Turner, y otras condiciones patológicas que muestran una actividad metabólica reducida o una disminución en gasto de energía en reposo como el porcentaje de masa total libre de grasas por ejemplo, niños con leucemia linfoblástica aguda.

[0124] El término "agente citotóxico", tal como se utiliza aquí, se refiere a una sustancia que inhibe o previene una función celular y/o causa la destrucción celular. El término pretende incluir 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, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes intercalantes, enzimas y fragmentos de las mismas, tales como enzimas nucleolíticas, antibióticos y toxinas, tales como toxinas que son moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas, y los diversos agentes antitumorales o anticancerígenos descritos a continuación. A continuación se describen otros agentes citotóxicos. Un agente tumoricida causa la destrucción de las células tumorales.

[0125] Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen los agentes alquilantes tales como la tiotepa y la ciclofosfamida CYTOXAN®; los alquilsulfonatos tales como el busulfán, el improsulfán y el piposulfán; las aziridinas tales como la benzodopa, carboquone, meturedopa, y uredopa; las etileniminas y metilamelaminas, incluyendo la altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolomelamina; las acetogeninas (especialmente la bullatacina y la bullatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lacona; lapacol; colquicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecan (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina); la briostatina; la calistatina; el CDC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofílico; teniposide; las criptoficinas (particularmente la criptoficina 1 y la criptoficina 8); la dolastatina; la

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

[0126] También se incluyen en esta definición agentes anti-hormonales que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de hormonas que pueden inducir el crecimiento del cáncer y, a menudo, en forma de tratamiento sistémico o de todo el cuerpo. Pueden ser hormonas en sí. Entre los ejemplos se incluyen antiestrógenos y modulares de receptores de estrógeno selectivos (SERMs), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo NOLVADEX® tamoxifeno), EVTSTA® raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y FARESTON® toremifeno; anti-progesteronas; subreguladores del receptor de estrógeno (ERDs); agentes que actúan para suprimir o desactivar los ovarios, por ejemplo, agonistas de la hormona liberadora de hormona leutinizante (LHRH), tales como LUPRON® y acetato de leuprolide ELIGARD®, acetato de goserelina, acetato de buserelina y tripterelina; otros antiandrógenos, tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; e inhibidores de aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, que regula la producción de estrógeno en las glándulas adrenales, tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazolas, aminoglutetimida, acetato de megestrol MEGASE®, exemestano AROMASIN®, formestanie, fadrozol, vorozol RIVISOR®, letrozol FEMARA®, y anastrozol ARIMIDEX®. Además, dicha definición de agentes quimioterapéuticos incluye bifosfonatos, tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® o OSTAC®), etidronato DIDROCAL®, NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato ZOMETA®, alendronato FOSAMAX®, pamidronato AREDIA®, tiludronato SKELID®, o risedronato ACTONEL®; así como troxacitabina (un análogo del 1,3-dioxolano nucleósido citosina); oligonucleótidos antisentido, particularmente aquellos que inhiben la expresión de genes en mecanismos de señalización implicados en la proliferación celular aberrante, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras, y receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas, tales como la vacuna THERATOPE® y vacunas con terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN®, y vacuna VAPID®; inhibidor de topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; rmRH ABARELIX®; ditosilato de lapatinib (un inhibidor de molécula pequeña de tirosina quinasa dual de ErbB-2 y EGFR también conocido como GW572016); y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores.

[0127] Un "agente inhibidor del crecimiento" cuando se utiliza en la presente invención se refiere a un compuesto o una composición que inhibe el crecimiento de una célula (tal como una célula que expresa KL β), *in vitro* o *in vivo*. De este modo, el agente inhibidor del crecimiento puede ser aquel que reduce significativamente el porcentaje de células (tal como una célula que expresa KL β) en la fase S. Algunos ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un punto diferente de la fase S), tales como agentes que inducen la interrupción de G1 y la interrupción de la fase M. Algunos bloqueadores clásicos de fase M incluyen los vincas (vincristina y vinblastina), taxanos, e inhibidores de topoisomerasa II, tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido, y bleomicina. Los agentes que interrumpen G1 también afectan a la interrupción de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN, tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloroetamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo, y ara-C. Puede encontrarse más información en The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn y Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs" por Murakami et al., (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente la página 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos anticancerosos derivados del tejo. El docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo es un análogo semisintético del paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). El paclitaxel y el docetaxel promueven el ensamblaje de microtúbulos a partir de dímeros de tubulina y estabilizan los microtúbulos mediante la prevención de la despolimerización, lo que da lugar a la inhibición de la mitosis en células.

[0128] "Doxorrubicina" es un antibiótico de antraciclina. El nombre químico completo de la doxorubicina es (8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-tridesoxi- α -L-lixo-hexapiranosil) oxil]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-8-(hidroxiacetil)-1-metoxi-5,12-naftacenodiona.

[0129] El término "polipéptido que comprende la región Fc" se refiere a un polipéptido, tal como un anticuerpo o una inmunoadhesina (véanse las definiciones siguientes), que comprende una región Fc. Se puede eliminar la lisina C-terminal (residuo 447 según el sistema de numeración EU) de la región Fc, por ejemplo, durante la purificación del polipéptido o mediante el diseño recombinante del ácido nucleico que codifica el polipéptidos. Por consiguiente, una composición que comprende un polipéptido que tiene una región Fc según la presente invención puede comprender polipéptidos con K447, con todas las K447 eliminadas, o una mezcla de polipéptidos con y sin el residuo K447.

KL β

[0130] KL β es una proteína transmembrana que comprende un dominio extracelular que contiene dos regiones con homología con los de glicosidasas de la familia 1, un dominio transmembrana, y una cola hidrofílica intracelular corta en el extremo C-terminal. La proteína KL β humana es una proteína de 1043 aminoácidos y contiene las siguientes regiones: péptidos señal (aminoácidos 1-51); glicosidasa (aminoácidos 77-508); glicosidasa (aminoácidos 517-967); transmembrana (aminoácidos 996-1012); y dominio citoplasmático (aminoácidos 1013-1043). Las secuencias de ácidos nucleicos y aminoácidos de KL β son conocidas en la técnica y se describen adicionalmente en el presente documento. La secuencia de ácidos nucleicos que codifica la KL β se puede diseñar utilizando la secuencia de aminoácidos de la región deseada de KL β . Alternativamente, se puede utilizar la secuencia de ADNc (o fragmentos de la misma) de KL β . El número de acceso de la KL β humana es NM_175737, y el número de acceso de la KL β de ratón es NM_031180. Las secuencias de KL β de ejemplo adicionales se muestran, por ejemplo, en las figuras 17 y 18, y se describen, por ejemplo, en Ito et al. (2000) Mech Dev 98: 115-119.

Moduladores de KL β

[0131] Los moduladores de KL β son moléculas que modulan la actividad de KL β , por ejemplo, agonistas y antagonistas. El término "agonista de KL β " se define en el contexto del papel biológico de KL β . En ciertas realizaciones, los agonistas poseen las actividades biológicas de una KL β , tal como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, los agonistas de KL β se unen a FGFR4 (opcionalmente conjuntamente con heparina), se unen a FGF19 (opcionalmente conjuntamente con heparina), se unen a FGFR4 y FGF19 (opcionalmente conjuntamente con heparina), inducen la inducción de cFos, Junb y/o Junc mediada por FGF-19 (in vitro o in vivo), inducen la señalización cascada abajo de FGFR4 y/o FGF19 (que incluyen, sin limitación, la fosforilación de FRS2, fosforilación de ERK1/2 y activación del mecanismo de Wnt), y/o inducen cualquier mecanismo biológico de KL β y/o FGFR4 biológicamente relevante.

[0132] Los moduladores de KL β son conocidos en la técnica y algunos se describen y se ejemplifican aquí. Una lista de ejemplo no limitante de antagonistas de KL β (tal como un anticuerpo contra KL β) contemplados se proporciona aquí en las "Definiciones".

[0133] Los moduladores útiles en la presente invención se pueden caracterizar por sus propiedades físicas/químicas y funciones biológicas mediante varios ensayos conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, los antagonistas de KL β se caracterizan por uno o más de los siguientes: unión a KL β , reducción o bloqueo de la activación de FGFR4, reducción o bloqueo de la señalización molecular cascada abajo del receptor FGFR4, inhibición de la actividad enzimática de KL β (tal como la actividad glicosidasa de KL β), alteración o bloqueo de la unión a FGF19, reducción y/o bloqueo de la señalización molecular de la cascada de FGF19, y/o el tratamiento y/o prevención de un tumor, trastorno proliferativo celular o un cáncer (tal como carcinoma hepatocelular); y/o tratamiento o prevención de

un trastorno asociado con la expresión y/o actividad de KL β . Los métodos para caracterizar los antagonistas y agonistas de KL β son conocidos en la técnica y algunos se describen y ejemplifican aquí.

Moduladores de FGFR

[0134] Los moduladores de FGFR son moléculas que modulan la actividad de FGFR, por ejemplo, agonistas y antagonistas. Un "antagonista de FGFR" se refiere a una molécula capaz de neutralizar, bloquear, inhibir, anular, reducir o interferir con las actividades de un receptor de FGF ("FGFR") que incluyen, por ejemplo, la unión a KL β (opcionalmente conjuntamente con heparina), unión a FGF (por ejemplo, FGF19) (opcionalmente conjuntamente con heparina), la inducción de la inducción de cFos, Junb y/o Junc mediada por FGF-19 (in vitro o in vivo), la inducción de la señalización cascada abajo de FGFR y/o FGF (que incluyen, sin limitación, la fosforilación de FRS2, fosforilación de ERK1/2 y activación del mecanismo de Wnt), y/o inducción de cualquier mecanismo biológico de FGF y/o FGFR biológicamente relevante, y/o inducción de un tumor, trastorno proliferativo celular o un cáncer; y/o inducción de un trastorno asociado con la expresión y/o actividad de FGFR (tal como una expresión y/o actividad de FGFR incrementadas). Los antagonistas de FGFR incluyen anticuerpos y fragmentos de los mismos de unión a antígeno, proteínas, péptidos, glicoproteínas, glicopéptidos, glicolípidos, polisacáridos, oligosacáridos, ácidos nucleicos, moléculas bioorgánicas, peptidomiméticos, agentes farmacológicos y sus metabolitos, secuencias de control de la transcripción y traducción, y similares. Los antagonistas también incluyen inhibidores de molécula pequeña de una proteína, y proteínas de fusión, moléculas receptoras y derivados que se unen específicamente a proteína, secuestrando así su unión a su diana, variantes de antagonista de la proteína, moléculas de ARNsi dirigidas a una proteína, moléculas antisentido dirigidas a una proteína, aptámeros de ARN, y ribozimas contra una proteína. En algunas realizaciones, el antagonista de FGFR (por ejemplo, un antagonista de FGFR4) es una molécula que se une a FGFR y neutraliza, bloquea, inhibe, anula, reduce o interfiere con una actividad biológica de FGFR.

[0135] Los moduladores de FGFR son conocidos en la técnica. Por ejemplo, Los inhibidores de molécula pequeña de FGFR se describen en Manetti, F. y Botta, M., Curr. Pharm. Des., 9, 567-581 (2003). Un ejemplo de un inhibidor de molécula pequeña de FGFR4 es PD173074 (Pfizer, Inc. Groton CT). Una lista de ejemplo y no limitante de antagonistas de FGFR (tal como un anticuerpo contra FGFR) contemplados se proporciona en las "Definiciones". Los métodos para caracterizar los antagonistas de FGFR son conocidos en la técnica, y algunos se describen y ejemplifican aquí.

Antagonistas de FGF19

[0136] Un "antagonista de FGF19" se refiere a una molécula capaz de neutralizar, bloquear, inhibir, anular, reducir o interferir con las actividades de un FGF19 que incluye, por ejemplo, la unión a KL β (opcionalmente conjuntamente con heparina), unión a FGFR4 (opcionalmente conjuntamente con heparina), unión a KL β y FGFR4 (opcionalmente conjuntamente con heparina), la inducción de la inducción de cFos, Junb y/o Junc mediada por FGF-19 (in vitro o in vivo), la inducción de la señalización cascada abajo de FGFR4 y/o FGF19 (que incluyen, sin limitación, la fosforilación de FRS2, fosforilación de ERK1/2 y activación del mecanismo de Wnt), y/o inducción de cualquier mecanismo biológico de FGF19 y/o FGFR4 biológicamente relevante, y/o inducción de un tumor, trastorno proliferativo celular o un cáncer; y/o inducción de un trastorno asociado con la expresión y/o actividad de FGF19 (tal como una expresión y/o actividad de FGF19 incrementadas). Los antagonistas de FGF19 incluyen anticuerpos y fragmentos de los mismos de unión a antígeno, proteínas, péptidos, glicoproteínas, glicopéptidos, glicolípidos, polisacáridos, oligosacáridos, ácidos nucleicos, moléculas bioorgánicas, peptidomiméticos, agentes farmacológicos y sus metabolitos, secuencias de control de la transcripción y traducción, y similares. Los antagonistas también incluyen inhibidores de molécula pequeña de una proteína, y proteínas de fusión, moléculas receptoras y derivados que se unen específicamente a proteína, secuestrando así su unión a su diana, variantes de antagonista de la proteína, moléculas de ARNsi dirigidas a una proteína, moléculas antisentido dirigidas a una proteína, aptámeros de ARN, y ribozimas contra una proteína. En algunas realizaciones, el antagonista de FGF19 es una molécula que se une a FGF19 y neutraliza, bloquea, inhibe, anula, reduce o interfiere con una actividad biológica de FGF19.

[0137] Los antagonistas de FGF 19 son conocidos en la técnica. Una lista de ejemplo no limitante de los antagonistas de FGF19 (tal como un anticuerpo contra FGFR) contemplados se proporciona aquí en "Definiciones". Los métodos para caracterizar los antagonistas de FGFR son conocidos en la técnica y algunos se describen y ejemplifican aquí.

Anticuerpos

[0138] Los anticuerpos son preferiblemente anticuerpos monoclonales, aunque los anticuerpos policlonales también pueden ser útiles y se ejemplifican aquí. También se comprenden en el alcance de la invención los fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH y F(ab')₂ de los anticuerpos proporcionados aquí. Estos fragmentos de anticuerpos se pueden crear mediante medios tradicionales, tales como digestión enzimática o se pueden generar mediante técnicas recombinantes. Dichos fragmentos de anticuerpos pueden ser quiméricos o humanizados. Estos fragmentos son útiles para fines de diagnóstico y terapéutico establecidos a continuación. Los anticuerpos contra KL β son conocidos en la técnica, por ejemplo, anticuerpos descritos en Ito et al (2005) J Clin Invest 115(8): 2202-2208; R&D Systems

Catalog No. MAB3738. Los anticuerpos contra FGF19 se describen en, por ejemplo, WO2007/13693. El anticuerpo contra FGF19 puede ser un anticuerpo que comprende (a) una cadena ligera que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia KASQDINSFLA (SEQ ID NO:53); (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia RANRLVS (SEQ ID NO:54); y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia LQYDEFPLT (SEQ ID NO:55); y (b) una cadena pesada que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia GFSLTYYGVH (SEQ ID NO:56); (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia GVIWPGGGTDYNAAFIS (SEQ ID NO:57); y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia VRKEYANLYA (SEQ ID NO:58).

[0139] Los anticuerpos monoclonales se obtienen de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos a excepción de posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en menores cantidades. De este modo, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo de no ser una mezcla de anticuerpos discretos.

[0140] Los anticuerpos monoclonales se pueden producir utilizando el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., *Nature* 256:495 (1975) o se pueden producir mediante métodos de ADN recombinante (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567).

[0141] En el método de hibridoma, se inmuniza un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster, para obtener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Los anticuerpos para una diana determinada se desarrollan en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del inmunógeno diana y un adyuvante. El polipéptido diana se puede preparar utilizando métodos conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen en detalle en el presente documento. Por ejemplo, a continuación se describe la producción recombinante de proteína. En una realización, los animales se inmunizan con un derivado de antígeno que contiene el dominio extracelular (ECD) de la diana fusionado a la parte Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina. En una realización, los animales se inmunizan con una proteína de fusión polipéptido diana-IgG1. Los animales normalmente se inmunizan contra derivados o conjugados inmunogénicos de polipéptido diana con monofosforil lípido A (MPL)/dicrinomicolato de trehalosa (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT), y la solución se inyecta intradérmicamente en múltiples sitios. Dos semanas más tarde se refuerzan los animales. De siete a catorce días más tarde sangran los animales, y se analiza el suero por el título de anti-antígeno. Los animales se refuerzan hasta un nivel estable de título.

[0142] Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. A continuación, se fusionan los linfocitos con células de mieloma utilizando 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)).

[0143] Las células de hibridoma preparadas de esta manera se siembran y se desarrollan en un medio de cultivo adecuado que preferiblemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá habitualmente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), cuyas sustancias evitan el crecimiento de células deficientes de HGPRT.

[0144] Las células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan de manera eficaz, contribuyen a una producción estable a un nivel elevado de anticuerpo por las células seleccionadas productoras de los anticuerpos, y son sensibles a un medio, tal como un medio HAT. Entre éstas, las líneas celulares de mieloma preferidas son las líneas de mieloma murinas, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, y las células SP-2 o X63-Ag8-653, disponibles en la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, Estados Unidos. También se han descrito líneas de células de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. *Immunol.* 133: 3001 (1984); y Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, páginas 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

[0145] Se analiza el medio de cultivo en el que crecen las células de hibridoma para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina mediante la inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA).

[0146] La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, mediante análisis Scatchard descrito en Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

[0147] Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y se pueden desarrollar mediante métodos estándar (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, páginas 59-103 (Academia Press, 1986)). Entre los medios de cultivo adecuados para este objetivo se incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o medio RPM1-1640. Además, las células de hibridoma se pueden desarrollar *in vivo* como tumores

ascíticos en un animal.

[0148] Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan de forma adecuada del medio de cultivo, fluido ascítico, o suero mediante procedimientos de purificación convencionales de inmunoglobulinas, tales como, por ejemplo, proteína A-Sefarosa, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía de afinidad.

[0149] Los anticuerpos se pueden producir mediante la utilización de bibliotecas combinatorias para cribar clones de anticuerpos sintéticos con la actividad o actividades deseadas. En principio, los clones de anticuerpos sintéticos se seleccionan mediante el cribado de bibliotecas de fagos que contienen el fago que expresa varios fragmentos de la región variable de anticuerpo (Fv) fusionados a la proteína de recubrimiento del fago. Dichas bibliotecas de fagos se criban mediante cromatografía de afinidad contra el antígeno deseado. Los clones que expresan los fragmentos Fv capaces de unirse al antígeno deseado se adsorben al antígeno y, de este modo, se separan de los clones que no se unen en la biblioteca. Los clones que se unen se eluyen a continuación del antígeno y se pueden enriquecer posteriormente mediante ciclos adicionales de adsorción/elución de antígenos. Cualquiera de los anticuerpos deseados se puede obtener mediante el diseño de un procedimiento de cribado de antígenos adecuado para seleccionar el clon de fago de interés seguido de la construcción de un clon de anticuerpo de longitud completa utilizando las secuencias de Fv del clon de fago de interés y secuencias de la región constante (Fc) adecuadas descritas en Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3.

[0150] El dominio de unión al antígeno de un anticuerpo está formado de dos regiones variables (V) de aproximadamente 110 aminoácidos, una de la cadena ligera (VL) y otra de la pesada (VH), que presentan ambas tres bucles hipervariables (HVR) o regiones determinantes de complementariedad (CDR). Los dominios variables pueden expresarse funcionalmente en los fagos, como fragmentos de una sola cadena Fv (scFv), en los que VH y VL están unidas covalentemente a través de un péptido corto y flexible, o como fragmentos Fab, en los que cada uno está fusionado con un dominio constante e interaccionan de forma no covalente, tal como se describe en Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12:433-455 (1994). Tal como se utiliza aquí, los clones de fagos que codifican scFv y los clones de fagos que codifican Fab se refieren colectivamente como "clones de fagos de Fv" o "clones de Fab".

[0151] Los repertorios de genes de VH y VL pueden clonarse separadamente mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y recombinarse aleatoriamente en bibliotecas de fagos, y a continuación se puede realizar la búsqueda de clones de unión al antígeno tal como se describió por Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12:433-455 (1994). Las bibliotecas de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad para el inmunógeno sin la necesidad de construir hibridomas. Alternativamente, el repertorio sin tratar puede clonarse para proporcionar una fuente única de anticuerpos humanos en un intervalo amplio de antígenos no propios y también de propios sin ninguna inmunización tal como se describió por Griffiths et al., *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993). Finalmente, las bibliotecas sin tratar también se pueden fabricar sintéticamente mediante la clonación de los segmentos del gen V no reordenados de células madre, y utilizando cebadores de PCR que contienen una secuencia aleatoria para codificar las regiones CDR3 altamente variables y realizar el reordenamiento *in vitro* tal como se describe por Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381-388 (1992).

[0152] El fago filamentoso se utiliza para expresar fragmentos de anticuerpos mediante fusión con la proteína de recubrimiento menor pIII. Los fragmentos de anticuerpo pueden expresarse como fragmentos Fv de una sola cadena, en los que los dominios VH y VL están conectados en la misma cadena polipeptídica por un espaciador polipeptídico flexible, por ejemplo, tal como se describe por Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991); o como fragmentos Fab, en los que se fusiona una cadena a pIII y la otra se secreta en el periplasma de la célula huésped bacteriana, donde el ensamblamiento de una estructura Fab-proteína de recubrimiento se expresa en la superficie del fago desplazando algunas de las proteínas de recubrimiento de tipo salvaje, por ejemplo, tal como se describe en Hoogenboom et al., *Nucl. Acids. Res.*, 19:4133-4137 (1991).

[0153] En general, los ácidos nucleicos que codifican fragmentos de genes de anticuerpo se obtiene de células inmunes recogidas de humanos o animales. Si se desea una biblioteca predispuesta a favor de clones anti-antígeno, el sujeto se inmuniza con polipéptido antígeno para generar una respuesta de anticuerpo, y se recuperan células de bazo y/o células B circulantes diferentes de linfocitos de sangre periférica (PBL) para la construcción de la biblioteca. En una realización preferida, se obtiene una biblioteca de fragmentos de genes de anticuerpos humanos predispuesta a favor de clones anti-humanos mediante la generación de una respuesta de anticuerpo anti-humano en ratones transgénicos que portan un grupo de genes de inmunoglobulina humana funcional (y que carecen de un sistema de producción de anticuerpos endógenos funcionales), de manera que la inmunización produce células B que producen anticuerpos humanos contra antígeno. La generación de ratones transgénicos que producen anticuerpos humanos se describe a continuación.

[0154] El enriquecimiento adicional para poblaciones de células reactivas anti-antígeno se puede obtener utilizando un procedimiento de cribado adecuado para aislar células B que expresan un anticuerpo unido a membrana específico de antígeno, por ejemplo, mediante separación celular utilizando cromatografía de afinidad de antígeno o adsorción de células a antígeno marcado con fluorocromo seguido de la clasificación celular activada por flujo

(FACS).

[0155] Alternativamente, la utilización de células del bazo y/o células B u otros PBLs de un donante no inmunizado proporciona una mejor representación del repertorio de anticuerpos posibles y también permite la construcción de una biblioteca de anticuerpos utilizando cualquier especie animal (humana o no humana) en que el antígeno no es antigénico. Para las bibliotecas que incorporan una construcción de genes de anticuerpos *in vitro*, se recogen las células madre del individuo para proporcionar ácidos nucleicos que codifican segmentos de genes de anticuerpos no reordenados. Las células inmunes de interés pueden obtenerse de diversas especies animales, como humano, ratón, rata, lagomorfos, luprinos, canino, felino, porcino, bovino, equino y especies aviares, etc.

[0156] El ácido nucleico que codifica segmentos de genes variables de anticuerpos (incluyendo segmentos VH y VL) se recupera de las células de interés y se amplifica. En el caso de bibliotecas de genes VH y VL reordenados, el ADN deseado puede obtenerse mediante aislamiento de ADN genómico o del ARNm de linfocitos seguido de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores que se hibridan con los extremos 5' y 3' de los genes VH y VL reordenados, tal como se describe en Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86:3833-3837 (1989), produciendo así repertorios de genes V diversos para la expresión. Los genes V pueden amplificarse a partir del ADNc y de ADN genómico, con cebadores de sentido 3' de transcripción en el extremo 5' del exón codificante del dominio V maduro y cebadores de sentido 5' de transcripción basados en el segmento J, tal como se describe en Orlandi et al., *supra* y en Ward et al., Nature, 341:544-546 (1989). Sin embargo, para amplificar a partir del ADNc, los cebadores de sentido 3' de transcripción también pueden basarse en el exón líder tal como se describe en Jones et al., Biotechnol. 9:88-89 (1991), y los cebadores de sentido 5' de transcripción en la región constante tal como se describe en Sastry et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86:5728-5732 (1989). Para maximizar la complementariedad, se puede incorporar degeneración en los cebadores tal como se describe en Orlandi et al., (1989), o Sastry et al., (1989). Preferiblemente, se maximiza la diversidad de bibliotecas mediante la utilización de cebadores de PCR dirigidos a cada familia de genes V con el fin de amplificar todos los reordenamientos de VH y VL presentes en la muestra de ácido nucleico de células inmunes, por ejemplo, tal como se describe en el procedimiento de Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991), o como se describe en el procedimiento de Orum et al., Nucleic Acids Res., 21:4491-4498 (1993). Para la clonación del ADN amplificado en vectores de expresión, se pueden introducir dianas de restricción raras dentro de los cebadores de PCR como una etiqueta en un extremo, tal como se describe en Orlandi et al. (1989), o mediante amplificación por PCR posterior con un cebador etiquetado tal como se describe en Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991).

[0157] Los repertorios de genes V reordenados sintéticamente pueden derivarse *in vitro* de segmentos de genes V. La mayoría de segmentos de genes-VH humanos se han clonado y secuenciado (publicado por Tomlinson et al., J.Mol. Biol., 227:776-798 (1992)) y se han localizado (publicado en Matsuda et al., Nature Genet., 3:88-94 (1993); estos segmentos clonados (incluyendo todas las conformaciones principales del bucle H1 y H2) pueden utilizarse para generar repertorios de genes VH diversos con cebadores de PCR que codifican bucles H3 de secuencias y longitudes varias, tal como se describe en Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227:381-388 (1992). Los repertorios de VH también pueden fabricarse con toda la diversidad de secuencia focalizada en un bucle de H3 largo de una longitud única, tal como se describe en Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4457-4461 (1992). También se han clonado y secuenciado segmentos V_{κ} y V_{λ} humanos (publicado por Williams y Winter, Eur. J. Immunol., 23:1456-1461 (1993)) y se pueden utilizar para fabricar repertorios de cadena ligera sintéticos. Los repertorios de genes V sintéticos, basados en un grupo de pliegues de VH y VL, y de longitudes L3 y H3, codificarán anticuerpos de diversidad estructural considerable. Después de la amplificación de los ADNs que codifican genes V, se pueden reordenar segmentos de genes V de la línea germinal *in vitro* de acuerdo con los procedimientos de Hoogenboom y winter, J. Mol. Biol., 227:381-388 (1992).

[0158] Los repertorios de fragmentos de anticuerpo pueden construirse combinando repertorios de genes VH y VL juntos de muy diversas maneras. Cada repertorio puede crearse en vectores distintos, y los vectores pueden combinarse *in vitro*, por ejemplo, tal como se describe en Hogrefe et al., Gene, 128:119-126 (1993), o *in vivo* mediante infección combinatoria, por ejemplo, el sistema loxP descrito en Waterhouse et al., Nucl. Acids. Res., 21:2265-2266 (1993). La estrategia de recombinación *in vivo* explota la naturaleza de dos cadenas de fragmentos Fab para superar el límite del tamaño de la biblioteca impuesto por la eficiencia de transformación en *E. coli*. Los repertorios de VH y VL sin tratar se clonan separadamente, uno en un fagémido y el otro en un vector de fagos. Las dos bibliotecas se combinan entonces mediante infección fágica de las bacterias que contienen el fagémido, de modo que cada célula contiene una combinación distinta y el tamaño de la biblioteca se limita únicamente por el número de células presentes (aproximadamente 10^{12} clones). Ambos vectores contienen señales de recombinación *in vivo*, de modo que los genes de VH y VL se recombinan en un único replicón y se co-empaquetan en viriones de fagos. Estas enormes bibliotecas proporcionan un gran número de anticuerpos diversos de buena afinidad (K_d^{-1} de aproximadamente 10^{-8} M).

[0159] Alternativamente, los repertorios pueden clonarse secuencialmente en el mismo vector, por ejemplo, tal como se describe en Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:7978-7982 (1991), o ensamblarse juntos mediante PCR y luego clonarse, tal como se describe en Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991). El ensamblaje por PCR puede también utilizarse para unir ADNs de VH y VL con el ADN que codifica un espaciador peptídico flexible para formar repertorios de Fv de una sola cadena (scFv). En otra técnica, "el ensamblamiento por PCR en la célula" se

utiliza para combinar los genes de VH y VL en los linfocitos mediante PCR y luego clonar los genes unidos, tal como se describe en Embleton et al., Nucl. Acids. Res. 20:3831-3837 (1992).

[0160] Los anticuerpos producidos por bibliotecas sin tratar (naturales o sintéticas) pueden tener una afinidad moderada (kd^{-1} de aproximadamente 10^6 a 10^7M^{-1}), pero la maduración para afinidad puede también ser simulada *in vitro* mediante la construcción y reselección a partir de bibliotecas secundarias, tal como se describe en Winter et al., (1994), *supra*. Por ejemplo, la mutación puede introducirse aleatoriamente *in vitro* utilizando una polimerasa propensa a errores (publicada en Leung et al., Technique, 1:11-15 (1989)) en el procedimiento de Hawkins et al., J. Mol. Biol., 226:889-896 (1992) o en el procedimiento de Gram et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:3576-3580 (1992). Adicionalmente, la maduración para afinidad puede realizarse mutando aleatoriamente una o más CDRs, por ejemplo, utilizando la PCR con cebadores que contienen una secuencia aleatoria que comprende la CDR de interés, en clones Fv individuales seleccionados y el posterior cribado de clones de mayor afinidad. La WO 96/07754 (publicada el 14 de marzo de 1996) describe un procedimiento para inducir la mutagénesis en una región determinante de la complementariedad de una cadena ligera de inmunoglobulina para crear una biblioteca de genes de cadena ligera. Otra estrategia efectiva es recombinar los dominios VH y VL seleccionados mediante expresión en fagos con repertorios de variantes de dominios V naturales obtenidos de donantes no inmunizados y el cribado de una mayor afinidad en diversas rondas de rebarajado de cadenas, tal como se describe en Marks col., Biotechnol., 10:779-783 (1992). Esta técnica permite la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos con afinidades en el intervalo de 10^9M .

[0161] La secuencia de ácido nucleico que codifica un antígeno se puede diseñar utilizando la secuencia de aminoácidos de la región de antígeno deseada. Alternativamente, se puede utilizar la secuencia de ADNc (o fragmentos de la misma). Los ADN que codifican el antígeno se pueden preparar mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero sin limitación, la síntesis química mediante cualquier método descrito en Engels et al., Agnew. Chem. Int. Ed. Engl., 28: 716-734 (1989), tal como métodos de triéster, fosfito, fosforamida y H-fosfonato. En una realización, los codones preferidos por la célula huésped de expresión se utilizan en el diseño del ADN. Alternativamente, el ADN que codifica el antígeno se puede aislar de una biblioteca genómica o de ADNc.

[0162] Después de la construcción de la molécula de ADN que codifica el antígeno, la molécula de ADN está unida operativamente a una secuencia de control de la expresión en un vector de expresión, tal como un plásmido, donde la secuencia de control es reconocida por una célula huésped transformada con el vector. En general, los vectores plasmídicos contienen secuencias de replicación y control que derivan de especies compatibles con la célula huésped. El vector normalmente porta un sitio de replicación, así como secuencias que codifican proteínas que son capaces de proporcionar la selección fenotípica en células transformadas. Los vectores adecuados para la expresión en células huésped procariotas y eucariotas son conocidos en la técnica y algunos se describen adicionalmente en el presente documento. Se pueden utilizar organismos eucariotas, tales como levaduras, o células derivadas de organismos multicelulares, tales como mamíferos.

[0163] Opcionalmente, el ADN que codifica el antígeno está unido operativamente a una secuencia líder secretora resultante de la secreción del producto de expresión por la célula huésped en el medio de cultivo. Ejemplos de secuencias líder secretoras incluyen stII, ecotin, lamB, herpes GD, lpp, fosfatasa alcalina, invertasa, y factor alfa. También son adecuadas para utilizar aquí la secuencia líder de proteína A de 36 aminoácidos (Abrahmsen et al., EMBO J., 4: 3901 (1985)).

[0164] Las células huésped se transfectan y preferiblemente se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente de la presente invención y se cultivan en medios con nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

[0165] La transfección se refiere a la captación de un vector de expresión por una célula huésped, aunque se expresen o no secuencias codificantes. Los expertos en la técnica conocen numerosos métodos de transfección, por ejemplo, precipitación con CaPO_4 y electroporación. La transfección satisfactoria se reconoce en general cuando tiene lugar cualquier indicación de la operación de este vector en la célula huésped. Los métodos para la transfección son conocidos en la técnica y algunos se describen adicionalmente aquí.

[0166] La transformación significa la introducción de ADN en un organismo de manera que el ADN es replicable, ya sea como elemento extracromosómico o mediante un integrante cromosómico. Dependiendo de la célula huésped utilizada, la transformación se realiza utilizando técnicas estándar apropiadas para dichas células. Los métodos para la transformación son conocidos en la técnica y algunos se describen adicionalmente aquí.

[0167] Las células huésped procariotas para producir antígeno se pueden cultivar tal como se describe en general en Sambrook et al., *supra*.

[0168] Las células huésped de mamífero utilizadas para producir un antígeno se pueden cultivar en una variedad de medios, que son conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen aquí.

[0169] Las células huésped referidas en esta memoria comprenden células en cultivo in vitro, así como células que están en un animal huésped.

5 [0170] La purificación del antígeno se puede realizar utilizando métodos conocidos en la técnica.

[0171] El antígeno purificado se puede unir a una matriz adecuada, tal como partículas de agarosa, partículas de acrilamida, partículas de vidrio, celulosa, varios copolímeros acrílicos, geles de hidroxil metacrilato, copolímeros poliacrílicos y polimetacrílicos, nylon, portadores neutros e iónicos, y similares, para utilizar en la separación por cromatografía de afinidad de clones de expresión en fagos. La unión de la proteína a la matriz se puede realizar mediante los métodos descritos en *Methods in Enzymology*, vol. 44 (1976). Una técnica utilizada habitualmente para unir ligandos de proteína a matrices de polisacárido, por ejemplo, agarosa, dextrano o celulosa, implica la activación del portador con haluros de cianógeno y el posterior acoplamiento de las aminas alifáticas o aromáticas primarias del ligando de péptido a la matriz activada.

[0172] Alternativamente, se puede utilizar el antígeno para recubrir los pocillos de las placas de adsorción, expresarse en células huésped fijadas a placas de adsorción o utilizarse en la clasificación celular, o conjugarse a biotina para capturar con partículas recubiertas de estreptavidina o utilizarse en cualquier otro método conocido en la técnica para cribar bibliotecas de expresión en fagos.

[0173] Las muestras de bibliotecas de fagos se ponen en contacto con antígeno inmovilizado bajo condiciones adecuadas para unirse a por lo menos una parte de las partículas de fago con el adsorbente. Normalmente, las condiciones, incluyendo el pH, la fuerza iónica, la temperatura y similares se seleccionan para mimetizar las condiciones fisiológicas. Los fagos unidos a la fase sólida se lavan y a continuación se eluyen mediante ácido, por ejemplo, tal como se describe en Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7978-7982 (1991), o mediante álcali, por ejemplo tal como se describe en Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), o mediante competición con antígeno de KL β , por ejemplo en un procedimiento similar al método de competición de antígenos de Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991). Los fagos se pueden enriquecer 20-1000 veces en una única ronda de selección. Además, los fagos enriquecidos se pueden desarrollar en cultivos bacterianos y someterse a rondas posteriores de selección.

[0174] La eficacia de la selección depende de muchos factores, incluyendo la cinética de disociación durante el lavado, y si los múltiples fragmentos de anticuerpos en un único fago pueden estar captados simultáneamente por el antígeno. Los anticuerpos con cinética de disociación rápida (y afinidades de unión débil) se pueden mantener mediante la utilización de lavados cortos, expresión en fagos multivalentes y densidad de recubrimiento elevada del antígeno en fase sólida. La densidad elevada no sólo estabiliza el fago a través de interacciones multivalentes, sino que favorece la unión de nuevo del fago que se ha disociado. La selección de anticuerpos con una cinética de disociación lenta (y buenas afinidades de unión) se puede inducir mediante la utilización de lavados largos y la expresión en fagos monovalentes tal como se describe en Bass et al., *Proteins*, 8: 309-314 (1990) y en WO 92/09690, y una densidad de recubrimiento baja de antígeno tal como se describe en Marks et al., *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992).

[0175] Es posible seleccionar entre anticuerpos de fagos de diferentes afinidades, incluso con afinidades que difieren ligeramente, para antígeno. Sin embargo, es probable que la mutación aleatoria de un anticuerpo seleccionado (por ejemplo, realizada en algunas técnicas de maduración para afinidad descritas anteriormente) produzca muchos mutantes, la mayoría se unen al antígeno y unos pocos con mayor afinidad. Con un antígeno limitante, se podría descartar fagos raros de afinidad elevada. Para mantener todos los mutantes de mayor afinidad, los fagos se pueden incubar con un exceso de antígeno biotinilado, pero con el antígeno biotinilado a una concentración de molaridad inferior a la constante de afinidad molar de la diana para el antígeno. Los fagos de unión de afinidad elevada se pueden capturar a continuación mediante partículas paramagnéticas recubiertas por estreptavidina. Dicha "captura en equilibrio" permite que los anticuerpos se seleccionen según sus afinidades de unión, con una sensibilidad que permite el aislamiento de clones mutantes con una afinidad más elevada de como mínimo dos veces a partir de un gran exceso de fagos con una afinidad inferior. Las condiciones utilizadas en fagos de lavado unidos a una fase sólida también se pueden manipular para discriminar en base a la cinética de disociación. Los clones antiantígeno también se pueden seleccionar por la actividad.

[0176] El ADN que codifica anticuerpos monoclonales derivados de hibridoma o los clones de Fv que se expresan en fago se aísla fácilmente y se secuencian utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando cebadores oligonucleotídicos diseñados para amplificar específicamente las regiones que codifican las cadenas ligera y pesada de interés de hibridoma o plantilla de ADN de fago). Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que a continuación se transfectan en células huésped como por ejemplo *E. coli*, células COS de mono, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que de otra manera no producirían proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales deseados en las células huésped recombinantes. Los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias del ADN codificante del anticuerpo incluyen Skerra y col., *Curr. Opin. Immunol.*, 5:256-262 (1993) y Plückthum, *Immunol. Revs.* 130:151-188 (1992).

[0177] El ADN que codifica los clones de Fv se pueden combinar con secuencias de ADN conocidas que codifican las regiones constante de cadena pesada y/o cadena ligera (por ejemplo, se pueden obtener secuencias de ADN apropiadas de Kabat et al., supra) para formar clones que codifican cadenas pesada y/o ligera de longitud completa o parcial. Se entenderá que para este objetivo se pueden utilizar las regiones constantes de cualquier isotipo, incluyendo regiones constantes de IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE, y que dichas regiones constantes se pueden obtener de cualquier especie humana o animal. Un clon de Fv derivado del ADN de dominio variable de una especie animal (tal como humano) y a continuación fusionado a ADN de región constante de otra especie animal para formar una secuencia o secuencias codificantes para cadena pesada y/o cadena ligera "híbridas" de longitud completa se incluye en la definición de anticuerpo "quimérico" e "híbrido" tal como se utiliza aquí. En una realización preferida, un clon de Fv derivado de ADN variable humano se fusiona a ADN de región constante humana para formar la secuencia o secuencias codificantes para las cadenas pesada y/o ligera humana de longitud completa o parcial.

[0178] El ADN que codifica el anticuerpo anti-antígeno derivado de un hibridoma también se puede modificar, por ejemplo, mediante la sustitución de la secuencia codificante para dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos en lugar de secuencias murinas homólogas derivadas del clon de hibridoma (por ejemplo, como en el método de Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)). El ADN que codifica un anticuerpo o fragmento derivado de hibridoma o clon de Fv se pueden modificar adicionalmente mediante la unión covalente a la secuencia codificante de inmunoglobulina de toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido que no era inmunoglobulina. De esta manera, se preparan anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tienen la especificidad de unión del clon de Fv o anticuerpos derivados del clones de hibridoma.

Fragmentos de anticuerpos

[0179] La presente invención comprende fragmentos de anticuerpos. En ciertas circunstancias, existen ventajas en la utilización de fragmentos de anticuerpos, en lugar de los anticuerpos completos. El menor tamaño de los fragmentos permite una depuración rápida y puede conducir a un mejor acceso a los tumores sólidos.

[0180] Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Habitualmente, estos fragmentos se derivaban mediante la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) y Brennan et al., *Science* 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos se pueden producir actualmente directamente mediante células huésped recombinantes. Los fragmentos de anticuerpos Fab, Fv y ScFv se pueden todos expresar en y secretarse de *E. Coli*, permitiendo así la producción simple de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpos se pueden aislar a partir de las bibliotecas de anticuerpos en fagos descritas anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E coli* y pueden acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). Según otra estrategia, los fragmentos F(Ab')₂ se pueden aislar directamente del cultivo de células huésped recombinantes. Los fragmentos Fab y F(ab')₂ con una mayor vida media in vivo que comprenden residuos de epítipo de unión a receptor salvaje se describen en la Patente de Estados Unidos No. 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el técnico de la materia. En otras realizaciones, un anticuerpo es un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv). Véase WO 93/16185; Patente de Estados Unidos No. 5.571.894; y Patente de Estados Unidos No. 5.587.458. Fv y sFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos carentes de regiones constantes; de este modo, son adecuadas para una unión no específica reducida durante el uso in vivo. Las proteínas de fusión con sFv se pueden construir para producir la fusión de una proteína efectora en el extremo amino o carboxi de un sFv. Véase, Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, supra. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, tal como se describe en la Patente de Estados Unidos No. 5.641.870, por ejemplo. Dichos fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

Anticuerpos humanizados

[0181] La presente invención comprende anticuerpos humanizados. Se conocen en la técnica varios métodos para humanizar anticuerpos no humanos. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado puede tener uno o más residuos de aminoácidos introducidos en el mismo a partir de una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan frecuentemente como residuos "importados", que habitualmente se obtienen de un dominio variable "importado". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeven et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988)), mediante la sustitución de secuencias de la región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son habitualmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de la región hipervariable y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

[0182] La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para utilizar en la fabricación de los

anticuerpos humanizados puede ser importante para reducir la antigenicidad. Según el método denominado “mejor-ajuste”, la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba frente a toda la biblioteca de secuencias de dominios variables humanos conocidos. A continuación, la secuencia humana que está más próxima a la del roedor se acepta como armazón (“framework”) humano para el anticuerpo humanizado (Sims et al., *J. Immunol.*, 151: 2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196: 901 (1987)). Otro método utiliza un armazón particular derivado de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. El mismo armazón se puede utilizar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 89: 4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993)).

[0183] Es también deseable en general que los anticuerpos se humanicen manteniendo una afinidad elevada por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, según un método, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios productos conceptuales humanizados utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas están disponibles normalmente y son familiares para los expertos en la materia. Existen programas informáticos que muestran y visualizan probables estructuras de conformaciones tridimensionales de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La observación de estas visualizaciones permite el análisis de la probable función de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos de FR se pueden seleccionar y combinar a partir del receptor y secuencias importadas, de manera que se consigue la característica de anticuerpo deseada, tal como una mayor afinidad para el antígeno o antígenos diana. En general, los residuos de la región hipervariable están directamente y más sustancialmente implicados en la influencia sobre la unión al antígeno.

Anticuerpos humanos

[0184] Los anticuerpos humanos contra KL β se pueden construir mediante la combinación de la secuencia o secuencias del dominio variable del clon de Fv seleccionadas de las bibliotecas de expresión en fagos derivadas de humanos con una secuencia o secuencias de dominio constante humano tal como se ha descrito anteriormente. Alternativamente, los anticuerpos monoclonales humanos contra KL β de la presente invención se pueden fabricar mediante el método del hibridoma. Se han descrito líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales, por ejemplo, por Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); y Boerner et al., *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).

[0185] Ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo ratones) que son capaces, tras inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigótica del gen de la región de unión (J_H) de la cadena pesada del anticuerpo en ratones mutantes quiméricos y en la línea germinal da lugar a la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia del grupo de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana en dichos ratones mutantes en la línea germinal dará lugar a la producción de anticuerpos humanos tras la estimulación con antígenos. Ver, por ejemplo Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 2551-255 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362: 255 (1993); Bruggermann et al., *Year in Immunol.*, 7: 33 (1993).

[0186] También se puede utilizar el barajado (“shuffling”) génico para derivar anticuerpos humanos a partir de no humanos, por ejemplo, anticuerpos de roedores, donde el anticuerpo humano tiene las mismas afinidades y especificidades con el anticuerpo no humano de partida. Según este método, que también se denomina “impresión de epítomos”, la región variable de cadena pesada o ligera de un fragmento de anticuerpo no humano obtenido por técnicas de expresión en fagos tal como se describe aquí se sustituye por un repertorio de genes de dominios V humanos, creando una población de quimeras de scFc o Fab de cadena no humana/cadena humana. La selección con antígenos da lugar al aislamiento de un scFv o Fab quimérico de cadena no humana/cadena humana, donde la cadena humana restaura el sitio de unión a antígeno destruido tras la eliminación de la correspondiente cadena no humana en el clon primario de expresión en fagos, es decir, el epítomo gobierna (imprime) la elección del compañero de la cadena humana. Cuando el proceso se repite para sustituir la cadena no humana restante, se obtiene un anticuerpo (véase la PCT WO 93/06213 publicada el 1 de abril de 1993). A diferencia de la humanización tradicional de anticuerpos no humanos mediante injertos de CDR, la técnica proporciona anticuerpos completamente humanos que no tienen residuos de FR o CDR de origen no humano.

Anticuerpos biespecíficos

[0187] Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferiblemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión con por lo menos dos antígenos diferentes. En una realización, una de las especificidades de unión es por KL β y la otra por cualquier otro antígeno. Los anticuerpos biespecíficos de ejemplo también se pueden unir a dos epítomos diferentes de la proteína KL β . Los anticuerpos biespecíficos también se pueden utilizar para localizar agentes citotóxicos en células que expresan KL β . Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a KL β y un brazo que se une al agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti-interferón- α , alcaloide vinca, cadena A de ricina, metotrexato o hapteno con isótopo radioactivo). Los anticuerpos biespecíficos se pueden

preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos $F(ab')_2$).

[0188] Los procedimientos para fabricar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. Habitualmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Milstein et al., *Nature*, 305:537-539 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpos diferentes, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se realiza habitualmente mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante incómoda y los rendimientos de producto son bajos. En WO 93/08829 publicada el 13 de mayo de 1993 y en Traunecker et al., *EMBO J.*, 10:3655 (1991) se describen procesos similares.

[0189] Según una estrategia diferente y más preferida, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan a secuencias del dominio constante de inmunoglobulina. La fusión se produce preferiblemente con un dominio constante de cadena pesada de la inmunoglobulina, que comprende por lo menos parte de las regiones bisagra, CH_2 y CH_3 . Se prefiere que la primera región constante de cadena pesada (CH_1) que contiene el sitio necesario para la unión a cadena ligera esté presente en por lo menos una de las fusiones. Los ADNs que codifican las fusiones de la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en una célula huésped adecuada. Esto proporciona una mayor flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones cuando las proporciones desiguales de las tres cadenas de polipéptido utilizadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes de dos o las tres cadenas de polipéptido en un único vector de expresión cuando la expresión de por lo menos dos cadenas de polipéptido en proporciones iguales da lugar a rendimientos elevados o cuando las proporciones no tienen un efecto significativo.

[0190] En una realización preferida de esta estrategia, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y una pareja de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se observó que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadenas de inmunoglobulinas no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una manera sencilla de separación. Esta estrategia se describe en WO 94/04690. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121:210 (1986).

[0191] Según otra estrategia, se puede diseñar la interfase entre una pareja de moléculas de anticuerpos para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan de cultivos de células recombinantes. La interfase preferida comprende por lo menos una parte del dominio CH_3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales pequeñas de aminoácidos de la interfase de la primera molécula de anticuerpo se sustituyen por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena o cadenas laterales grandes en la interfase de la segunda molécula de anticuerpo mediante la sustitución de cadenas laterales grandes de aminoácidos por más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados, tales como homodímeros.

[0192] Entre los anticuerpos biespecíficos se incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado se puede acoplar a avidina, y el otro a biotina. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir las células del sistema inmune a células no deseadas (Patente de Estados Unidos No. 4.676.980) y para el tratamiento de la infección por VIH (WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados se pueden fabricar utilizando cualquier método de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados son bien conocidos en la técnica y se describen en la Patente de Estados Unidos No. 4.676.980 junto con un grupo de técnicas de reticulación.

[0193] Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también se han descrito en la literatura. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos utilizando enlaces químicos. Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que anticuerpos intactos se descomponen proteolíticamente para generar fragmentos $F(ab')_2$. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiol, arsenito sódico, para estabilizar los ditioles vecinales y evitar la formación de enlaces disulfuro intermoleculares. A continuación, los fragmentos Fab' generados se convierten en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab' -TNB se reconvierte a continuación en Fab' -tiol mediante la reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab' -TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden utilizar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

[0194] El reciente progreso ha facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab' -SH de *E. coli*, que se pueden

acoplar químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby et al., *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico F(ab')₂ completamente humanizada. Cada fragmento de Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a un acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de esta manera era capaz de unirse a células que sobreexpresaban el receptor HER² y células T humanas normales, así como de desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumores de mama humanos.

[0195] Se han descrito también varias técnicas para fabricar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente de cultivos de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucina. Kostelny et al., *J. Immunol.* 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las partes de Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpos se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y, a continuación, se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpos. Este procedimiento también se puede utilizar para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología de "diabody" descrita por Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (V_L) mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando así dos sitios de unión a antígeno. También se ha descrito otra estrategia para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante la utilización de dímeros de Fv de cadena sencilla (sFv). Véase Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

[0196] Se consideran los anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos. Tutt et al., *J. Immunol.* 147:60 (1991).

Anticuerpos multivalentes

[0197] Un anticuerpo multivalente se puede internalizar (y/o catabolizar) más rápido que un anticuerpo bivalente por una célula que expresa un antígeno al que se unen los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos multivalentes (que son diferentes de los de la clase IgM) con tres o más sitios de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que se pueden producir fácilmente mediante expresión recombinante de ácido nucleico que codifica las cadenas polipeptídicas del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígeno. El dominio de dimerización preferido comprende (o consiste en) una región Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión a antígeno amino terminales a la región Fc. El anticuerpo multivalente preferido del presente documento comprende (o consiste en) tres a aproximadamente ocho, pero preferiblemente cuatro, sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente comprende por lo menos una cadena polipeptídica (y preferiblemente dos cadenas polipeptídicas), donde la cadena o cadenas polipeptídicas comprenden dos o más dominios variables. Por ejemplo, la cadena o cadenas polipeptídicas pueden comprender VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc, donde VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena polipeptídica de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o un polipéptido, y n es 0 ó 1. Por ejemplo, la cadena o cadenas polipeptídicas pueden comprender: VH-CH1-enlazador flexible-VH-CH1-cadena de región Fc; o VH-CH1-VH-CH1-cadena de región Fc. El anticuerpo multivalente del presente documento comprende preferiblemente además por lo menos dos (y preferiblemente cuatro) polipéptidos del dominio variable de cadena ligera. El anticuerpo multivalente de la presente invención puede comprender, por ejemplo, de aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptidos del dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos del dominio variable de cadena ligera contemplados aquí comprenden un dominio variable de cadena ligera y, opcionalmente, además, comprenden un dominio CL.

Variantes de anticuerpos

[0198] En algunas realizaciones, se contempla la modificación o modificaciones en la secuencia de aminoácidos de los anticuerpos descritos aquí. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/o otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan mediante la introducción de cambios de nucleótidos apropiados en el ácido nucleico que codifica el anticuerpo, o mediante síntesis peptídica. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, delecciones y/o inserciones y/o sustituciones de residuos en las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Cualquier combinación de delección, inserción y sustitución puede hacer llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Las alteraciones de aminoácidos se pueden introducir en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo sujeto en el momento en que se produce la secuencia.

[0199] Un procedimiento útil para la identificación de ciertos residuos o regiones del anticuerpo que son posiciones preferidas para la mutagénesis se denomina "mutagénesis por rastreo de alanina", tal como se describe por Cunningham y Wells Science, 244: 1081-1085 (1989). Aquí, se identifican un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos cargados, tales como arg, asp, his, lys y glu) y se sustituyen por un aminoácido neutro o cargado

negativamente (preferiblemente, alanina o polialanina) para influir en la interacción de los aminoácidos con el antígeno. Aquellas posiciones de aminoácidos que demuestran una sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan a continuación mediante la introducción de variantes adicionales u otras en los sitios de sustitución. De este modo, mientras que el sitio para la introducción de una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminada, la naturaleza de la mutación *per se* no necesita estar predeterminada. Por ejemplo, para analizar la acción de una mutación en un sitio determinado, se realiza la mutagénesis de rastreo de alanina o aleatorio en el codón o región diana y se criban las inmunoglobulinas expresadas por la actividad deseada.

[0200] Las inserciones en la secuencia de aminoácidos incluyen fusiones amino y/o carboxi terminales que varían de longitud desde un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, así como inserciones intrasecuencias de residuos de aminoácidos individuales o múltiples. Entre los ejemplos de inserciones terminales se incluyen un anticuerpo con un residuo metionilo N terminal. Otras variantes insercionales de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al N o C terminal del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida del anticuerpo en el suero.

[0201] Otro tipo de variante de aminoácido del anticuerpo altera el patrón de glicosilación original del anticuerpo. Dicha alteración incluye eliminar uno o más grupos carbohidrato hallados en el anticuerpo y/o añadir uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo.

[0202] La glicosilación de polipéptidos es habitualmente por unión a N o unión a O. La unión a N se refiere a la unión de un grupo carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del grupo carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. De este modo, la presencia de estas secuencias tripéptido en un polipéptido crea un potencial sitio de glicosilación. La glicosilación por unión a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, más habitualmente serina o treonina, aunque también se pueden utilizar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

[0203] La adición de sitios de glicosilación en el anticuerpo se realiza convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos, de manera que contiene una o más de las secuencias tripéptido descritas anteriormente (para sitios de glicosilación unidos a N). La alteración se puede realizar mediante la adición, o sustitución de uno o más residuos de serina o treonina en la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glicosilación unidos a O).

[0204] Cuando el anticuerpo comprende una región Fc, se puede alterar el carbohidrato unido al mismo. Por ejemplo, los anticuerpos con una estructura de carbohidrato maduro que carecen de mucosa unida a una región Fc del anticuerpo se describen en la solicitud de patente de Estados Unidos No. 2003/0157108 (Presta, L.). Véase también US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Los anticuerpos con una N-acetilglucosamina (GlcNAc) bisectante en el carbohidrato unido a una región Fc del anticuerpos se referencian en WO 2003/011878, Jean-Mairet et al. y la patente de Estados Unidos No. 6,602,684, Umana et al. Los anticuerpos con por lo menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a una región Fc del anticuerpo se describen en WO 1997/30087, Patel et al. Véase, también WO 1998/58964 (Raju, S.) y WO 1999/22764 (Raju, S.) en referencia a anticuerpos con carbohidrato alterado unido a la región Fc de los mismos. Véase también US 2005/0123546 (Umana et al.) sobre las moléculas de unión a antígeno con glicosilación modificada.

[0205] La variante de glicosilación preferida del presente documento comprende una región de Fc, donde una estructura de carbohidrato unida a la región de Fc carece de fucosa. Dichas variantes presentan una función de ADCC mejorada. Opcionalmente, la región Fc comprende además una o más sustituciones de aminoácidos en la misma que mejoran adicionalmente la ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333, y/o 334 de la región de Fc (numeración de residuos según UE). Ejemplos de publicaciones relacionadas con anticuerpos "desfucosilados" o "deficientes en fucosa" incluyen: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Ejemplos de líneas celulares que producen anticuerpos desfucosilados incluyen células CHO LeC13 deficientes en fucosilación de proteínas (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); solicitud de patente de Estados Unidos No 2003/0157108 A1, Presta, L; y WO 2004/056312 A1, Adams et al., especialmente en el ejemplo 11), y líneas celulares *knockout*, tales como el gen de alfa-1,6-fucosiltransferasa, FUT8, células CHO *knockout* (Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)).

[0206] Otro tipo de variante es una variante por sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen por lo menos un residuo de aminoácido en la molécula de anticuerpo sustituida por un residuo diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis sustitucional incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones en la FR. Las sustituciones conservativas se muestran en la Tabla 1 bajo el encabezamiento de "sustituciones preferidas". Si dichas sustituciones dan lugar a un cambio en la actividad biológica, entonces se pueden introducir cambios más sustanciales, denominados "ejemplos de sustituciones", en la Tabla 1 o tal como se describe posteriormente en referencia a clases de aminoácidos, y cribar los productos.

Tabla 1

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

5 **[0207]** Las modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo se realizan mediante la selección de substituciones que difieren significativamente en su efecto de mantener (a) la estructura del esqueleto del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de hélice o lámina, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los residuos naturales se dividen en grupos en base a las propiedades comunes de las cadenas laterales:

10

(1) hidrofóbico: norleucina, met, ala, val, leu, ile;

(2) hidrofílico neutro: cys, ser, thr, asn, gln;

(3) ácido: asp, glu;

(4) básico: his, lys, arg;

15 (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: gly, pro; y

(6) aromáticos: trp, tyr, phe.

[0208] Las substituciones no conservativas comprenderán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase.

20

[0209] Un tipo de variante por substitución implica la substitución de uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, la variante o variantes resultantes seleccionadas para el desarrollo posterior tendrán propiedades biológicas mejoradas en relación al anticuerpo parental del cual se generan. Una manera conveniente para generar dichas variantes por substitución implica la maduración para afinidad utilizando la expresión en fagos. Brevemente, se mutan varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) para generar todas las posibles substituciones de aminoácidos en cada sitio. Los anticuerpos generados de esta manera se expresan a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones al producto del gen III de M13 empaquetada en cada partícula. A continuación, las variantes expresadas en el fago se criban por su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) tal como se describe aquí. Con el fin de identificar los sitios candidatos de la región hipervariable para la modificación, se puede aplicar la mutagénesis por rastreo de alanina para identificar residuos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión a antígeno. Alternativamente, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura del cristal del complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el antígeno. Dichos residuos de contacto y residuos próximos son candidatos para la substitución según las técnicas elaboradas aquí. Una vez se generan dichas variantes, el panel de variantes se somete a cribado tal como se describe aquí y se pueden seleccionar anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos pertinentes para un desarrollo posterior.

25

30

35

40

[0210] Las moléculas de ácido nucleico que codifican las variantes en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan mediante una serie de procedimientos conocidos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, el aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes en las secuencias de aminoácidos naturales) o la preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida de sitio), la mutagénesis de PCR y la mutagénesis de cassette de una variante preparada anteriormente o una versión no variante del anticuerpo.

[0211] Puede ser deseable introducir una o más modificaciones de aminoácidos en una región Fc de anticuerpos de

la invención, generando de este modo una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácido (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos que incluyen la de una cisteína bisagra.

[0212] Según esta descripción y los conocimientos de la técnica, se contempla que, en algunas realizaciones, un anticuerpo utilizado en los métodos de la presente invención puede comprender una o más alteraciones en comparación con el anticuerpo homólogo de tipo salvaje, por ejemplo, en la región Fc. Estos anticuerpos, sin embargo, mantendrían sustancialmente las mismas características requeridas para la utilidad terapéutica en comparación con su homólogo de tipo salvaje. Por ejemplo, se cree que se pueden realizar ciertas alteraciones en la región Fc que daría lugar a una unión C_{1q} y/o Citotoxicidad Dependiente de Complemento (CDC) alteradas (es decir, mejoradas o disminuidas), por ejemplo, tal como se describe en WO99/51642. Véase también Duncan & Winter Nature 322:738-40 (1988); Patente de Estados Unidos No. 5,648,260; Patente de Estados Unidos No. 5,624,821; y WO94/29351 con respecto a otros ejemplos de variantes de la región Fc. WO00/42072 (Presta) y WO 2004/056312 (Lowman) describen variantes de anticuerpos con una unión mejorada o disminuida a FcR. Véase, también, Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001). Los anticuerpos con semividas incrementadas y unión mejorada al receptor de Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) y Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)), se describen en US2005/0014934A1 (Hinton et al.). Estos anticuerpos comprenden una región de Fc con una o más sustituciones en la misma que mejoran la unión de la región de Fc a FcRn. Las variantes de polipéptidos con secuencias de aminoácidos de la región de Fc alteradas y la capacidad de unión a C_{1q} incrementada o disminuida se describen en la patente de Estados Unidos No. 6,194,551B1, WO99/51642. Véase, también, Idusogie et al. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

Derivados de anticuerpos

[0213] Los anticuerpos de la presente invención se pueden modificar adicionalmente para contener grupos no proteínicos que son conocidos en la técnica y fácilmente disponibles. Preferiblemente, los grupos adecuados para la derivatización del anticuerpo son polímeros solubles en agua. Entre los ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua se incluyen, pero sin limitación, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, polivinil alcohol, polivinil pirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhidrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinil pirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxiethylados (por ejemplo, glicerol), polivinil alcohol, y mezclas de los mismos. El polietilenglicol propionaldehído puede presentar ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede tener cualquier peso molecular, y puede ser ramificado o no ramificado. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar, y si se unen más de un polímero, pueden ser las mismas moléculas o diferentes. En general, el número y/o tipo de polímeros utilizados para la derivatización se pueden determinar en base a las consideraciones que incluyen, pero sin limitación, las propiedades particulares o funciones del anticuerpo a mejorar, si el derivado de anticuerpo se utilizará en terapia bajo condiciones definidas, etc.

Vectores, células huésped y métodos recombinantes

[0214] Para la producción recombinante de un anticuerpo, el ácido nucleico que lo codifica se aísla e inserta en un vector replicable para la clonación posterior (amplificación del ADN) o para la expresión. El ADN que codifica el anticuerpo se aísla fácilmente y se secuenciar utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera del anticuerpo). Existen muchos vectores disponibles. La elección del vector depende en parte de la célula huésped a utilizar. En general, las células huésped preferidas son de origen procariota o eucariota (generalmente mamíferos). Se entenderá que se pueden utilizar regiones constantes de cualquier isotipo para este objetivo, incluyendo regiones constantes de IgG, IgM, IgA, IgD e IgE y que dichas regiones constantes se pueden obtener de cualquier especie humana o animal.

a. Generación de anticuerpos utilizando células huésped procariotas:

i. Construcción de vectores

[0215] Las secuencias de polinucleótidos que codifican los componentes polipeptídicos del anticuerpo se pueden obtener utilizando técnicas de recombinación estándar. Las secuencias de polinucleótidos deseadas se pueden aislar y secuenciar de células productoras de anticuerpos, tales como células de hibridoma. Alternativamente, los polinucleótidos se pueden sintetizar utilizando un sintetizador de nucleótidos o técnicas PCR. Una vez obtenidos, las secuencias que codifican los polipéptidos se insertan en un vector recombinante capaz de replicar y expresar polinucleótidos heterólogos en huéspedes procariotas. Existen muchos vectores disponibles y conocidos en la técnica que se pueden utilizar para el objetivo de la presente invención. La selección del vector apropiado dependerá principalmente del tamaño de los ácidos nucleicos a insertar en el vector y de la célula huésped particular a transformar con el vector. Cada vector contiene varios componentes dependiendo de su función (amplificación o expresión de polinucleótidos heterólogo, o ambos) y de su compatibilidad con la célula huésped particular en la que

reside. Los componentes del vector incluyen generalmente, pero sin limitación: un origen de replicación, un gen marcador de selección, un promotor, un sitio de unión a ribosoma (RBS), una secuencia señal, el inserto de ácido nucleico heterólogo y una secuencia de terminación de la transcripción.

[0216] En general, los vectores de plásmidos que contienen replicón y secuencias de control que derivan de especies compatibles con la célula huésped se utilizan en relación con estos huéspedes. El vector transporta normalmente un sitio de replicación, así como secuencias de marcaje que son capaces de proporcionar la selección fenotípica en células transformadas. Por ejemplo, *E. coli* se transforma habitualmente utilizando pBR322, un plásmido derivado de una especie de *E. coli*. pBR322 contiene genes que codifican resistencia a ampicilina (Amp) y tetraciclina (Tet) y, de este modo, proporciona medios para identificar células transformadas. pBR322, sus derivados, o u otros plásmidos microbianos o bacteriófagos también pueden contener, o ser modificados para contener, promotores que se pueden utilizar por el organismo microbiano para la expresión de proteínas endógenas. Ejemplos de derivados de pBR322 utilizados para la expresión de anticuerpos concretos se describen en detalle en Carter et al., Patente de estados Unidos No. 5,648,237.

[0217] Además, los vectores de fagos que contienen replicón y secuencias de control que son compatibles con el microorganismo huésped se pueden utilizar como vectores transformantes en relación con estos huéspedes. Por ejemplo, se puede utilizar un bacteriófago como λ GEM.TM.-11 en la fabricación de un vector recombinante que se puede utilizar para transformar células huéspedes susceptibles, tales como *E. coli* LE392.

[0218] El vector de expresión puede comprender dos o más parejas promotor-cistrón, que codifican cada uno de los componentes polipeptídicos. Un promotor es una secuencia reguladora no traducida localizada en dirección 5' con respecto al cistrón que modula su expresión. Los promotores procariotas se clasifican normalmente en dos clases, inducible y constitutivo. El promotor inducible es un promotor que inicia mayores niveles de transcripción del cistrón bajo su control en respuesta a los cambios en la condición del cultivo, por ejemplo, la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura.

[0219] Se conoce una gran cantidad de promotores reconocidos por una serie de células huésped potenciales. El promotor seleccionado se puede unir operativamente a ADN de cistrón que codifica la cadena ligera o pesada mediante la extracción del promotor del ADN de origen a través de la digestión con enzima de restricción y la inserción de la secuencia del promotor aislada en el vector. Se pueden utilizar tanto la secuencia del promotor nativo como de promotores heterólogos para dirigir la amplificación y/o expresión de los genes diana. En algunas realizaciones, se utilizan promotores heterólogos, ya que permiten en general una mayor transcripción y rendimientos más elevados del gen diana expresado en comparación con el promotor de polipéptido diana nativo.

[0220] Los promotores adecuados para su uso con huéspedes procariotas incluyen el promotor PhoA, sistemas de promotores de la β -galactamasa y lactosa, un sistema de promotores de triptófano (trp) y promotores híbridos, tales como el promotor tac o el promotor trc. Sin embargo, también son adecuados otros promotores que son funcionales en las bacterias (tales como otros promotores bacterianos o de fagos conocidos). Se ha publicado sus secuencias de nucleótidos, permitiendo así a un técnico unirlas a cistrones que codifican las cadenas ligera y pesada diana (Siebenlist et al. (1980) Cell 20: 269) utilizando enlazadores o adaptadores para suministrar cualquier sitio de restricción requerido.

[0221] En un aspecto, cada cistrón en el vector recombinante comprende un componente de la secuencia señal de secreción que dirige la translocación de los polipéptidos expresados a través de la membrana. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN polipeptídico diana que se inserta en el vector. La secuencia señal seleccionada para el objetivo de la presente invención debería ser aquella que es reconocida y procesada (es decir, dividida por una peptidasa señal) por la célula huésped. Para células huésped procariotas que no reconocen y procesan las secuencias señal nativas a los polipéptidos heterólogos, la secuencia señal es sustituida por una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo que consiste en secuencias líderes de fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp, o enterotoxina II (STII) estable al calor, LamB, PhoE, PelB, OmpA y MBP. En una realización de la presente invención, las secuencias señal utilizadas en ambos cistrones del sistema de expresión son secuencias señal STII o variantes de la misma.

[0222] En otro aspecto, la producción de las inmunoglobulinas según la presente invención puede tener lugar en el citoplasma de la célula huésped, y, por tanto, no requiere la presencia de secuencias señal de secreción en cada cistrón. En este aspecto, se expresan las cadenas ligera y pesada de las inmunoglobulinas, se pliegan y se ensamblan para formar inmunoglobulinas funcionales en el citoplasma. Ciertas cepas huésped (por ejemplo, las cepas *trx-B* de *E. coli*) proporcionan condiciones del citoplasma que son favorables para la formación de enlaces disulfuro, permitiendo así el pliegue y ensamblaje correctos de subunidades de proteínas expresadas. Proba y Pluckthun Gene, 159:203 (1995).

[0223] Entre las células huésped procariotas adecuadas para expresar anticuerpos se incluyen Archaeobacteria y Eubacteria, tales como organismos Gram-negativo o Gram-positivo. Ejemplos de bacterias útiles incluyen *Escherichia* (por ejemplo, *E. coli*), *Bacilli* (por ejemplo, *B. subtilis*), *Enterobacteria*, especies de *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescans*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*,

Vitreoscilla, o Paracoccus. En una realización, se utilizan células Gram-negativas. En una realización, se utilizan células *E. coli* como huéspedes para la invención. Ejemplos de cepas de *E. coli* incluyen la cepa W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pág. 1190-1219; Depósito ATCC No. 27,325) y derivados de la misma, incluyendo la cepa 33D3 que tiene el genotipo W3110 $\Delta fhuA$ ($\Delta tonA$) $ptR3$ lac lq $lacL8$ $\Delta ompT\Delta(nmpc-fepE)$ $degP41$ $kanR$ (Patente de Estados Unidos No. 5,639,635). También están disponibles otras cepas y derivados de la misma, tales como *E. coli* 294 (ATCC 31,446), *E. coli* B, *E. coli* λ 1776 (ATCC 31,537) y *E. coli* RV308 (ATCC 31,608). Estos ejemplos son más ilustrativos que limitantes. Los métodos para construir derivados de cualquiera de las bacterias mencionadas anteriormente que tienen genotipos definidos son conocidos en la técnica y se describen en, por ejemplo, Bass et al., Proteins, 8:309-314 (1990). En general, es necesario seleccionar las bacterias apropiadas teniendo en cuenta la replicabilidad del replicón en las células de una bacteria. Por ejemplo, como huésped se pueden utilizar de forma adecuada las especies *E. coli*, *Serratia*, o *Salmonella* cuando se utilizan plásmidos conocidos, tales como pBR322, pBR325, pACYC177, o pKN410 para suministrar el replicón. Habitualmente la célula huésped debería secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas y se pueden incorporar de manera deseable inhibidores de proteasas adicionales en el cultivo celular.

ii. Producción de anticuerpos

[0224] Las células huésped se transforman con los vectores de expresión descritos anteriormente y se cultivan en medio nutriente convencional según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

[0225] La transformación significa introducir ADN en el huésped procariota, de manera que el ADN sea replicable, ya sea como elemento extracromosómico o mediante integrante cromosómico. Dependiendo de la célula huésped utilizada, la transformación se realiza utilizando técnicas estándar apropiadas para dichas células. El tratamiento con calcio que utiliza cloruro de calcio se utiliza en general para células bacterianas que contienen barreras de paredes celulares sustanciales. Otro método para la transformación utiliza polietilenglicol/DMSO. Otra técnica utiliza es la electroporación.

[0226] Las células procariotas utilizadas para producir los polipéptidos se desarrollan en medios conocidos en la técnica y adecuados para el cultivo de las células huésped seleccionadas. Entre los ejemplos de medios adecuados se incluyen caldo de luria (LB) más suplementos de nutrientes necesarios. En algunas realizaciones, el medio también contiene un agente de selección, elegido en base a la construcción del vector de expresión, para permitir selectivamente el crecimiento de células procariotas que contienen el vector de expresión. Por ejemplo, se añade ampicilina al medio para el crecimiento de células que expresan el gen de resistencia a ampicilina.

[0227] También se pueden incluir en las concentraciones apropiadas cualquier suplemento necesario además de fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato inorgánico introducidos solos o como una mezcla con otro suplemento medio, tal como una fuente de nitrógeno compleja. Opcionalmente, el medio de cultivo puede contener uno o más agentes reductores seleccionados del grupo que consiste en glutatión, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditiotritol y ditiotritol.

[0228] Las células huésped procariotas se cultivan a temperaturas adecuadas. Para el crecimiento de *E. coli*, por ejemplo, las temperatura preferidas varían de aproximadamente 20°C a aproximadamente 39°C, más preferiblemente de aproximadamente 25°C a aproximadamente 37°C, e incluso más preferiblemente a aproximadamente 30°C. El pH del medio puede ser cualquier pH que varía desde aproximadamente 5 a aproximadamente 9, dependiendo principalmente del organismo huésped. Para *E. coli*, el pH es preferiblemente de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,4, y más preferiblemente de aproximadamente 7,0.

[0229] Si se utiliza un promotor inducible en el vector de expresión, se induce la expresión de proteínas bajo condiciones adecuadas para la activación del promotor. En un aspecto, los promotores PhoA se utilizan para controlar la transcripción de los polipéptidos. Por consiguiente, las células huésped transformadas se cultivan en un medio limitante de fosfato para la inducción. Preferiblemente, el medio limitante de fosfato es el medio C.R.A.P (véase, por ejemplo, Simmons et al., J. Immunol. Methods (2002), 263:133-147). Se puede utilizar un conjunto de otros inductores, según la construcción de vector utilizada, tal como se conoce en la técnica.

[0230] En una realización, los polipéptidos expresados de la presente invención se secretan en el periplasma y se recuperan del periplasma de las células huésped. La recuperación de proteínas implica habitualmente la ruptura del microorganismo, generalmente mediante medios, tales como choque osmótico, sonicación o lisis. Una vez se han roto las células, se pueden eliminar la debris celular o las células completas mediante centrifugación o filtración. Las proteínas se pueden purificar adicionalmente, por ejemplo, mediante cromatografía por afinidad de resina. Alternativamente, las proteínas se pueden transportar en el medio de cultivo y aislarse en el mismo. Las células se pueden extraer del cultivo y el sobrenadante de cultivo se filtra y concentra para una purificación posterior de las proteínas producidas. Los polipéptidos expresados se pueden aislar posteriormente e identificarse utilizando métodos conocidos habitualmente, tales como electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y ensayo de transferencia Western.

[0231] En un aspecto, la producción de anticuerpos se realiza en grandes cantidades mediante un proceso de fermentación. Existen varios procedimientos de fermentación a gran escala de alimentación por lotes para la producción de proteínas recombinantes. Las fermentaciones a gran escala tienen al menos 1000 litros de capacidad, preferiblemente, aproximadamente 1.000 a 100.000 litros de capacidad. Estos fermentadores utilizan impulsores agitadores para distribuir oxígeno y nutrientes, especialmente glucosa (la fuente de carbono/energía preferida). La fermentación a escala pequeña se refiere en general a la fermentación en un fermentador que no tiene más de 100 litros de capacidad volumétrica, y puede variar de aproximadamente 1 litro a aproximadamente 100 litros.

[0232] En un proceso de fermentación, la inducción de la expresión de proteínas se inicia habitualmente después de que las células hayan crecido bajo condiciones adecuadas hasta una densidad deseada, por ejemplo, DO550 de aproximadamente 180-220, en cuya fase las células se encuentran en una fase estacionaria inicial. Se pueden utilizar un conjunto de inductores, según la construcción de vector utilizada, tal como se conoce en la técnica y se ha descrito anteriormente. Las células se pueden desarrollar durante periodos de tiempo más cortos antes de la inducción. Las células se inducen habitualmente durante aproximadamente 12-50 horas, aunque se pueden utilizar una inducción de tiempo más larga o más corta.

[0233] Para mejorar el rendimiento de producción y la calidad de los polipéptidos, se pueden modificar varias condiciones de fermentación. Por ejemplo, para mejorar el ensamblaje correcto y el pliegue de los polipéptidos anticuerpo secretados, se pueden utilizar vectores adicionales que sobreexpresan proteínas chaperonas, tales como proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD y/o DsbG) o FkpA (una peptidilprolil cis,trans-isomerasa con actividad de chaperona) para co-transformar las células huésped procariotas. Se ha demostrado que las proteínas chaperonas facilitan el correcto pliegue y la solubilidad de proteínas heterólogas producidas en células huésped bacterianas. Chen et al. (1999) J Bio Chem. 274:19601-19605; Georgiou et al., Patente de Estados Unidos No. 6,083,715; Georgiou et al., Patente de Estados Unidos No. 6,027,888; Bothmann y Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275: 17100-17105; Ramm y Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113; Arie et al. (2001) Mol. Microbiol. 39:199-210.

[0234] Para minimizar la proteólisis de proteínas heterólogas expresadas (especialmente aquellas que son proteolíticamente sensibles), se pueden utilizar ciertas cepas huésped deficientes en enzimas proteolíticas para la presente invención. Por ejemplo, las cepas de células huésped se pueden modificar para realizar una mutación o mutaciones genéticas en los genes que codifican proteasas bacterianas conocidas, tales como Proteasa III, OmpT, DegP, Tsp, Proteasa I, Proteasa Mi, Proteasa V, Proteasa VI y combinaciones de las mismas. Algunas cepas de E. coli deficientes en proteasa están disponibles y se describen en, por ejemplo, Joly et al. (1998), supra; Georgiou et al., Patente de Estados Unidos No. 5,264,365; Georgiou et al., Patente de Estados Unidos No. 5,508,192; Hara et al., Microbial Drug Resistance, 2:63-72 (1996).

[0235] En una realización, las cepas de E. coli deficientes en enzimas proteolíticas y transformadas con plásmidos que sobreexpresan una o más proteínas chaperonas se utilizan como células huésped en el sistema de expresión de la presente invención.

iii. Purificación de anticuerpos

[0236] Se pueden utilizar métodos de purificación de proteínas estándar conocidos en la técnica. Los siguientes procedimientos son ejemplos de procedimientos de purificación adecuados: fraccionamiento en columnas de inmunoafinidad o intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice o en una resina de intercambio catiónico, tal como DEAE, "chromatofocusing", SDS-PAGE, precipitación con sulfato de amonio, y filtración en gel utilizando, por ejemplo, Sephadex G-75.

[0237] En un aspecto, se utiliza la proteína A inmovilizada en una fase sólida para la purificación por inmunoafinidad de los productos de anticuerpo de longitud completa. La proteína A es una proteína de la pared celular de 41 kD de *Staphylococcus aureus* que se une con una gran afinidad a la región Fc de los anticuerpos. Lindmark et al (1983) J. Immunol. Meth. 62:1-13. La fase sólida a la que se inmoviliza la proteína A es preferiblemente una columna que comprende una superficie de vidrio o sílice, más preferiblemente una columna de vidrio de poro controlado o una columna de ácido silícico. En algunas aplicaciones, la columna se ha recubierto con un reactivo, tal como glicerol, en un intento por evitar la adherencia no específica de contaminantes.

[0238] Como primera etapa de purificación, la preparación derivada del cultivo celular tal como se ha descrito anteriormente, se aplica a la fase sólida inmovilizada con proteína A para permitir la unión específica del anticuerpo de interés a la proteína A. A continuación, la fase sólida se lavaría para eliminar contaminantes no unidos específicamente a la fase sólida. Finalmente el anticuerpo de interés se recupera de la fase sólida mediante elución.

b. Generación de anticuerpos utilizando células huésped eucariotas:

[0239] Entre los componentes del vector se incluyen generalmente, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: 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.

(i) Componente secuencia señal

[0240] Un vector para usar en una célula huésped eucariota también puede contener una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de división específica en el extremo N-terminal de la proteína o polipéptido maduros de interés. La secuencia señal heteróloga seleccionada preferiblemente es aquella que es reconocida y procesada (es decir, dividida por una peptidasa señal) por la célula huésped. En la expresión de células de mamíferos, se disponen las secuencias señal de mamíferos, así como las secuencias líderes secretoras víricas, por ejemplo, la señal gD de herpes simplex.

[0241] El ADN para dicha región de precursor está ligada en el marco de lectura a ADN que codifica el anticuerpo.

(ii) Origen de replicación

[0242] Generalmente, no es necesario un componente origen de replicación para vectores de expresión de mamíferos. Por ejemplo, el origen SV40 se puede utilizar habitualmente sólo porque contiene el promotor temprano.

(iii) Componente de gen de selección

[0243] Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también denominado un marcador seleccionable. Los genes de selección habituales codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, cuando sea pertinente, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles del medio complejo.

[0244] Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula huésped. Las células que se transforman de forma satisfactoria con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia al fármaco y sobreviven de esta manera al régimen de selección. Algunos ejemplos de dicha selección dominante utilizan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

[0245] Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamíferos son los que permiten la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico del anticuerpo, tal como DHFR, timidina quinasa, metalotioneina-I y -II, preferiblemente genes de metalotioneina de primate, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

[0246] Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección de DHFR se identificaron por primera vez mediante el cultivo de todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula huésped apropiada cuando se utiliza la DHFR de tipo salvaje es la línea celular de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en la actividad de DHFR (por ejemplo, ATCC CRL-9096).

[0247] Alternativamente, se pueden seleccionar células huésped (particularmente huéspedes de tipo salvaje que contienen DHFR endógena) transformadas o cotransformadas con secuencias de ADN que codifican un anticuerpo, proteína DHFR de tipo salvaje, y otro marcador seleccionable, tal como aminoglicósido 3'-fosfotransferasa (APH), mediante el crecimiento celular en medio que contiene un agente de selección para el marcador seleccionable, tal como un antibiótico aminoglicosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina, o G418. Véase la Patente de Estados Unidos No. 4.965.199.

(iv) Componente promotor

[0248] Los vectores de expresión y clonación contienen habitualmente un promotor que es reconocido por el organismo huésped y está unido operativamente al ácido nucleico que codifica el polipéptido anticuerpo. Las secuencias de promotor son conocidas para eucariotas. Por ejemplo, prácticamente, todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases en dirección 5' desde el sitio en el que se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada de 70 a 80 bases en dirección 5' desde el inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT en la que N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de genes eucariotas es una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan de manera adecuada en vectores de expresión eucariotas.

[0249] La transcripción a partir de vectores en células huésped de mamíferos de polipéptidos anticuerpos se controla, por ejemplo, mediante promotores obtenidos de los genomas de virus, tales como el virus del polio, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como Adenovirus 2), virus de papiloma bovino, virus de sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y Virus del Simio 40 (SV40), de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque térmico, siempre y cuando dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células huésped.

[0250] Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de

restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación vírico SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción HindIII E. En la Patente de Estados Unidos No. 4.419.446 se describe un sistema para expresar ADN en huéspedes de mamíferos que utiliza el virus de papiloma bovino como vector. En la Patente de Estados Unidos No. 4.601.978 se describe una modificación de este sistema. Alternativamente, la repetición terminal larga del virus de sarcoma de Rous se puede utilizar como promotor.

(v) *Componente elemento potenciador*

[0251] La transcripción de un ADN que codifica un polipéptido anticuerpo por eucariotas superiores se incrementa frecuentemente mediante la inserción de una secuencia potenciadora en el vector. Actualmente, se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Habitualmente, sin embargo, se utilizará un potenciador de un virus de células eucariotas. Entre los ejemplos se incluyen el potenciador de SV40 en la cara tardía del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en la cara tardía del origen de replicación, y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv. *Nature* 297:17-18 (1982) en los elementos de potenciadores para la activación de promotores eucariotas. El potenciador se puede empalmar en el vector en la posición 5' ó 3' con respecto a la secuencia codificante del polipéptido anticuerpo, pero se localiza generalmente en un sitio 5' desde el promotor.

(vi) *Componentes de terminación de la transcripción*

[0252] Los vectores de expresión utilizados en las células huésped eucariotas también contendrán habitualmente las secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están disponibles habitualmente de las regiones no traducidas 5', y alguna vez desde 3', de ADN's o ADNcs eucariotas o víricos. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica el anticuerpo. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino. Véase WO 94/11026 y el vector de expresión descrito en la misma.

(vii) *Selección y transformación de células huésped*

[0253] Entre las células huésped para clonar o expresar el ADN en los vectores en el presente documento se incluyen células eucariotas superiores aquí descritas, que incluyen células huésped de vertebrados. La propagación de células de vertebrados en un cultivo (cultivo de tejidos) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Entre los ejemplos de líneas celulares de huéspedes mamíferos útiles están la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón de embrión humano (células 293 ó 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo de suspensión, Graham et al., *J. Gen Virol.*, 36:59 (1977)); células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino-DHFR (CHO, Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4 y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

[0254] Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción del anticuerpo y se cultivan en un medio con nutrientes habituales modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

(viii) *Cultivo de las células huésped*

[0255] Las células huésped utilizadas para producir un anticuerpo se pueden cultivar en un conjunto de medios. Los medios comercialmente disponibles, tales como F10 de Ham (sigma), Medio Mínimo Esencial ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y Medio de Eagle Modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar células huésped. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham et al., *Meth. Enz.*, 58: 44 (1979), Barnes et al., *Anal. Biochem.* 102: 255 (1980), Patente de Estados Unidos Nos. 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; o 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; o la Patente de Estados Unidos Re. 30,985 se pueden utilizar como medios de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios se puede complementar según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMICINATM), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos presentes normalmente a concentraciones finales en el rango micromolar) y la glucosa o una fuente de energía equivalente. También se puede incluir cualquier otro complemento necesario en las concentraciones apropiadas que serían conocidas por un experto en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, el pH y similares, son las utilizadas previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión y será evidente para el experto en la materia.

(iv) Purificación de anticuerpo

[0256] Cuando se utilizan técnicas recombinantes, el anticuerpo se puede producir intracelularmente, o se secreta directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como primera etapa, se elimina el residuo celular particulado, ya sean células huésped o fragmentos lisados, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Cuando el anticuerpo se secreta en el medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión en general se concentran en primer lugar utilizando un filtrador de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de proteasa, tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes extraños.

[0257] La composición de anticuerpos preparada a partir de las células se puede purificar utilizando, por ejemplo, cromatografía de hidroxapatita, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La adecuación de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que está presente en el anticuerpo. La proteína A se puede utilizar para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ humanas (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humana (Guss et al., EMBO J. 5: 1565-1575 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad es frecuentemente agarosa, pero hay otras matrices disponibles. Las matrices mecánicamente estables, tales como vidrio de poro controlado o poli(estirenodivinil)benceno permiten velocidades de flujo más elevadas y tiempos de procesamiento más cortos que los conseguidos con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio C_{H3} , la resina Bakerbond ABXTM (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas, tales como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de Fase Inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina SEPHAROSETM, cromatografía en una resina de intercambio aniónica o catiónica (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatofoco ("chromatofocusing"), SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo a recuperar.

[0258] Tras la etapa o etapas de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y contaminantes se puede someter a una cromatografía de interacción hidrofóbica de pH bajo utilizando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5 y 4,5, preferiblemente se realiza a concentraciones bajas de sal (por ejemplo, de aproximadamente 0-0,25 M de sal).

Inmunconjugados

[0259] La presente invención también proporciona inmunconjugados (denominados indistintamente "conjugados de anticuerpo-fármaco" o "ADC"), que comprenden cualquiera de los anticuerpos contra KL β aquí descritos conjugados a un agente citotóxico, tal como un agente quimioterapéutico, un fármaco, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma, o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

[0260] La utilización de conjugados anticuerpo-fármaco para la liberación local de agentes citotóxicos o citostáticos, es decir fármacos para matar o inhibir células tumorales en el tratamiento del cáncer (Syrigos y Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) Adv. Dug Del. Rev. 26:151-172; patente de Estados Unidos 4,975,278) permite la liberación dirigida del grupo farmacológico a tumores, y la acumulación intracelular en los mismos, donde la administración sistémica de estos agentes farmacológicos no conjugados puede dar lugar a niveles inaceptables de toxicidad en las células normales, así como en las células tumorales a eliminar (Baldwin et al., (1986) Lancet (Mar. 15, 1986) pág. 603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pág. 475-506). De este modo, se busca la máxima eficacia con la mínima toxicidad. Tanto los anticuerpos policlonales como los anticuerpos monoclonales se han descrito como útiles en estas estrategias (Rowland et al., (1986) Cancer Immunol. Immunother., 21:183-87). Los fármacos utilizados en estos métodos incluyen daunomicina, doxorubicina, metotrexato, y vindesina (Rowland et al., (1986) supra). Las toxinas utilizadas en los conjugados anticuerpo-toxina incluyen toxinas bacterianas, tales como la toxina de la difteria, toxinas de plantas, tales como ricina, toxinas de molécula pequeña, tales como geldanamycin (Mandler et al. (2000) J. of the Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581; Mandler et al. (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028; Mandler et al. (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791), maitansinoides (EP 1391213; Liu et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623), y caliqueamicina (Lode et al. (1998) Cancer Res. 58:2928; Hinman et al. (1993) Cancer Res. 53:3336-3342). Las toxinas pueden ejercer sus efectos citotóxicos y citostáticos mediante mecanismos que incluyen la unión a tubulina, la unión a ADN o la inhibición de topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a inactivarse o ser menos activa cuando se conjugan a anticuerpos o ligandos de receptores de proteínas grandes.

[0261] ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan, Biogen/Idec) es un conjugado anticuerpo-radioisótopo compuesto de un anticuerpo monoclonal kappa IgG1 murino dirigido contra el antígeno CD20 hallado en la superficie de linfocitos B normales y malignos y radioisótopos ¹¹¹In o ⁹⁰Y unidos por un enlazador-quelante de tiourea (Wiseman et al (2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7):766-77; Wiseman et al (2002) Blood 99(12):4336-42; Witzig et al (2002) J. Clin. Oncol.

20(10):2453-63; Witzig et al (2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69). Aunque ZEVALIN presenta actividad contra el Linfoma no de Hodgkin (NHL) de células B, la administración da lugar a citopenias severas y prolongadas en la mayoría de pacientes. MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicin, Wyeth Pharmaceuticals), se aprobó en el 2000 un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto de anticuerpo CD33 humano unido a caliqueamicina para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda mediante inyección (Drugs of the Future (2000) 25(7): 686; Patente de Estados Unidos No 4970198; 5079233; 5585089; 5606040; 5693762; 5739116; 5767285; 5773001). Cantuzumab mertansine (Immunogen, Inc.), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto del anticuerpo C242 humano unido a través de un enlazador disulfuro SPP al grupo farmacológico de maitansinoide, DM1, está avanzando en las pruebas en la Fase II para el tratamiento de cánceres que expresan CanAg, tales como colon, pancreático, gástrico y otros. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto del anticuerpo monoclonal para el antígeno de membrana específico antipróstata (PSMA) unido a un grupo farmacológico de maitansinoide, DM1, se encuentra en desarrollo para el potencial tratamiento de tumores de próstata. Los péptidos de auristatina, auristatina E (AE) y monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de dolastatina, se conjugaron a anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específicos a Lewis Y en carcinomas) y cAC10 (específico a CD30 en tumores hematológicos) (Doronina et al (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784) y se encuentran bajo desarrollo terapéutico.

[0262] En el presente documento (por ejemplo, anteriormente) se describen agentes quimioterapéuticos útiles para la generación de inmunoconjugados. Entre las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden utilizar se incluyen la cadena A de difteria, fragmentos activos no enlazantes de la toxina de difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, WO 93/21232 publicada el 28 de octubre de 1993. Existe un conjunto de radionucleidos disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados. Algunos ejemplos son ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y y ^{186}Re . Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se fabrican utilizando un conjunto de agentes bifuncionales acopladores de proteínas, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol)propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina tal y como se describe en Vitella et al., Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilen triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de radionucleótidos al anticuerpo. Véase WO94/11026.

[0263] También se contemplan en el presente documento conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como caliqueamicina, maitansinoides, dolastatinas, aurostatinas, un tricoteno y CC1065 y los derivados de estas toxinas que tiene actividad de toxina.

i. Maitansina y maitansinoides

[0264] En algunas realizaciones, se conjuga un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo (longitud completa o fragmentos) a una o más moléculas maitansinoides.

[0265] Los maitansinoides son inhibidores mitotóticos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto *Maytenus serrata* del África del este (Patente de Estados Unidos No. 3,896,111). Posteriormente, se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres de C-3 maitansinol (Patente de Estados Unidos No. (4,151,042). El maitansinol sintético y derivados y análogos del mismo se describe, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nos. 4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,424,219; 4,450,254; 4,362,663; y 4,371,533.

[0266] Los grupos farmacológicos de maitansinoides son grupos farmacológicos atractivos en los conjugados de anticuerpo-fármaco porque: (i) son relativamente accesibles para preparar mediante fermentación o modificación química, derivatización de productos de fermentación, (ii) susceptibles de derivatización con grupos funcionales adecuados para la conjugación a través de enlazadores a anticuerpos que no son disulfuro, (iii) son estables en plasma, y (iv) son eficaces con un conjunto de líneas de células tumorales.

[0267] Los inmunoconjugados que contienen maitansinoides y su uso terapéutico se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,208,020, 5,416,064 y la Patente Europea EP 0 425 235 B1, las memorias de las cuales se incorporan expresamente aquí por referencia, Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8618-8623 (1996) describieron inmunoconjugados que comprenden un maitansinoide designado como DM1 unido al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra el cáncer colorrectal humano. Se observó que el conjugado era altamente citotóxico hacia las células del cáncer de colon cultivadas y mostró actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento de tumores *in vivo*. Chari et al., Cancer Research 52: 127-131 (1992) describen inmunoconjugados en los que se

conjugó un maitansinoide a través de un enlace disulfuro al anticuerpo murino A7 que se une a un antígeno en líneas celulares de cáncer de colon humano, o a otro anticuerpo monoclonal murino TA.1 que se une al oncogén HER-2/*neu*. La citotoxicidad del conjugado Ta.1-maitansinoide se ensayó in vitro en la línea de células de cáncer de mama humano SK-BR-3, que expresa 3×10^5 antígenos de la superficie de HER-2 por célula. El fármaco conjugado consiguió un grado de citotoxicidad similar al del fármaco maitansinoide libre, que se podía incrementar mediante el incremento del número de moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo. El conjugado A7-maitansinoide mostró una citotoxicidad sistémica baja en ratones.

[0268] Los conjugados de anticuerpo-maitansinoide se preparan mediante la unión química de un anticuerpo a una molécula maitansinoide sin disminuir significativamente la actividad biológica del anticuerpo o la molécula maitansinoide. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 5,208,020. Un promedio de 3-4 moléculas de maitansinoide conjugadas por molécula de anticuerpo han mostrado una eficacia en el aumento de la citotoxicidad de células diana sin afectar negativamente a la función o solubilidad del anticuerpo, aunque se esperaría que incluso una molécula de toxina/anticuerpo aumentara la citotoxicidad sobre el uso de anticuerpo desnudo. Los maitansinoides son bien conocidos en la técnica y se pueden sintetizar mediante técnicas conocidas o aislarse de fuentes naturales. Se describen maitansinoides adecuados, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos No. 5,208,020 y en las otras publicaciones de patente y no patente referidas anteriormente aquí. Los maitansinoides preferidos son maitansinol y análogos de maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, tales como varios ésteres de maitansinol.

[0269] Existen muchos grupos enlazadores conocidos en la técnica para fabricar conjugados anticuerpo-maitansinoide, incluyendo, por ejemplo, los descritos en la Patente de Estados Unidos No. 5,208,020 o Patente EP 0 425 235 B1, Chari et al., Cancer Research 52: 127-131 (1992) y la solicitud de patente de Estados Unidos No. 10/960,602, solicitada el 8 de octubre de 2004, las memorias de las cuales se incorporan expresamente aquí por referencia. Los conjugados que comprenden anticuerpo-maitansinoide que comprenden el componente enlazador SMCC se pueden preparar tal como se describe en la a solicitud de patente de Estados Unidos No. 10/960,602 solicitada el 8 de octubre de 2004. Los grupos enlazadores incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles a peptidasa o grupos lábiles a esterasa, tal como se describe en las patentes identificadas anteriormente, siendo preferidos los grupos disulfuro y tioéter. En la presente invención se describen y ejemplifican grupos de unión adicionales.

[0270] Los conjugados del anticuerpo y el maitansinoide se pueden fabricar utilizando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como, dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como, bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Los agentes de acoplamiento particularmente preferidos incluyen N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP) (Carlsson et al., Biochem. J. 173: 723-737 [1978]), y N-succinimidil-4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP) para proporcionar un enlace disulfuro.

[0271] El enlazador se puede unir a la molécula de maitansinoide en varias posiciones, dependiendo del tipo de enlace. Por ejemplo, un enlace éster puede estar formado por la reacción con un grupo hidroxilo utilizando técnicas de acoplamiento convencionales. La reacción puede tener lugar en la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo, y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo. En una realización preferida, el enlace se forma en la posición C-3 de maitansinol o un análogo de maitansinol.

ii. Auristatinas y dolastatinas

[0272] En algunas realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo conjugado a dolastatinas o análogos o derivados peptídicos de dolastatinas, las auristatinas (Patentes de Estados Unidos N° 5.635.483; 5.780.588). Se ha observado que las dolastatinas y las auristatinas interfieren con la dinámica de los microtúbulos, la hidrólisis del GTP y la división nuclear y celular (Woyke et al. (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584) y tienen actividad anticancerígena (patente de Estados Unidos N° 5.663.149) y actividad antifúngica (Pettit et al. (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965). El grupo farmacológico de dolastatina o auristatina puede estar unido al anticuerpo a través del extremo N (amino) terminal o del extremo C (carboxilo) terminal del grupo farmacológico peptídico (documento WO 02/088172).

[0273] Entre las realizaciones de ejemplo de auristatina se incluyen los grupos farmacológicos de monometilauristatina unidos por el extremo N-terminal DE y DF descritos en "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", US Ser. No. 10/983,340, presentada el 5 de noviembre de 2004.

[0274] Habitualmente, pueden prepararse grupos farmacológicos a base de péptidos mediante la formación de un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos peptídicos. Dichos enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, según el procedimiento de síntesis en fase líquida (véase E. Schröder y K. Lübke, "The

Peptides", volumen 1, pág 76-136, 1965, Academic Press) que es bien conocido en el campo de la química de péptidos. Los grupos farmacológicos de auristatina/dolastatina pueden prepararse según los procedimientos de: documentos US 5.635.483 y US 5.780.588; Pettit et al. (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit et al. (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; Pettit, G.R, et al. Synthesis, 1996, 719-725 y Pettit et al. (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 15:859-863. Véase también Doronina (2003) Nat. Biotechnol. 21(7):778-784; "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", US Ser. No. 10/983,340, presentada el 5 de noviembre de 2004, (que describe, por ejemplo, enlazadores y métodos de preparación de compuestos de monometilvalina, tales como MMAE y MMAF conjugados a enlazadores).

iii. Caliqueamicina

[0275] En otras realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo conjugado a una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de antibióticos de caliqueamicina es capaz de producir roturas de ADN de doble cadena a concentraciones subpicomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de caliqueamicina, véanse las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,712,374; 5,714,586; 5,739,116; 5,767,285; 5,770,701; 5,770,710; 5,773,001; y 5,877,296 (todas de la American Cyanamid Company). Entre los análogos estructurales de caliqueamicina que se pueden utilizar se incluyen, pero sin limitación, γ_1^1 , α_2^1 , α_3^1 , N-acetil- γ_1^1 , PSAG, y θ_1^1 (Hinman et al, CancerRes 53: 3336-3342 (1993); Lode et al., Cancer Research 58: 2925-2928 (1998) y las patentes de Estados Unidos mencionadas anteriormente de American Cyanamid). Otro fármaco antitumoral al que el anticuerpo se puede conjugar es QFA, un antifolato. Tanto la caliqueamicina como QFA tienen sitios intracelulares de acción y no atraviesan fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la captación celular de estos agentes a través de la internalización mediada por anticuerpos aumenta ampliamente sus efectos citotóxicos.

iv. Otros agentes citotóxicos

[0276] Otros agentes antitumorales que se pueden conjugar a los anticuerpos incluyen BCNU, estreptoizina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocida colectivamente como complejo LL-E33288 descrita en las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,053,394, 5,770,710, así como esperamicinas (patente de Estados Unidos 5,877,296).

[0277] Entre las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden utilizar se incluyen la cadena A de difteria, fragmentos activos no enlazantes de toxina de difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAPS), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, WO 93/21232 publicada el 28 de octubre de 1993.

[0278] La presente invención contempla además un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una ADN endonucleasa, tal como una desorribonucleasa; ADNasa).

[0279] Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radioactivo. Existe un conjunto de isótopos radioactivos disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados. Algunos ejemplos incluyen At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isótopos radioactivos de Lu. Cuando se utiliza el conjugado para el diagnóstico, puede comprender un átomo radioactivo para estudios centellográficos, por ejemplo Tc^{99m} o I^{123} , o un marcador de spin para la obtención de imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como imagen por resonancia magnética, mri), tal como yodo-123, de nuevo, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

[0280] Los radiomarcadores u otros marcadores se pueden incorporar en el conjugado de varias maneras conocidas. Por ejemplo, el péptido se puede biosintetizar o se puede sintetizar mediante la síntesis química de aminoácidos utilizando precursores de aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Los marcadores, tales como, Tc^{99m} o I^{123} , Re^{186} , Re^{188} e In^{111} se pueden unir mediante un residuo de cisteína en el péptido. El itrio-90 se puede unir mediante un residuo de lisina. El método de IODOGEN (Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:49-57) se puede utilizar para incorporar yodo-123. "Monoclonal antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros métodos en detalle.

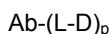
[0281] Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se pueden fabricar utilizando un conjunto de agentes bifuncionales acopladores de proteínas, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol)propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina tal y como se describe en Vitetta et al., Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilen triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de

radionucleótidos al anticuerpo. Véase WO94/11026. El enlazador puede ser un "enlazador separable" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se puede utilizar un enlazador lábil en ácido, un enlazador sensible a peptidasa, un enlazador fotolábil, un enlazador dimetilo o un enlazador que contiene disulfuro (Chari et al. Cancer Research 52: 127-131 [1992]; Patente de Estados Unidos No. 5,208,020).

[0282] Los compuestos contemplan expresamente, pero sin limitación, ADC preparado con los reactivos reticulantes: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, y sulfo-SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona) benzoato) que está disponible comercialmente (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A.). Véanse las páginas 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

v. Preparación de conjugados de anticuerpo y fármaco

[0283] En los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC), se conjuga un anticuerpo (Ab) a uno o más grupos farmacológicos (D), por ejemplo, de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 grupos farmacológicos por anticuerpo, a través de un enlazador (L). El ADC que tiene la fórmula I se puede preparar mediante varias rutas, utilizando reacciones de química orgánica, condiciones y reactivos conocidos por un experto en la materia, incluyendo: (1) reacción de un grupo nucleofílico de un anticuerpo con un reactivo enlazador bivalente para formar Ab-L, a través de un enlace covalente, seguido de una reacción con un grupo farmacológico D; y (2) reacción de un grupo nucleofílico de un grupo farmacológico con un reactivo enlazador bivalente, para formar D-L, a través de un enlace covalente, seguido de la reacción con el grupo nucleofílico de un anticuerpo. Métodos adicionales para preparar ADC se describen aquí.



[0284] El enlazador puede estar compuesto de uno o más componentes enlazadores. Entre los componentes enlazadores de ejemplo se incluyen 6-maleimidocaproilo ("MC"), maleimidopropanoilo ("MP"), valina-citrulina ("val-cit"), alanina-fenilalanina ("ala-phe"), p-aminobenciloxicarbonilo ("PAB"), N-Succinimidil 4-(2-piridiltio) pentanoato ("SPP"), N-Succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato ("SMCC"), y N-Succinimidil (4-yodo-acetil) aminobenzoato ("SIAB"). En la técnica se conocen más componentes enlazadores y algunos se describe aquí. Véase también "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", US Ser. No. 10/983,340, presentada el 5 de noviembre de 2004.

[0285] En algunas realizaciones, el enlazador puede comprender residuos de aminoácidos. Entre los componentes enlazadores con aminoácidos de ejemplo se incluyen un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido o un pentapéptido. Entre los dipéptidos de ejemplo se incluyen: valina-citrulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe). Entre los tripéptidos de ejemplo se incluyen: glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Los residuos de aminoácidos que comprende un componente enlazador con aminoácido incluyen los aminoácidos naturales, así como aminoácidos secundarios y análogos de aminoácidos no naturales, tales como citrulina. Los componentes enlazadores con aminoácidos se pueden diseñar y optimizar en su selectividad para la división enzimática mediante una enzima particular, por ejemplo, una proteasa asociada a tumor, cathepsina B, C y D o una proteasa de plasmina.

[0286] Entre los grupos nucleofílicos en los anticuerpos se incluyen, pero sin limitación: (i) grupos amino N-terminal, (ii) grupos amina de cadena lateral, por ejemplo, lisina, (iii) grupos tiol de cadena lateral, por ejemplo, cisteína, y (iv) grupos hidroxilo o grupos amina de azúcares donde el anticuerpo está glicosilado. Los grupos amina, tiol e hidroxilo, son nucleofílicos y son capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos en los fragmentos de enlazador y reactivos enlazadores que incluyen: (i) ésteres activos, tales como ésteres NHS, ésteres HOBt, haloformatos y haluros de acilo; (ii) haluros de alquilo y bencilo, tales como haloacetamidas; (iii) grupos aldehídos, cetonas, carboxilo y maleimida. Algunos anticuerpos presentan puentes disulfuros intercatenarios reducibles, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos se pueden volver reactivos para la conjugación con reactivos enlazadores mediante el tratamiento con un agente reductor, tal como DTT (ditiotritol). Cada puente de cisteína formará por tanto, teóricamente, dos nucleófilos de tiol reactivos. Se pueden introducir grupos nucleofílicos adicionales en anticuerpos a través de la reacción de lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) dando lugar a la conversión de una amina en tiol. Los grupos tiol reactivos se pueden introducir en el anticuerpo (o fragmento del mismo) mediante la introducción de uno, dos, tres, cuatro o más residuos de cisteína (por ejemplo, preparando anticuerpos mutantes que comprende uno o más residuos de aminoácido cisteína no nativos).

[0287] Los conjugados anticuerpo-fármaco también se pueden producir mediante la modificación del anticuerpo para introducir grupos electrofílicos, los cuales pueden reaccionar con los sustituyentes nucleofílicos en el reactivo enlazador o fármaco. Los azúcares de anticuerpos glicosilados se pueden oxidar, por ejemplo, con reactivos oxidantes de peryodato, para formar grupos aldehído o cetona que pueden reaccionar con el grupo amina de reactivos enlazadores o grupos farmacológicos. Los grupos imina resultantes de base de Schiff pueden formar una unión estable, o se pueden reducir, por ejemplo, mediante reactivos de borohidruro para formar uniones de amina estables. En una realización, la reacción de la parte de carbohidrato de un anticuerpo glicosilado con galactosa oxidasa o meta-peryodato sódico puede producir grupos carbonilo (aldehído y cetona) en la proteína que pueden

reaccionar con grupos apropiados en el fármaco (Hermanson, Bioconjugate Techniques). En otra realización, las proteínas que contienen los residuos serina o treonina N-terminales pueden reaccionar con meta-peryodato sódico dando lugar a la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; US 5362852). Dicho aldehído puede reaccionar con un nucleófilo de grupo farmacológico o enlazador.

[0288] Así mismo, los grupos nucleofílicos en un grupo farmacológico incluyen, pero sin limitación: amina, tiol, hidroxilo, hidrazida, oxima, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina y grupos arilhidrazida capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos en los grupos enlazadores y reactivos enlazadores que incluyen: (i) ésteres activos, tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformatos y haluros de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo, tales como haloacetamidas; (iii) grupos aldehídos, cetonas, carboxilo y maleimida.

[0289] Alternativamente, se puede fabricar una proteína de fusión que comprende el anticuerpo y un agente citotóxico, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. La longitud del ADN puede comprender regiones respectivas que codifican las dos partes del conjugado ya estén adyacentes entre sí o separadas por una región que codifica un péptido enlazador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

[0290] En otra realización, el anticuerpo se puede conjugar a un "receptor" (tal como estreptavidina) para la utilización en el reconocimiento de tumores donde el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de la eliminación del conjugado no unido de la circulación utilizando un agente depurador y a continuación, la administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que es conjugado a un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

Oligopéptidos de unión

[0291] Los oligopéptidos de unión son oligopéptidos que se unen, preferiblemente específicamente, a KL β , FGFR o un complejo KL β -FGFR tal como se describe aquí. Los oligopéptidos de unión se pueden sintetizar químicamente utilizando la metodología de síntesis de oligopéptidos conocida o se pueden preparar y purificar utilizando tecnología recombinante. Los oligopéptidos de unión tienen habitualmente por lo menos aproximadamente 5 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, ó 100 aminoácidos de longitud o más, donde dichos oligopéptidos son capaces de unirse, preferiblemente específicamente, a un polipéptido TAT tal como se describe aquí. Los oligopéptidos de unión se pueden identificar sin una gran experimentación utilizando técnicas conocidas. En este aspecto, cabe indicar que las técnicas para cribar bibliotecas de oligopéptidos para oligopéptidos que son capaces de unirse específicamente a un polipéptido diana son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos. 5,556,762, 5,750,373, 4,708,871, 4,833,092, 5,223,409, 5,403,484, 5,571,689, 5,663,143; Publicación PCT Nos. WO 84/03506 y WO84/03564; Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81: 3998-4002 (1984); Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82: 178-182 (1985); Geysen et al., in Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986); Geysen et al., J. Immunol. Meth., 102: 259-274 (1987); Schoofs et al., J. Immunol., 140: 611-616 (1988), Cwirla, S. E. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6378; Lowman, H.B. et al. (1991) Biochemistry, 30: 10832; Clackson, T. et al. (1991) Nature, 352: 624; Marks, J. D. et al. (1991), J. Mol. Biol., 222: 581; Kang, A.S. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 8363, y Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2: 668).

[0292] En este aspecto, la expresión en bacteriófagos (fagos) es una técnica bien conocida que permite cribar bibliotecas grandes de oligopéptidos para identificar el miembro o miembros de estas bibliotecas que son capaces de unirse específicamente a un polipéptido diana. La expresión en fago es una técnica por la cual se expresan variantes de polipéptidos como proteínas de fusión a la proteína de recubrimiento en la superficie de partículas de bacteriófagos (Scott, J.K. and Smith, G. P. (1990) Science, 249: 386). La utilidad de la expresión en fagos radica en el hecho de que grandes bibliotecas de variantes de proteínas seleccionadas al azar (o ADNcs clonados al azar) se pueden separar rápida y eficazmente en las secuencias que se unen a una molécula diana con gran afinidad. La expresión de bibliotecas de péptidos (Cwirla, S. E. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6378) o proteínas (Lowman, H.B. et al. (1991) Biochemistry, 30: 10832; Clackson, T. et al. (1991) Nature, 352: 624; Marks, J. D. et al. (1991), J. Mol. Biol., 222: 581; Kang, A.S. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 8363) en fagos se ha utilizado para cribar millones de polipéptidos u oligopéptidos en aquellos con propiedades de unión específicas (Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2: 668). La separación de las bibliotecas en fagos de mutantes aleatorios requiere una estrategia para construir y propagar un gran número de variantes, un procedimiento para la purificación por afinidad utilizando el receptor diana, y un medio de evaluación de los resultados de enriquecimientos de unión. Patentes de Estados Unidos nos. 5,223,409, 5,403,484, 5,571,689, y 5,663,143.

[0293] Aunque la mayoría de métodos de expresión en fago han utilizado sistemas de expresión en fago filamentoso, también son conocidos los sistemas de expresión en fago lamboide (WO 95/34683; U.S. 5,627,024),

sistema de expresión en fago T4 (Ren et al., Gene, 215: 439 (1998); Zhu et al. Cancer Research, 58(15): 3209-3214 (1998); Jiang et al. Infection and Immunity, 65(11): 4770-4777 (1997); Ren et al. Gene, 195(2): 303-311 (1997); Ren, Protein Sci., 5: 1833 (1996); Efimov et al., Virus Genes, 10: 173 (1995)) y sistemas de expresión en fago T7 (Smith y Scott, Methods in Enzymology, 217: 228-257 (1993); U.S. 5,766,905).

[0294] Actualmente se han desarrollado muchas otras mejoras y variaciones del concepto básico de expresión en fagos. Estas mejoras aumentan la capacidad de los sistemas de expresión para cribar bibliotecas de péptidos para unirse a moléculas diana seleccionadas y para expresar proteínas funcionales con el potencial de cribar estas proteínas por las propiedades deseadas. Se han desarrollado dispositivos de reacción combinatoria para las reacciones de expresión en fagos (WO 98/14277) y se han utilizado bibliotecas de expresión en fagos para analizar y controlar interacciones bimoleculares (WO 98/20169; WO 98/20159) y propiedades de péptidos helicoidales obligados (WO 98/20036). WO 97/35196 describe un método para aislar un ligando de afinidad en el que se pone en contacto una biblioteca de expresión en fagos con una solución en la que el ligando se unirá a una molécula diana y una segunda solución en la que el ligando de afinidad no se unirá a la molécula diana, para aislar selectivamente los ligandos de unión. WO 97/46251 describe un método para la bioadsorción de una biblioteca de expresión en fagos aleatoria con un anticuerpo purificado por afinidad y a continuación el aislamiento del fago de unión, seguido de un proceso de microadsorción utilizando pocillos de microplacas para aislar el fago de unión con afinidad elevada. También se ha descrito el uso de proteína A de *Staphylococcus aureus* como etiqueta de afinidad (Li et al. (1998) Mol Biotech., 9: 187). WO 97/47314 describe el uso de bibliotecas de sustracción de sustrato para distinguir las especificidades de enzima utilizando una biblioteca combinatoria que puede ser una biblioteca de expresión en fagos. En WO 97/094446 se describe un método para seleccionar enzimas adecuadas para su uso en detergentes utilizando la expresión en fagos. Métodos adicionales de selección de proteínas de unión específica se describen en las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,498,538, 5,432,018, y WO 98/15833.

[0295] Los métodos de generación de bibliotecas de péptidos y cribado de estas bibliotecas también se describen en las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,723,286, 5,432,018, 5,580,717, 5,427,908, 5,498,530, 5,770,434, 5,734,018, 5,698,426, 5,763,192, y 5,723,323.

Moléculas pequeñas de unión

[0296] Las moléculas pequeñas de unión son moléculas preferiblemente orgánicas diferentes de oligopéptidos o anticuerpos tal como se definen aquí, que se unen, preferiblemente específicamente, KL β , FGFR o un complejo KL β /FGFR tal como se describen aquí. Las moléculas pequeñas orgánicas de unión se pueden identificar y sintetizar químicamente utilizando metodología conocida (véase, por ejemplo, Publicación PCT Nos. WO00/00823 y WO00/39585). Las moléculas pequeñas orgánicas de unión tienen habitualmente menos de aproximadamente 2000 daltons de tamaño, alternativamente menos de aproximadamente 1500, 750, 500, 250 ó 200 daltons de tamaño, donde dichas moléculas pequeñas orgánicas que son capaces de unirse, preferiblemente específicamente, a un polipéptido tal como se describe aquí, se pueden identificar sin una gran experimentación utilizando técnicas conocidas. En este aspecto, cabe indicar que las técnicas para cribar bibliotecas de moléculas pequeñas orgánicas para moléculas que son capaces de unirse a un polipéptido diana son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, la Publicación PCT Nos. WO00/00823 y WO00/39585). Las moléculas pequeñas orgánicas de unión pueden ser, por ejemplo, aldehídos, cetonas, oximas, hidrazonas, semicarbazonas, carbazidas, aminas primarias, aminas secundarias, aminas terciarias, hidrazinas N-sustituidas, hidrazidas, alcoholes, éteres, tioles, tioéteres, disulfuros, ácidos carboxílicos, ésteres, amidas, ureas, carbamatos, carbonatos, cetales, tiocetales, acetales, tioacetales, haluros de arilo, sulfonatos de arilo, haluros de alquilo, sulfonatos de alquilo, compuestos aromáticos, compuestos heterocíclicos, anilinas, alquenos, alquinos, dioles, amino alcoholes, oxazolidinas, oxazolininas, tiazolidinas, tiazolininas, enaminas, sulfonamidas, epóxidos, aziridinas, isocianatos, cloruros de sulfonilo, compuestos diazo, cloruros de ácido o similares.

Cribado de anticuerpos, oligopéptidos y moléculas pequeñas orgánicas con propiedades deseadas

[0297] En algunas realizaciones, los antagonistas se unen a KL β , y en algunas realizaciones, pueden modular uno o más aspectos de los efectos asociados a KL β , incluyendo, pero sin limitación pueden modular uno o más aspectos de los efectos asociados a KL β , incluyendo, pero sin limitación, unión a FGFR4 (opcionalmente conjuntamente con heparina), unión a FGF19 (opcionalmente conjuntamente con heparina), unión a FGFR4 y FGF19 (opcionalmente conjuntamente con heparina), la inducción de la inducción de cFos, Junb y/o Junc mediada por FGF-19 (in vitro o in vivo), la inducción de la señalización cascada abajo de FGFR4 y/o FGF19 (que incluyen, sin limitación, la fosforilación de FRS2, fosforilación de ERK1/2 y activación del mecanismo de Wnt), y/o inducción de cualquier mecanismo biológico de KL β y/o FGFR4 biológicamente relevante, y/o inducción de un tumor, trastorno proliferativo celular o un cáncer; y/o inducción de un trastorno asociado con la expresión y/o actividad de KL β (tal como una expresión y/o actividad de KL β incrementadas).

[0298] Los anticuerpos purificados se pueden caracterizar además por una serie de ensayos que incluyen, pero sin limitación, secuenciación N-terminal, análisis de aminoácidos, cromatografía líquida a presión elevada (HPLC) de exclusión de tamaño no desnaturizante, espectrometría de masas, cromatografía de intercambio iónico y digestión con papaína.

[0299] En ciertas realizaciones de la invención, los anticuerpos aquí producidos se analizan por su actividad biológica. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención se analizaron por su actividad de unión a antígeno. Los ensayos de unión a antígeno que son conocidos en la técnica y se pueden utilizar aquí incluyen, sin limitación, cualquier ensayo de unión directa o competitiva utilizando técnicas, tales como transferencias, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente unido a enzima), inmunoensayos "sandwich", ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos fluorescentes, e inmunoensayos de proteína A. El ensayo de unión a antígeno ilustrativo se proporciona a continuación en la sección de ejemplos.

[0300] Los anticuerpos contra KL β que poseen las propiedades aquí descritas se pueden obtener mediante el cribado de clones de hibridoma contra KL β para las propiedades deseadas mediante cualquier método conveniente.

[0301] Otros ensayos funcionales para determinar la capacidad de unión de los anticuerpos contra KL β se conocen en la técnica, algunos de ellos se ejemplifican en el presente documento.

[0302] Los anticuerpos contra FGFR4 que poseen las propiedades aquí descritas se pueden obtener mediante el cribado de clones de hibridoma contra FGFR4 para las propiedades deseadas mediante cualquier método conveniente.

[0303] Otros ensayos funcionales para determinar la capacidad de unión de anticuerpos contra FGFR se conocen en la técnica, algunos de ellos se ejemplifican en el presente documento.

[0304] Para cribar anticuerpos, oligopéptidos u otras moléculas pequeñas orgánicas que se unen a un epítipo en un polipéptido unido por un anticuerpo de interés, se puede realizar un ensayo de bloqueo cruzado de rutina, tal como el descrito en Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). Este ensayo se puede utilizar para determinar si un anticuerpo, oligopéptido o molécula pequeña orgánica de ensayo se une al mismo sitio o epítipo que un anticuerpo conocido. Alternativamente, o adicionalmente, la localización de epítopos se puede realizar mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la secuencia de anticuerpos se puede mutagenizar, tal como mediante rastreo de alanina, para identificar residuos de contacto. El anticuerpo mutante se analiza inicialmente por la unión con el anticuerpo policlonal para asegurar el plegamiento correcto. En un método diferente, se pueden utilizar péptidos correspondientes a diferentes regiones de un polipéptido en ensayos de competición con los anticuerpos de prueba o con un anticuerpo de prueba y un anticuerpo con un epítipo caracterizado o conocido.

[0305] En algunas realizaciones, la invención contempla anticuerpos alterados que poseen algunas funciones efectoras pero no todas, que lo convierten en un candidato deseable para muchas aplicaciones en las que la semivida del anticuerpo *in vivo* es importante, aunque ciertas funciones efectoras (como el complemento y ADCC) son innecesarias o perjudiciales. En ciertas realizaciones, se miden las actividades Fc de la inmunoglobulina producida para asegurarse de que sólo se mantienen las propiedades deseadas. Pueden realizarse ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/agotamiento de las actividades CDC y/o ADCC. Por ejemplo, pueden realizarse ensayos de unión a receptor de Fc (FcR) para asegurarse de que el anticuerpo carece de la unión a Fc γ R (de ahí probablemente que carezca de actividad de ADCC), pero conserva la capacidad de unión a FcRn. Las células primarias para mediar ADCC, células NK, expresan Fc γ RIII solo, mientras que los monocitos expresan Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resumen en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991). En las Patentes de Estados Unidos n° 5.500.362 o 5.821.337 se describe un ejemplo de un ensayo *in vitro* para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células asesinas naturales (NK). De modo alternativo, o adicional, puede evaluarse la actividad *in vivo* de ADCC de la molécula de interés, por ejemplo, en un modelo animal como el que se describe en Clynes et al. PNAS (USA) 95:652-656 (1998). También pueden llevarse a cabo ensayos de unión a C $_1$ q para confirmar que el anticuerpo es incapaz de unirse a C $_1$ q y de ahí la falta de actividad de CDC. Para evaluar la activación del complemento, puede realizarse un ensayo de CDC, por ejemplo tal y como se describe en Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996). También pueden realizarse determinaciones de unión de FcRn y purificación/semivida *in vivo* utilizando procedimientos conocidos en la técnica.

[0306] En algunas realizaciones, son útiles los anticuerpos alterados que poseen funciones efectoras incrementadas y/o una vida media incrementada.

Polipéptido y ácidos nucleicos

[0307] Las secuencias de nucleótidos presentan varias aplicaciones en el sector de la biología molecular, así como los usos en terapia, etc. El ácido nucleico que codifica el polipéptido también será útil para la preparación de polipéptidos mediante las técnicas recombinantes aquí descritas, en la que estos polipéptidos son útiles, por ejemplo, en la preparación de anticuerpos tal como se describe aquí.

[0308] Se puede usar el gen de un polipéptido de secuencia nativa y longitud completa, o partes del mismo, como

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

[0309] Otros fragmentos útiles de los ácidos nucleicos que codifican el polipéptido incluyen oligonucleótidos codificantes o no codificantes que comprenden una secuencia de ácido nucleico (o ARN o ADN) de cadena única capaz de unirse a las secuencias diana de ARNm del polipéptido (codificante) o de ADN del polipéptido (no codificante). Los oligonucleótidos no codificantes o codificantes, según la presente invención, comprenden un fragmento de la región codificante de un ADN que codifica hepsina, pro-HGF o fragmentos de unión tal como se describen aquí. Dicho fragmento generalmente comprende por lo menos aproximadamente 14 nucleótidos, preferiblemente de aproximadamente entre 14 y 30 nucleótidos. La capacidad de derivar un oligonucleótido codificante o no codificante, en base a una secuencia de ADNc que codifica una proteína determinada se describe, por ejemplo, en Stein and Cohen (Cancer Res. 48:2659, 1988) y Van der Krol et al. (Bio Techniques 6:958, 1988).

[0310] La unión de oligonucleótidos codificantes o no codificantes a las secuencias de ácido nucleico diana da lugar a la formación de cadenas dobles que bloquean la transcripción o la traducción de la secuencia diana mediante uno de una serie de medios, incluyendo la mayor degradación de las cadenas dobles, la terminación prematura de la transcripción o la traducción, o mediante otros medios. Dichos métodos se describen en la presente invención. Los oligonucleótidos no codificantes se pueden usar por tanto para bloquear la expresión de una proteína, donde la proteína puede jugar un papel en la inducción del cáncer en mamíferos. Los oligonucleótidos codificantes o no codificantes comprenden además oligonucleótidos que tienen esqueletos de azúcar-fosfodiéster modificados (u otras uniones a azúcares, tales como las descritas en WO 91/06629) y donde dichas uniones a azúcares son resistentes a nucleasas endógenas. Dichos oligonucleótidos con uniones a azúcares resistentes son estables *in vivo* (es decir, capaces de resistir la degradación enzimática), pero retienen la especificidad de secuencia para poder unirse a las secuencias de nucleótidos diana.

[0311] Las zonas intragénicas preferidas para la unión no codificante incluyen la región que incorpora el codón de inicio/comienzo de la traducción (5'-AUG, 5'-ATG) o el codón de terminación/parada (5'-UAA, 5'-UAG y 5'-UAG/5'-TAA, 5'-TAG y 5'-TGA) del marco de lectura abierto (ORF) del gen. Estas regiones se refieren a una parte del ANRm o gen que abarca aproximadamente entre 25 y aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir, 5' o 3') desde un codón de inicio o terminación de la traducción. Otras regiones preferidas para la unión no codificante incluyen: intrones; exones; uniones intrón-exón; el marco de lectura abierto (ORF) o "región codificante", que es la zona entre el codón de inicio de la traducción y el codón de terminación de la traducción; la caperuza ("cap") en 5' de un ARNm que comprende un residuo de guanosina de metilado en N7 unido al residuo 5' del ANRm a través de una unión de trifosfato 5'-5' e incluye la propia estructura de caperuza en 5', así como los primeros 50 nucleótidos adyacentes a la caperuza; la región 5' no traducida (5'UTC); la parte de un ANRm en la dirección 5' desde el codón de inicio de la traducción, y de este modo incluyendo nucleótidos entre el sitio de la caperuza en 5' y el codón de inicio de la traducción de un ANRm o los nucleótidos correspondientes en el gen; y la región 3' no traducida (3'UTR), la parte de un ANRm en la dirección 3' desde el codón de terminación de la traducción, y de este modo incluyendo los nucleótidos entre el codón de terminación de la traducción y el extremo 3' de un ANRm o los nucleótidos correspondientes en el gen.

[0312] Entre los ejemplos específicos de compuestos no codificante preferidos útiles para inhibir la expresión de un polipéptido se incluyen oligonucleótidos que contienen esqueletos modificados o uniones entre nucleósidos no naturales. Los oligonucleótidos que presentan esqueletos modificados incluyen aquellos que retienen un átomo de fósforo en el esqueleto y aquellos que no tienen un átomo de fósforo en el esqueleto. Para los objetivos de esta memoria, y tal como se hace referencia a veces en la técnica, los oligonucleótidos modificados que no tienen un átomo de fósforo en su esqueleto entre nucleósidos también pueden considerarse como oligonucleósidos. Entre los esqueletos de oligonucleótidos modificados preferidos se incluyen, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, fosfonatos de metilo y otros alquilo, incluyendo 3'-alquilo fosfonatos, 5'-alquilo fosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos incluyendo 3'-amino fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres, selenofosfatos y borano-fosfatos que tienen uniones normales 3'-5', análogos de estos unidos por 2'-5', y los que

tienen una polaridad invertida, donde una o más uniones entre nucleótidos son una unión 3' a 3', 5' a 5' o 2' a 2'. Los oligonucleótidos preferidos que tienen polaridad invertida comprenden una única unión 3' a 3' en la unión entre nucleótidos en 3', es decir un residuo de nucleósido invertido único que puede ser básico (falta la nucleobase o tiene un grupo hidroxilo en su lugar). También se incluyen varias sales, sales mixtas y formas ácidas libres. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de uniones que contienen fósforo incluyen, pero sin limitación, las patentes de Estados Unidos Nos. 3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5,177,196; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233; 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,306; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361; 5,194,599; 5,565,555; 5,527,899; 5,721,218; 5,672,697 y 5,625,050.

[0313] Los esqueletos de oligonucleótidos preferidos que no incluyen un átomo de fósforo en los mismos presentan esqueletos que están formados por uniones entre nucleósidos con alquilo de cadena corta o cicloalquilo, heteroátomos mezclados y uniones entre nucleósidos con alquilo o cicloalquilo, o una o más uniones entre nucleósidos heteroatómicas o heterocíclicas de cadena corta. Estas incluyen aquellas que tienen uniones morfolino (formadas en parte a partir de la parte de azúcar de un nucleósido); esqueletos de siloxano; esqueletos de sulfuro, sulfóxido y sulfona; esqueletos de formacetilo y tioformacetilo; esqueletos de metilenformacetilo y tioformacetilo; esqueletos de riboacetilo; esqueletos que contienen alqueno; esqueletos de sulfamato; esqueletos de metilenimino y metilenhidrazino; esqueletos de sulfonato y sulfonamida; esqueletos de amida; y otros que tienen partes con componentes N, O, S y CH₂ mezclados. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichos oligonucleótidos incluyen, pero sin limitación, las patentes de Estados Unidos Nos. 5,034,506; 5,166,315; 5,185,444; 5,214,134; 5,216,141; 5,235,033; 5,264,562; 5,264,564; 5,405,938; 5,434,257; 5,466,677; 5,470,967; 5,489,677; 5,541,307; 5,561,225; 5,596,086; 5,602,240; 5,610,289; 5,602,240; 5,608,046; 5,610,289; 5,618,704; 5,623,070; 5,663,312; 5,633,360; 5,677,437; 5,792,608; 5,646,269 y 5,677,439.

[0314] En otros oligonucleótidos no codificantes preferidos, la unión de tanto del azúcar como entre nucleósidos, es decir, el esqueleto, de las unidades de nucleótidos se sustituyen por grupos nuevos. Las unidades de las bases se mantienen para la hibridación con un compuesto de ácidos nucleicos diana apropiado. A uno de dichos compuestos oligoméricos, un oligonucleótido mimético que se ha observado que tiene propiedades de hibridación excelentes, se hace referencia como ácido nucleico de péptido (PNA). En los compuestos PNA, el esqueleto de azúcar de un oligonucleótido se sustituye por un esqueleto que contiene amida, en particular un esqueleto de aminoetilglicina. Las nucleobases se mantienen y están unidas directa o indirectamente a átomos de nitrógeno aza de la parte amida del esqueleto. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de compuestos PNA incluyen, pero sin limitación, las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,539,082; 5,714,331; y 5,719,262. Más sobre los compuestos PNA se puede encontrar en Nielsen et al, Science, 1991, 254, 1497-1500.

[0315] Los oligonucleótidos no codificantes preferidos incorporan esqueletos de fosforotioato y/o esqueletos de heteroátomos, y en particular, -CH₂-NH-O-CH₂-, -CH₂-N(CH₃)-O-CH₂- [conocido como esqueleto metilen (metilimino) o MMI], -CHO-N(CH₃)-CH₂-, -CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-CH₂- y -O-N(CH₃)-CH₂-CH₂- [donde el esqueleto de fosfodiéster nativo está representado como -O-P-O-CH₂-] descrito en la Patente de Estados Unidos No. 5,489,677 indicada anteriormente, y los esqueletos de amida de la Patente de Estados Unidos No. 5,602,240 indicada anteriormente. También se prefieren oligonucleótidos no codificantes que tienen estructuras de esqueleto de morfolino de la Patente de Estados Unidos No. 5,034,506 indicada anteriormente.

[0316] Los oligonucleótidos modificados también pueden contener uno o más grupos azúcar sustituidos. Los oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-alquil, S-alquil, o N-alquil; O-alquénil, S-alquénil, o N-alquénil; O-alquínil, S-alquínil o N-alquínil; o O-alquil-O-alquil, donde el alquil, alquénil y alquínil pueden ser alquilo C₁ a C₁₀ o alquénilo y alquínilo C₂ a C₁₀ sustituidos o no sustituidos. Particularmente preferidos son O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂, y O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, donde n y m son de 1 a aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos no codificantes preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': alquilo inferior de C₁ a C₁₀, alquilo inferior sustituido, alquénilo, alquínilo, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo u O-aralquilo, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, silil sustituido, un grupo divisor de ARN, un grupo informador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida incluye 2'-metoxietoxi (2'-O-CH₂CH₂OCH₃, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE) (Martin et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504) es decir, un grupo alcóxialcoxi. Una modificación adicional incluye 2'-dimetilaminooxietoxi, es decir un grupo O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, también conocido como 2'-DMAOE, tal como se describe en los ejemplos siguientes, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₃)₂.

[0317] Una modificación preferida adicional incluye Ácidos Nucleicos Cerrados (LNAs) en los que el grupo 2'-hidroxilo se une al átomo de carbono 3' ó 4' del anillo de azúcar formando así un grupo de azúcares bicíclicos. La unión es preferiblemente un grupo metileno (-CH₂-)_n que une el átomo de oxígeno 2' y el átomo de carbono 4', donde n es 1 ó 2. Los LNAs y la preparación de los mismos se describen en WO 98/39352 y WO 99/14226.

[0318] Otras modificaciones preferidas incluyen 2'-metoxi (2'-O-CH₃), 2'-aminopropoxi (2'-OCH₂CH₂CH₂ NH₂), 2'-alil (2'-CH₂-CH=CH₂), 2'-O-alil (2'-O-CH₂-CH=CH₂) y 2'-fluoro (2'-F). La modificación en 2' puede ser en la posición arabino (arriba) o la posición ribo (abajo). Una modificación 2'-arabino preferida es 2'-F. También se pueden realizar modificaciones similares en otras posiciones en el oligonucleótido, particularmente en la posición 3' del azúcar en el nucleótidos 3' terminal o en oligonucleótidos unidos 2'-5' y la posición 5' del nucleótido terminal 5'. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcares, tales como grupos ciclobutilo en lugar de azúcares pentofuranosilo. Las patentes representativas de Estados Unidos que enseñan la preparación de dichas estructuras de azúcares modificados incluyen, pero sin limitación, las patentes de Estados Unidos Nos. 4,981,957; 5,118,800; 5,319,080; 5,359,044; 5,393,878; 5,446,137; 5,466,786; 5,514,785; 5,519,134; 5,567,811; 5,576,427; 5,591,722; 5,597,909; 5,610,300; 5,627,053; 5,639,873; 5,646,265; 5,658,873; 5,670,633; 5,792,747; y 5,700,920.

[0319] Los oligonucleótidos también pueden incluir modificaciones o sustituciones de nucleobases (a menudo referidos en la técnica simplemente como "bases"). Tal como se utiliza aquí, las nucleobases "no modificadas" o "naturales" incluyen las bases purínicas adenina (A) y guanina (G) y las bases pirimidínicas timina (T), citosina (C) y uracil (U). Las nucleobases modificadas incluyen otras nucleobases sintéticas y naturales, tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propil y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracil, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracil y citosina, 5-propinil (-C≡C-CH₃ o -CH₂-C≡CH) uracil y cytosine y otros derivados alquinilo de bases pirimidínicas, 6-azo uracil, citosina y timina, 5-uracil (pseudouracil), 4-tiouracil, 8-halo, 8-amino, 8-til, 8-tioalquil, 8-hidroxil y otras adeninas y guaninas 8-sustituidas, 5-halo particularmente 5-bromo, 5-trifluorometil y otros uraciles y citosinas 5-sustituidos, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-amino-adenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-desazaguanina y 7-desazaadenina y 3-desazaguanina y 3-desazaadenina. Nucleobases modificadas adicionales incluyen pirimidinas tricíclicas, tales como fenoxazin citidina (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), fenotiazin citidina (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzotiazin-2(3H)-ona), abrazaderas G, tales como una fenoxazin citidina sustituida (por ejemplo, 9-(2-aminoetoxi)-H-pirimido [5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), carbazol citidina (2H-pirimido[4,5-b]indol-2-ona), piridoindol citidina (H-pirido[3',2':4,5]pirrol[2,3-d]pirimidin-2-ona). Las nucleobases modificadas también pueden incluir aquellas en las que la base purínica o pirimidínica se sustituye por otros heterociclos, por ejemplo, 7-desaza-adenina, 7-desazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Más nucleobases incluyen las descritas en la patente de Estados Unidos No. 3,687,808, las descritas en The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, páginas 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990, y las descritas por Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613. Algunas de estas nucleobases son particularmente útiles para incrementar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la solicitud. Entre éstas se incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas, incluyendo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracil y 5-propinilcitosina. Se ha observado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad de las dobles cadenas de ácido nucleico en 0,6-1,2 grados C. (Sanghvi et al, Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) y son sustituciones de bases preferidas, incluso más particularmente cuando se combinan con modificaciones de los azúcares 2'-O-metoxietil. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de nucleobases modificadas incluyen, pero sin limitación, Patente de Estados Unidos No. 3,687,808, así como las Patentes de estados Unidos No.: 4,845,205; 5,130,302; 5,134,066; 5,175,273; 5,367,066; 5,432,272; 5,457,187; 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711; 5,552,540; 5,587,469; 5,594,121, 5,596,091; 5,614,617; 5,645,985; 5,830,653; 5,763,583; 6,005,096; 5,681,941 y 5,750,692.

[0320] Otra modificación de oligonucleótidos no codificantes que se unen químicamente a uno o más grupos del oligonucleótido o conjugados que aumentan la actividad, la distribución celular o la captación celular del oligonucleótido. Los compuestos de la invención pueden incluir grupos conjugados unidos covalentemente a grupos funcionales, tales como grupos hidroxilo primarios o secundarios. Los grupos conjugados de la invención incluyen intercaladores, moléculas informadoras, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, poliéteres, grupos que aumentan las propiedades farmacodinámicas de oligómeros y grupos que aumentan las propiedades farmacocinéticas de los oligómeros. Los grupos conjugados típicos incluyen colesteroles, lípidos, lípidos catiónicos, fosfolípidos, fosfolípidos catiónicos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, coumarinas y colorantes. Los grupos que aumentan las propiedades farmacodinámicas, en este contexto de la invención, incluye grupos que mejoran la captación del oligómero, aumentan la resistencia del oligómero a la degradación y/o fortalecen la hibridación específica de secuencia con ARN. Los grupos que aumentan las propiedades farmacocinéticas, en este contexto de la invención, incluyen grupos que mejoran la captación, distribución, metabolismo o excreción de oligómero. Los grupos conjugados incluyen, pero sin limitación, grupos lipídicos, tales como un grupo colesterol (Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553-6556), ácido cólico (Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4, 1053-1060), un tióéter, por ejemplo, hexil-S-tritilol (Manoharan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306-309; Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3, 2765-2770), un tiocolesterol (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538), una cadena alifática, por ejemplo, dodecandiol o residuos undecilo (Saison-Behmoaras et al., EMBO J., 1991, 10, 1111-1118; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259, 327-330; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75, 49-54), un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicerol-3-H-fosfonato de trietil-amonio (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783), una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973), o ácido acético adamantano (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654), un grupo palmitil (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-

237), o un grupo octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol. Los oligonucleótidos de la invención también se pueden conjugar a sustancias farmacológica activas, por ejemplo, aspirina, warfarin, fenilbutazona, ibuprofeno, suprofen, fenbufeno, cetoprofeno, (S)-(+)-pranoprofeno, carprofeno, dansilsarcosina, ácido 2,3,5-triyodobenzoico, ácido flufenámico, ácido folínico, una benzotiadiazida, clorotiazida, una diazepina, indometicina, un barbiturato, una cefalosporina, un fármaco sulfa, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico. Los conjugados oligonucleótido-fármaco y su preparación se describen en las solicitudes de Patente de Estados Unidos. No. Ser 09/334,130 (presentada el 15 Junio de 1999) y las patentes de Estados Unidos Nos.: 4,828,979; 4,948,882; 5,218,105; 5,525,465; 5,541,313; 5,545,730; 5,552,538; 5,578,717; 5,580,731; 5,580,731; 5,591,584; 5,109,124; 5,118,802; 5,138,045; 5,414,077; 5,486,603; 5,512,439; 5,578,718; 5,608,046; 4,587,044; 4,605,735; 4,667,025; 4,762,779; 4,789,737; 4,824,941; 4,835,263; 4,876,335; 4,904,582; 4,958,013; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,243,022; 5,254,469; 3,258,506; 5,262,536; 5,272,250; 3,292,873; 5,317,098; 3,371,241; 5,391,723; 5,416,203; 5,451,463; 5,510,475; 5,512,667; 5,514,785; 5,565,552; 5,567,810; 5,574,142; 5,585,481; 5,587,371; 5,595,726; 5,597,696; 5,599,923; 5,599,928 y 5,688,941.

[0321] No es necesario que todas las posiciones de un compuesto determinado se modifiquen uniformemente, y de hecho, se pueden incorporar más de una de las modificaciones mencionadas anteriormente en un único compuesto o incluso en un único nucleósido en un oligonucleótido. La presente invención también incluye compuestos no codificantes que con compuestos quiméricos. Los compuestos no codificantes "quiméricos" o "quimeras", en el contexto de esta solicitud, son compuestos no codificantes, particularmente oligonucleótidos, que contiene dos o más regiones químicamente distintas, cada una formada por lo menos una unidad monomérica, es decir, un nucleótidos en el caso de un compuesto oligonucleótido. Estos oligonucleótidos contienen habitualmente por lo menos una región en la que se modifica el oligonucleótido para conferir al oligonucleótido una mayor resistencia a la degradación por nucleasa, una mayor captación celular y/o una mayor afinidad de unión por el ácido nucleico diana. Una región adicional del oligonucleótido puede servir como sustrato para enzimas capaces de dividir los híbridos ARN:ADN o ARN:ARN. A modo de ejemplo, la ARNasa H es una endonucleasa celular que divide la cadena de ARN de la cadena doble ARN:ADN. La activación de ARNasa H, por tanto, da lugar a la división del ARN diana, aumentando ampliamente así la eficacia de la inhibición de oligonucleótidos de la expresión génica. Consecuentemente, se pueden obtener a menudo resultados comparables con oligonucleótidos más cortos cuando se utilizan oligonucleótidos quiméricos, en comparación con desoxi oligonucleótidos fosforotioato que se hibridan a la misma región diana. Los compuestos no codificantes quiméricos se pueden formar como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, miméticos de oligonucleósidos y/o oligonucleótidos tal como se han descrito anteriormente. Los oligonucleótidos no codificantes quiméricos preferidos incorporan por lo menos una azúcar modificado en 2' (preferiblemente 2'-O-(CH₂)₂-O-CH₃) en el extremo 3' terminal para conferir resistencia a la nucleasa y una región con por lo menos 4 azúcares 2'-H contiguas para conferir la actividad de ARNasa H. Dichos compuestos también se refieren en la técnica como híbridos o espaciómeros ("gapmers"). Los "gapmers" preferidos tienen una región de azúcares modificados en 2' (2'-O-(CH₂)₂-O-CH₃) en el extremo 3' terminal y el extremo 5' terminal separados por lo menos una región que tiene por lo menos 4 azúcares 2'-H contiguos y preferiblemente incorporan uniones de la estructura de fosforotioato. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichas estructuras híbridas incluyen, pero sin limitación, las patentes de Estados Unidos Nos. 5,013,830; 5,149,797; 5,220,007; 5,256,775; 5,366,978; 5,403,711; 5,491,133; 5,565,350; 5,623,065; S, 652,355; 5,652,356; y 5,700,922.

[0322] Los compuestos no codificantes utilizados según la presente descripción se pueden fabricar convenientemente y rutinariamente a través de la técnica conocida de la síntesis de fase sólida. El equipo para dicha síntesis es comercializado por varios vendedores incluyendo, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, Calif.). Se puede utilizar, adicional o alternativamente, cualquier otro medio para dicha síntesis conocida en la técnica. Se conoce que se utilizan técnicas similares para preparar oligonucleótidos, tales como los fosforotioatos y derivados alquilados. Los compuestos de la invención también se pueden mezclarse, encapsularse, conjugarse o en cualquier caso asociarse con otras moléculas, estructuras moleculares o mezclas de compuestos, tales como, por ejemplo, liposomas, moléculas dirigidas a receptor, formulaciones orales, rectales, tópicas u otras, para ayudar en la captación, distribución, y/o absorción. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichas formulaciones auxiliares de captación, distribución y/o absorción incluyen, pero sin limitación, las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,108,921; 5,354,844; 5,416,016; 5,459,127; 5,321,291; 5,543,158; 5,547,932; 5,583,020; 5,591,721; 4,426,330; 4,534,899; 5,013,556; 5,108,921; 5,213,804; 5,227,170; 5,264,221; 5,356,633; 5,395,619; 5,416,016; 5,417,978; 5,462,854; 5,469,854; 5,512,295; 5,527,528; 5,534,259; 5,543,152; 5,556,948; 5,580,575; y 5,595,756.

[0323] Otros ejemplos de oligonucleótidos codificante o no codificantes incluyen aquellos oligonucleótidos que están unidos covalentemente a grupos orgánicos, tales como los descritos en WO 90/10048, y otros grupos que aumentan la afinidad del oligonucleótido por una secuencia de ácido nucleico diana, tal como poli-(L-lisina). Además, agentes intercalantes, tales como elipticina, y agentes alquilantes o complejos metálicos, se pueden unir a oligonucleótidos codificantes o no codificantes para modificar las especificidades de unión del oligonucleótido codificante o no codificante por la secuencia de nucleótidos diana.

[0324] Los oligonucleótido no codificantes o codificante se pueden introducir en una célula que contiene la secuencia de ácidos nucleicos diana mediante cualquier método de transferencia génica, incluyendo, por ejemplo, la

electroporación de transfección de ADN mediada por CaPO_4 , o mediante la utilización de vectores de transferencia génica, tales como el virus Epstein-Barr. En un procedimiento preferido, se inserta un oligonucleótido no codificante o codificante en un vector retroviral adecuado. Se pone en contacto una célula que contiene la secuencia de ácidos nucleicos diana con el vector retroviral recombinante, in vivo o ex vivo. Entre los vectores retrovirales adecuados se incluyen, pero sin limitación, los derivados de los retrovirus murinos M-MuLV, N2 (un retrovirus derivado de M-MuLV), o los vectores de la doble copia designados como DCT5A, DCT5B y DCT5C (véase WO 90/13641).

[0325] Los oligonucleótidos codificante o no codificantes también se pueden introducir en una célula que contiene la secuencia de nucleótidos diana mediante la formación de un conjugado con una molécula de unión a ligando, tal como se describe en WO 91/04753. Las moléculas de unión a ligando adecuadas incluyen, pero sin limitación, receptores de la superficie celular, factores de crecimiento, otras citoquinas u otros ligandos que se unen a receptores de la superficie celular. Preferiblemente, la conjugación de la molécula de unión a ligando no interfiere sustancialmente con la capacidad de la molécula de unión a ligando de unirse a su molécula o receptor correspondiente, o de bloquear la entrada del oligonucleótido codificante o no codificante o su conjugado en la célula.

[0326] Alternativamente, un oligonucleótido codificante o no codificante se puede introducir en una célula que contiene la secuencia de ácido nucleico diana mediante la formación de un complejo oligonucleótido-lípido, tal como se describe en WO 90/10448. El complejo de oligonucleótido codificante o no codificante-lípido se disocia preferiblemente en la célula mediante una lipasa endógena.

[0327] Las moléculas ARN o ADN no codificante o codificantes tienen generalmente por lo menos aproximadamente 5 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, ó 1000 nucleótidos de longitud, donde en este contexto el término "aproximadamente" significa la longitud de la secuencia de nucleótidos de referencia más o menos 10% de esa longitud de referencia.

[0328] Las sondas se pueden emplear en técnicas de PCR para generar un grupo de secuencias para identificar secuencias codificantes de polipéptido estrechamente relacionadas.

[0329] Las secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido se pueden usar además para construir sondas de hibridación para la localización del gen que codifica este polipéptido y para el análisis genético de individuos con alteraciones genéticas. Las secuencias de nucleótidos proporcionadas en la presente invención se pueden usar para la localización de un cromosoma y regiones específicas del cromosoma usando técnicas conocidas como la hibridación *in situ*, análisis de unión frente marcadores cromosómicos conocidos y cribado de bibliotecas por hibridación.

[0330] El polipéptido se puede usar en análisis para identificar otras proteínas o moléculas implicadas en la interacción de unión con el polipéptido. Mediante dichos métodos, se pueden identificar inhibidores de la interacción de unión receptor/ligando. Las proteínas implicadas en dichas interacciones de unión se pueden usar además para cribar péptidos o pequeñas moléculas inhibidoras de la interacción de unión. Se pueden diseñar ensayos de cribado para encontrar compuestos candidatos que mimeticen la actividad biológica de un polipéptido nativo o un receptor para el polipéptido. Dichos ensayos de cribado incluirán ensayos susceptibles para un cribado de alto rendimiento de bibliotecas químicas, haciéndolas particularmente adecuadas para identificar candidatos farmacológicos de molécula pequeña. Las moléculas pequeñas contempladas incluyen compuestos orgánicos o inorgánicos sintéticos. Los ensayos se pueden realizar en varios formatos, incluyendo los ensayos de unión proteína-proteína, ensayos de cribado bioquímico, inmunoensayos y ensayos celulares, que están caracterizados en la técnica.

[0331] Los ácidos nucleicos que codifican un polipéptido o sus formas modificadas se pueden usar además para generar animales transgénicos o animales "*knock out*" que, a su vez, son útiles en el desarrollo y cribado de reactivos terapéuticamente útiles. Un animal transgénico (por ejemplo, un ratón o una rata) es un animal que tiene células que contienen un transgén, el cual fue introducido en el animal o un ascendente del animal en una etapa prenatal, por ejemplo, en una etapa embrionaria. Un transgén es un ADN que se integra en el genoma de una célula a partir del cual se desarrolla un animal. En una realización, el ADNc que codifica un polipéptido se puede utilizar para clonar ADN genómico que codifique el polipéptido según las técnicas establecidas y las secuencias genómicas usadas para generar los animales transgénicos que contienen las células que expresan el ADN que codifica el polipéptido. Los procedimientos para generar animales transgénicos, particularmente animales como ratones o ratas, se han convertido en convencionales en la técnica y se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 4.736.866 y 4.870.009. Habitualmente, las células particulares serán las dianas para la incorporación de un transgén del polipéptido con potenciadores específicos de tejido. Los animales transgénicos que incluyen una copia de un transgén que codifica un polipéptido introducido en la línea germinal del animal en una etapa embrionaria se pueden usar para examinar el efecto de la expresión aumentada del ADN que codifica el polipéptido. Dichos animales se pueden usar como animales de prueba para reactivos que se cree que confieren protección frente, por ejemplo, a estados patológicos asociados

con su sobreexpresión. Según este aspecto de la invención, se trata un animal con el reactivo y una incidencia reducida del estado patológico en comparación con los animales sin tratar que lleven el transgén, indicaría una intervención terapéutica potencial para el estado patológico.

[0332] Alternativamente, se pueden usar homólogos no humanos de un polipéptido para construir un animal "*knock out*" en un gen que tiene un gen defectuoso o alterado que codifica el polipéptido como resultado de una recombinación homóloga entre el gen endógeno que codifica el polipéptido y un ADN genómico alterado que codifica el polipéptido introducido en una célula madre embrionaria del animal. Por ejemplo, se puede utilizar ADNc que codifica el polipéptido para clonar ADN genómico que codifica el polipéptido según las técnicas establecidas. Se puede eliminar o reemplazar una parte del ADN genómico que codifica el polipéptido por otro gen, tal como un gen que codifica un marcador de selección que se usa para controlar la integración. Habitualmente, se incluyen en el vector varias kilobases de ADN flanqueante no alterado (tanto en el extremo 5' como en el 3') [ver, por ejemplo, Thomas y Capecchi, *Cell*, 51: 503 (1987) para una descripción de vectores de recombinación homóloga]. El vector se introduce en una línea celular madre embrionaria (por ejemplo por electroporación) y se seleccionan las células en las que el ADN introducido se ha recombinado homológamente con el ADN endógeno [ver por ejemplo, Li y col., *Cell*, 69: 915 (1992)]. Las células seleccionadas se inyectan entonces en un blastocito de un animal (por ejemplo, ratón o rata) para formar quimeras de agregación [ver por ejemplo, Bradley, en "Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach", E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), págs 113-125]. Un embrión quimérico se puede después implantar en un animal de crianza hembra pseudopreñada adecuada y el embrión nace para crear un animal "*knock out*". La progenie que porta el ADN recombinado homológamente en sus células germinales se puede identificar mediante técnicas habituales y se puede usar para criar animales en los que todas las células del animal contengan el ADN recombinado homológamente. Los animales "*knock out*" se pueden caracterizar por ejemplo, por su capacidad de defenderse frente ciertos estados patológicos y por su desarrollo de estados patológicos debido a la ausencia del polipéptido.

[0333] El ácido nucleico que codifica los polipéptidos también se pueden utilizar en terapia génica. En las aplicaciones de terapia génica, se introducen los genes en células con el fin de conseguir la síntesis *in vivo* de un producto genético terapéuticamente eficaz, por ejemplo, para la sustitución de un gen defectuoso. "Terapia génica" incluye tanto la terapia génica convencionales en la que se consigue un efecto duradero mediante un único tratamiento, como la administración de agentes terapéuticos génicos, lo cual implica la administración de una vez o repetida de un ADN o ARNm terapéuticamente eficaz. Se pueden utilizar ARNs o ADNs no codificantes como agentes terapéuticos para bloquear la expresión de ciertos genes *in vivo*. Se ha observado que se pueden importar oligonucleótidos no codificantes cortos en células en las que actúan como inhibidores, a pesar de sus concentraciones intracelulares bajas causadas por su captación limitada por la membrana celular. (Zamenick et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 4143-4146 [1986]). Los oligonucleótidos se pueden modificar para aumentar su captación, por ejemplo, mediante la sustitución de sus grupos fosfodiéster cargados negativamente por grupos no cargados.

[0334] Existen una serie de técnicas disponibles para introducir ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas varían dependiendo de si el ácido nucleico se transfiere en células cultivadas *in vitro*, o *in vivo* en las células del huésped pretendido. Las técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico en células de mamíferos *in vitro* incluyen el uso de liposomas, electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano, el método de precipitación con fosfato de calcio, etc. Entre las técnicas actuales de transferencia de genes *in vivo* preferidas se incluyen la transfección con vectores virales (habitualmente retrovirales) y transfección mediada por liposomas recubiertos de proteína viral (Dzau et al., *Trends in Biotechnology* 11, 205-210 [1993]). En algunas situaciones, es deseable proporcionar la fuente de ácido nucleico con un agente que reconoce las células diana, tales como un anticuerpo específico para una proteína de membrana de la superficie celular o la célula diana, un ligando para un receptor en la célula diana, etc. Cuando se utilizan liposomas, se pueden utilizar proteínas que se unen a una proteína de membrana de la superficie celular asociada con endocitosis para el reconocimiento y/o facilitar la captación de, por ejemplo, proteínas cápside o fragmentos de las mismas trópicas para un tipo de célula concreta, anticuerpos para proteínas que experimentan la internalización en el ciclo, y proteínas que dirigen la localización intracelular y aumentan la vida media intracelular. La técnica de endocitosis mediada por receptor es descrita, por ejemplo, por Wu et al., *J. Biol. Chem.* 262: 4429-4432 (1987); y Wagner et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 3410-3414 (1990). Para una revisión de los protocolos de marcaje génico y terapia génica, véase Anderson et al., *Science* 256: 808-813 (1992).

Métodos que implican cribado

[0335] Las invenciones comprenden métodos de cribado de compuestos para identificar aquellos que previenen el efecto del polipéptido (antagonistas) o inducen el efecto del polipéptido (agonista). Los ensayos de cribado para los fármacos candidatos antagonistas se diseñan para identificar compuestos que se unen o complejan con los polipéptidos codificados por los genes identificados en el presente documento, o que en cualquier caso, interfieren con la interacción de los polipéptidos codificados con otras proteínas celulares, que incluyen, por ejemplo, la inhibición de la expresión del polipéptido de las células. Dichos ensayos de cribado incluirán ensayos susceptibles de cribado de alto rendimiento de bibliotecas químicas que los hacen particularmente adecuados para identificar candidatos de fármacos de molécula pequeña.

[0336] Los ensayos se pueden realizar en una variedad de formatos, que incluyen ensayos de unión proteína-proteína, ensayos de cribado bioquímico, inmunoensayos y ensayos basados en células, que están caracterizados en la técnica.

[0337] Todos los ensayos para antagonistas son comunes en que requieren el contacto del fármaco candidato con un polipéptido codificado por un ácido nucleico identificado en el presente documento bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir la interacción de estos dos componentes.

[0338] 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 o el fármaco candidato se inmovilizan sobre una fase sólida, por ejemplo, en una placa de microtitulación, mediante uniones covalentes o no covalentes. La unión no covalente generalmente se realiza mediante el recubrimiento de la superficie sólida con una solución del polipéptido y dejándolo secar. Alternativamente, puede utilizarse un anticuerpo inmovilizado, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, específico para el polipéptido a ser inmovilizado para fijarlo a una superficie sólida. El ensayo se realiza añadiendo el componente no inmovilizado, que puede estar marcado con un marcador detectable, al componente inmovilizado, por ejemplo, la superficie recubierta que contiene el componente fijado. Cuando la reacción se ha completado, se eliminan los componentes que no han reaccionado, por ejemplo, mediante lavado, y se detectan los complejos fijados en la superficie sólida. Cuando el componente originalmente no inmovilizado transporta un marcador detectable, la detección del marcador inmovilizado en la superficie indica que el complejo se ha formado. Cuando el componente originalmente no inmovilizado no transporta un marcador, se puede detectar la formación del complejo, por ejemplo, usando un anticuerpo marcado que se une específicamente al complejo inmovilizado.

[0339] Si el compuesto candidato interacciona pero no se une a un polipéptido, su interacción con este polipéptido puede ser analizada mediante procedimientos bien conocidos para detectar interacciones proteína-proteína. Dichos ensayos incluyen estrategias tradicionales, tales como el entrecruzamiento, la coimmunoprecipitación, y la copurificación a través de gradientes o en columnas cromatográficas. Además, las interacciones proteína-proteína pueden controlarse utilizando un sistema genético basado en levaduras descrito por Fields y colaboradores [Fields and Song, *Nature*, 340:245-246 (1989); Chien et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:9578-9582 (1991)] como se describe en Chevray y Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5789-5793 (1991)]. Muchos activadores transcripcionales, tales como GAL4 de levadura, consisten en dos dominios modulares físicamente discretos, uno que actúa como el dominio de unión a ADN, mientras que el otro funciona como el dominio de activación de la transcripción. El sistema de expresión en levaduras descrito en las publicaciones antes mencionadas (generalmente denominados como "sistema del doble híbrido") aprovecha esta propiedad, y utiliza dos proteínas híbridas, una en la que la proteína diana se fusiona al dominio de unión a ADN de GAL4, y otra en la que las proteínas activadoras candidatas se fusionan al dominio de activación. La expresión de un gen informador GAL1/lacZ bajo el control de un promotor activado por GAL4, depende de la reconstitución de la actividad GAL4 a través de la interacción proteína-proteína. Las colonias que contienen polipéptidos que interaccionan se detectan con un sustrato cromogénico para la β -galactosidasa. Existe un kit completo (MATCHMAKER™) disponible comercialmente por Clontech para la identificación de interacciones proteína-proteína entre dos proteínas específicas usando la técnica del doble híbrido. Este sistema también puede extenderse para localizar dominios proteicos implicados en interacciones proteicas específicas, así como para señalar los residuos de aminoácidos que son cruciales para estas interacciones.

[0340] Los compuestos que interfieren con la interacción de un gen que codifica un polipéptido identificado aquí y otros componentes intra o extracelulares pueden ser analizados tal como se indica a continuación: habitualmente se prepara una mezcla de reacción que contiene el producto del gen y el componente intra o extracelular en condiciones y durante un tiempo para permitir la interacción y la unión de los dos productos. Para analizar la capacidad de un compuesto a analizar para inhibir la unión, la reacción se realiza en ausencia y en presencia del compuesto a analizar. Además, puede añadirse un placebo a una tercera mezcla de reacción para utilizarse como control positivo. La unión (formación del complejo) entre el compuesto a analizar y el componente intra o extracelular presente en la mezcla se controla tal como se describió anteriormente. La formación de un complejo en la reacción o reacciones de control, pero no en la mezcla de reacción, que contiene el compuesto a analizar indica que el compuesto a analizar interfiere con la interacción del compuesto a analizar y su pareja de reacción.

[0341] Para analizar antagonistas, el polipéptido puede añadirse a una célula junto con el compuesto a cribar por una actividad particular y la capacidad del compuesto para inhibir la actividad de interés en presencia del polipéptido indica que el compuesto es un antagonista del polipéptido. Alternativamente, se pueden detectar antagonistas mediante la combinación del polipéptido y un potencial antagonista con receptores del polipéptido unidos a membrana o receptores codificados bajo condiciones adecuadas para un ensayo de inhibición competitiva. El polipéptido puede marcarse, mediante, por ejemplo, radioactividad, de manera que el número de moléculas del polipéptido unidas al receptor pueden usarse para determinar la eficacia del potencial antagonista. El gen que codifica el receptor puede identificarse mediante numerosos procedimientos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, "panning" de ligandos y separación por FACS. Coligan et al., *Current Protocols in Immun.*, 1(2): capítulo 5(1991). Preferiblemente, se emplea la clonación de expresión donde se prepara ARN poliadenilado a partir de una célula sensible al polipéptido y una biblioteca de ADNc creada a partir de este ARN se divide en grupos y se usa para transfectar células COS u otras células que no son sensibles al polipéptido. Las células transfectadas que crecen en portaobjetos de cristal se exponen al polipéptido marcado. El polipéptido puede marcarse mediante

distintos medios incluyendo la yodación o la inclusión de un sitio de reconocimiento para una proteína quinasa específica para un sitio. Tras la fijación e incubación, los portaobjetos se someten a un análisis autorradiográfico. Los grupos positivos se identifican y se preparan subgrupos y se retransfectan usando un proceso interactivo de subagrupamiento y recibado, que finalmente producen un único clon que codifica el posible receptor.

[0342] Como estrategia alternativa para la identificación de un receptor, el polipéptido marcado puede unirse por fotoafinidad con preparaciones de membrana o extractos celulares que expresan la molécula receptora. El material entrecruzado se separa por PAGE y se expone a una película de rayos X. El complejo marcado que contiene el receptor puede cortarse, separarse en pequeños fragmentos y someterse a microsecuenciación de proteínas. La secuencia de aminoácidos obtenida por microsecuenciación se utilizaría para diseñar un conjunto de sondas de oligonucleótidos degenerados para cribar una biblioteca de ADNc para identificar el gen que codifica el posible receptor.

[0343] En otro ensayo para antagonistas, se incubarían células de mamífero o una preparación de membrana que expresan el receptor con el polipéptido marcado en presencia del compuesto candidato. A continuación, se podría medir la capacidad del compuesto de aumentar o bloquear esta interacción.

[0344] Ejemplos más específicos de potenciales antagonistas incluyen un oligonucleótido que se une a las fusiones de inmunoglobulina con un polipéptido y, en particular, anticuerpos que incluyen, sin limitación, anticuerpos policlonales y monoclonales y fragmentos de anticuerpos, anticuerpos de cadena única, anticuerpos antiidiotípicos, y versiones quiméricas o humanizadas de dichos anticuerpos o fragmentos, así como anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos. Alternativamente, un potencial antagonista puede ser una proteína estrechamente relacionada, por ejemplo, una forma mutada del polipéptido que reconozca el receptor, pero que no ejerza ningún efecto, inhibiendo así competitivamente la acción del polipéptido.

[0345] Otro antagonista potencial es una construcción de ARN o ADN no codificante preparada usando la tecnología antisentido, donde, por ejemplo, una molécula de ADN o ARN no codificante actúa bloqueando directamente la traducción de ARNm mediante la hibridación con el ARNm diana y evitando la traducción de la proteína. La tecnología antisentido puede usarse para controlar la expresión génica a través de la formación de una triple hélice o del ADN o ARN no codificante, ambos procedimientos basados en la unión de un polinucleótido al ADN o al ARN. Por ejemplo, la región codificante 5' de la secuencia de polinucleótidos, que codifica los polipéptidos maduros del presente documento se puede usar para diseñar un oligonucleótido de ARN no codificante de aproximadamente 10 a 40 pares de bases de longitud. Se diseña un oligonucleótido de ADN que sea complementario a una región del gen implicado en la transcripción (triple hélice- véase, Lee et al., Nucl. Acids Res., 6: 3073 (1979); Cooney et al., Science, 241:456 (1988); Dervan et al., Science, 251:1360 (1991)], evitando así la transcripción y la producción del polipéptido. El oligonucleótido de ARN no codificante se hibrida con el ARNm *in vivo* y bloquea la traducción de la molécula de ARNm en el polipéptido (no codificante-Okano, Neurochem., 56:560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression (CRC Press: Boca Raton, FL, 1988). Los oligonucleótidos descritos anteriormente pueden también liberarse a células, de manera que el ARN o ADN antisentido puede ser expresado *in vivo* para inhibir la producción del polipéptido. Cuando se usa un ADN no codificante, se prefieren oligodesoxirribonucleótidos derivados del sitio de inicio de la traducción, por ejemplo, entre las posiciones de aproximadamente -10 a +10 de la secuencia de nucleótidos del gen diana.

[0346] Entre los potenciales antagonistas se incluyen moléculas pequeñas que se unen al sitio activo, al sitio de unión al receptor, o al factor de crecimiento u otro sitio de unión relevante del polipéptido, bloqueando así la actividad biológica normal del polipéptido. Entre los ejemplos de pequeñas moléculas se incluyen, pero sin limitación, pequeños péptidos o moléculas de tipo peptídico, preferiblemente, péptidos solubles, y compuestos orgánicos o inorgánicos no peptídicos sintéticos.

[0347] Las ribozimas son moléculas de ARN enzimáticas capaces de catalizar la fragmentación específica del ARN. Las ribozimas actúan mediante hibridación específica de secuencia al ARN diana complementario, seguido por la división endonucleolítica. Los sitios de fragmentación específica de la ribozima en una diana potencial de ARN se pueden identificar mediante técnicas conocidas. Para más detalles véase, por ejemplo, Rossi Current Biology, 4: 469-471 (1994), y la publicación PCT WO97/33.551 (publicada el 18 de septiembre de 1997).

[0348] Las moléculas de ácido nucleico en formación de triple hélice usadas para inhibir la transcripción deberán ser de cadena sencilla y compuestas de desoxinucleótidos. La composición de bases de estos oligonucleótidos se diseña de manera que se induce la formación de la triple hélice a través de las reglas de emparejamiento de bases de Hoogsteen, las cuales generalmente requieren considerables tramos adaptables de purinas o pirimidinas en una cadena de la cadena doble. Para más detalles véase, por ejemplo, la publicación PCT WO 97/33551, *supra*.

[0349] Estas pequeñas moléculas pueden identificarse mediante uno o más de los ensayos de cribado descritos aquí anteriormente y/o mediante cualquier otra técnica de cribado bien conocida por los expertos en la materia.

[0350] El ácido nucleico que codifica el polipéptido aislado se puede utilizar aquí para la producción recombinante de polipéptido utilizando técnicas conocidas en el sector y tal como se describen aquí. A su vez, los polipéptidos

producidos se pueden utilizar para generar anticuerpos utilizando técnicas conocidas en el sector y tal como se describen aquí.

[0351] Los anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido identificado aquí, así como otras moléculas identificadas por los ensayos de cribado descritos anteriormente aquí, se pueden administrar para el tratamiento de varios trastornos, incluyendo cáncer, en forma de composiciones farmacéuticas.

[0352] Si el polipéptido es intracelular y se utilizan anticuerpos completos como inhibidores, se prefieren anticuerpos de internalización. Sin embargo, también se pueden utilizar lipofecciones o liposomas para liberar el anticuerpo o un fragmento de anticuerpo en las células. Cuando se utilizan fragmentos de anticuerpo, se prefiere el fragmento inhibidor más pequeño que se una específicamente al dominio de unión del antígeno. Por ejemplo, en base a las secuencias de región variable de un anticuerpo, se pueden diseñar moléculas peptídicas que mantienen la capacidad de unirse a la secuencia de antígeno. Dichos péptidos se pueden sintetizar químicamente y/o producir mediante tecnología de ADN recombinante. Véase, por ejemplo, Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993).

Formulaciones farmacéuticas

[0353] Se preparan formulaciones terapéuticas que comprende un anticuerpo para su almacenamiento mezclando el anticuerpo que presenta el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizantes opcionales farmacéuticamente aceptables (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. ed. [1980]), en forma de soluciones acuosas, formulaciones liofilizadas o secadas de otro modo. Los portadores, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones, tales como fosfato, citrato, histidina y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como, cloruro de octadecildimetilbenzil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos, tales como el metil o propil paraben; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como, polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos incluyendo la glucosa, la manosa, o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de proteína-Zn); y/o tensoactivos no iónicos, tales como TWEENTM, PLURONICSTM o polietilenglicol (PEG).

[0354] La formulación aquí descrita también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la afección particular que vaya a ser tratada, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no afecten de forma adversa entre sí. Dichas moléculas están presentes de forma adecuada en combinación en cantidades que son eficaces para el objetivo pretendida.

[0355] Los principios activos también pueden estar contenidos en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización entre fases, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metilmetakrilato), respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en *Remington's Pharmaceutical Sciences* 20^a Edición, (2000).

[0356] Las formulaciones a utilizar para la administración in vivo deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante la filtración a través de membranas de filtración.

[0357] Se pueden preparar preparaciones de liberación controlada. Entre los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación controlada se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen la inmunoglobulina, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Entre los ejemplos de matrices de liberación controlada se incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metakrilato) o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (Patente de Estados Unidos No. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, copolímeros de etileno-acetato de vinilo no degradables, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables, tales como el LUPRON DEPOTTM (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Mientras polímeros como el acetato de vinilo-etileno y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando las inmunoglobulinas encapsuladas permanecen en el organismo durante un tiempo prolongado, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de la exposición a la humedad a 37°C, lo que se traduce en una pérdida de actividad biológica y en posibles cambios en la inmunogenicidad. Deben idearse estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación se produce a través de la formación de un enlace S-S intermolecular a través de un intercambio tio-disulfuro, la estabilización puede lograrse modificando los residuos sulfhidrilos, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos adecuados, y desarrollando composiciones específicas de matrices poliméricas.

[0358] Se contempla además que un agente útil en la presente invención se puede introducir en un individuo mediante terapia génica. La terapia génica se refiere a terapia realizada mediante la administración de un ácido nucleico a un individuo. En las aplicaciones de terapia génica, los genes se introducen en células a efectos de conseguir la síntesis in vivo de un producto genético terapéuticamente eficaz, por ejemplo, para la sustitución de un gen defectuoso. "Terapia génica" incluye terapia génica convencional donde se consigue un efecto duradero mediante un único tratamiento, y la administración de agentes terapéuticos génicos, que implica la administración de una vez o repetida de un ADN o ARNm terapéuticamente eficaz. Se pueden utilizar ADN y ARN anticodificantes como agentes terapéuticos para bloquear la expresión de ciertos genes in vivo. Véase, por ejemplo, ARNsi de KL β descrito en los ejemplos. Ya se ha observado que se pueden importar oligonucleótidos anticodificantes cortos en células en las que actúan como inhibidores, a pesar de sus concentraciones intracelulares bajas causadas por su captación limitada por la membrana celular. (Zamecnik et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4143-4146 (1986)). Los oligonucleótidos se pueden modificar para aumentar su captación, por ejemplo, mediante la sustitución de sus grupos fosfodiéster cargados negativamente por grupos no cargados. Para la revisión general de los métodos de terapia génica, véase, por ejemplo, Goldspiel et al. Clinical Pharmacy 12:488-505 (1993); Wu and Wu Biotherapy 3:87-95 (1991); Tolstoshev Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596 (1993); Mulligan Science 260:926-932 (1993); Morgan and Anderson Ann. Rev. Biochem. 62:191-217 (1993); y May TIBTECH 11:155-215 (1993). Los métodos conocidos habitualmente en la técnica de tecnología de ADN recombinante que se pueden utilizar se describen en Ausubel et al. eds. (1993) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY; y Kriegler (1990) Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY.

Usos

[0359] Se pueden utilizar moduladores de KL β en, por ejemplo, métodos terapéuticos in vitro, ex vivo e in vivo.

[0360] La presente invención proporciona métodos y composiciones útiles para modular estados patológicos asociados con la expresión y/o actividad de KL β , tal como la expresión y/o actividad incrementadas o la expresión y/o actividad no deseadas, comprendiendo dichos métodos la administración de una dosis eficaz de un antagonista de KL β (tal como un anticuerpo contra KL β) a un individuo con necesidad de dicho tratamiento.

[0361] En un aspecto, la presente invención proporciona métodos para modular estados patológicos asociados con la expresión y/o actividad de KL β y FGF19, tal como la expresión y/o actividad incrementadas o la expresión y/o actividad no deseadas, comprendiendo dichos métodos la administración de una dosis eficaz de un antagonista de KL β (tal como un anticuerpo contra KL β) a un individuo con necesidad de dicho tratamiento.

[0362] En un aspecto, la presente invención proporciona métodos para modular estados patológicos asociados con la expresión y/o actividad de KL β y FGFR4, tal como la expresión y/o actividad incrementadas o la expresión y/o actividad no deseadas, comprendiendo dichos métodos la administración de una dosis eficaz de un antagonista de KL β (tal como un anticuerpo contra KL β) a un individuo con necesidad de dicho tratamiento.

[0363] Un experto en la materia puede determinar si los trastornos están asociados con la expresión y/o actividad de KL β , FGF 19 y/o FGFR4 utilizando métodos conocidos en la técnica y métodos aquí descritos.

[0364] Se entiende que se puede utilizar cualquier antagonista de KL β adecuado (tal como un anticuerpo contra KL β) en métodos de tratamiento, que incluyen anticuerpos monoclonales y/o policlonales, un anticuerpo humano, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo madurado para afinidad, un anticuerpo humanizado, y/o un fragmento de anticuerpo.

[0365] Además, por lo menos algunos de los anticuerpos se pueden unir a antígeno de otras especies. Por consiguiente, los anticuerpos se pueden utilizar para unirse a la actividad específica de antígeno, por ejemplo, en un cultivo celular que contiene el antígeno, en sujetos humanos o en otros sujetos mamíferos que tienen el antígeno con el que un anticuerpo reacciona de forma cruzada (por ejemplo, chimpancé, babuino, tití, cynomolgus y rhesus, cerdo o ratón). En una realización, el anticuerpo se puede utilizar para inhibir las actividades de antígeno mediante el contacto del anticuerpo con el antígeno, de manera que se inhibe la actividad de antígeno. Preferiblemente, el antígeno es una molécula proteica humana.

[0366] En una realización, se puede utilizar un anticuerpo en un método para la unión en un individuo que padece de un trastorno asociado con una expresión y/o actividad incrementada, que comprende administrar al sujeto un anticuerpo de manera que el antígeno se une en el sujeto. Preferiblemente, el antígeno es una molécula proteica humana y el sujeto es un sujeto humano. Alternativamente, el sujeto puede ser un mamífero que expresa el antígeno con el que se une un anticuerpo. Además, el sujeto puede ser un mamífero en el que se ha introducido el antígeno (por ejemplo, mediante la administración del antígeno o mediante la expresión de un transgén de antígeno). Se puede administrar un antígeno a un sujeto humano para fines terapéuticos. Además, se puede administrar un anticuerpo a un mamífero no humano que expresa un antígeno con el que reacciona de forma cruzada la inmunoglobulina (por ejemplo, un primate, cerdo o ratón) para fines veterinarios o como modelo animal de enfermedad humana. Con respecto a esto último, dichos modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de anticuerpos (por ejemplo, análisis de las dosis y evolución con el tiempo de la administración).

[0367] Los anticuerpos se pueden utilizar para tratar, inhibir, retrasar la progresión, evitar/retrasar la reaparición, mejorar o evitar enfermedades, trastornos o condiciones asociadas con la expresión y/o actividad de una o más moléculas de antígeno.

[0368] En ciertas realizaciones, se administra al paciente un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo conjugado con uno o más agentes citotóxicos. En algunas realizaciones, el inmunoconjugado y/o antígeno al que se une es o son internalizados por la célula, dando lugar a una mayor eficacia terapéutica del inmunoconjugado en la eliminación de la célula diana a la que se unen. En una realización, el agente citotóxico reconoce o interfiere con el ácido nucleico en la célula diana. En una realización, el agente citotóxico reconoce o interfiere con la polimerización de microtúbulos. Ejemplos de dichos agentes citotóxicos incluyen cualquiera de los agentes quimioterapéuticos aquí indicados (tales como un maitansinoide, auristatina, dolastatina, o una caliqueamicina), un isótopo radioactivo, o una ribonucleasa o una ADN nucleasa.

[0369] En cualquiera de los métodos del presente documento, se puede administrar al sujeto o paciente junto con el antagonista de KL β una cantidad eficaz de un segundo medicamento (cuando el anticuerpo del presente documento es el primer medicamento), que es otro agente activo que puede tratar la condición en el sujeto que requiere tratamiento. Por ejemplo, un antagonista de KL β se puede coadministrar con otro antagonista de KL β , un anticuerpo, uno o más agentes quimioterapéuticos (incluyendo cócteles de agentes quimioterapéuticos), uno o más agentes antiangiogénicos, uno o más agentes inmunosupresores, una o más citoquinas, uno o más antagonistas de citoquinas y/o uno o más agentes inhibidores del crecimiento. El tipo de dicho segundo medicamento depende de varios factores, incluyendo el tipo del trastorno, tal como el cáncer o un trastorno autoinmune, la gravedad de la enfermedad, la condición y edad del paciente, el tipo y dosis de primer medicamento empleado, etc.

[0370] Cuando un antagonista de KL β inhibe el crecimiento tumoral, por ejemplo, puede ser particularmente deseable combinarlo con uno o más de otros agentes terapéuticos que también inhiben el crecimiento tumoral. Por ejemplo, se puede combinar un antagonista de KL β con un agente antiangiogénico, tal como un anticuerpo contra VEGF (por ejemplo, AVASTIN®) y/o anticuerpos contra ErbB (por ejemplo, anticuerpo contra HER2 HERCEPTIN® trastuzumab o un anticuerpo contra HER2 que se une al Dominio II de HER2, tal como el anticuerpo contra HER2 OMNITARG™ pertuzumab) en un esquema de tratamiento, por ejemplo, en el tratamiento de cualquiera de las enfermedades descritas aquí, incluyendo carcinoma hepatocelular y cáncer pancreático. De manera alternativa o adicional, el paciente puede recibir terapia de radiación combinada (por ejemplo, radiación de haces externos o terapia con un agente marcado radioactivo, tal como un anticuerpo). Dichas terapias combinadas indicadas anteriormente incluyen la administración combinada (donde los dos o más agentes están incluidos en la misma o diferentes formulaciones), y la administración separada, en cuyo caso, la administración del anticuerpo tiene lugar antes y/o después de la administración de la terapia o terapias auxiliares. Además, se espera que la combinación de un antagonista de KL β con un agente relativamente no citotóxico, tal como otra molécula biológica, por ejemplo, un anticuerpo, reduzca la citotoxicidad frente a la combinación del antagonista de KL β con un agente quimioterapéutico de otro agente que es altamente tóxico para las células.

[0371] El tratamiento con una combinación de un antagonista de KL β con uno o más segundos medicamentos da lugar preferiblemente a una mejora en los signos o síntomas del cáncer. Por ejemplo, dicha terapia puede dar lugar a una mejora en la supervivencia (supervivencia global y/o supervivencia sin progresión) en relación con un paciente tratado con sólo el segundo medicamento (por ejemplo, sólo un agente quimioterapéutico), y/o puede dar lugar a una respuesta objetiva *(parcial o completa, preferiblemente completa). Además, el tratamiento con la combinación de un antagonista de KL β y uno o más segundos medicamentos da lugar preferiblemente a un efecto beneficioso terapéutico aditivo, y más preferiblemente sinérgico (o superior al aditivo) para el paciente. Preferiblemente, en este método de combinación el tiempo entre por lo menos una administración del segundo medicamento y por lo menos una administración del antagonista de KL β es aproximadamente un mes o inferior, más preferiblemente aproximadamente dos semanas o inferior.

[0372] Para el tratamiento de cánceres, el segundo medicamento es preferiblemente otro antagonista de KL β , un anticuerpo, agente quimioterapéutico (incluyendo cócteles de agentes quimioterapéuticos), agente antiangiogénico, agente inmunosupresor, profármaco, citoquina, antagonista de citoquina, radioterapia citotóxica, corticosteroide, antieméticos, vacuna para el cáncer, analgésico, agente antivascular y/o agente inhibidor del crecimiento. El agente citotóxico incluyen un agente que interacciona con ADN, los antimetabolitos, los inhibidores de topoisomerasa I o II, o el inhibidor inhibidor fusiforme o agentes estabilizantes (por ejemplo, preferiblemente, vinca alcaloide, más preferiblemente seleccionada entre vinblastina, desoxivinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina, vinopidina, vinfosiltina, vinzolidina y vinfunina), o cualquier agente utilizado en quimioterapia, tal como 5-FU, un taxano, doxorubicina, o dexametasona.

[0373] En otra realización, el segundo medicamento es un anticuerpo utilizado para tratar cánceres, tales como los dirigidos contra el dominio extracelular del receptor HER2/neu, por ejemplo, trastuzumab, o uno de sus fragmentos funcionales, inhibidor de pan-HER, un inhibidor de Src, un inhibidor de MEK, o un inhibidor de EGFR (por ejemplo, un anticuerpo contra EGFR (tal como el que inhibe la actividad de tirosina quinasa del EGFR), que es preferiblemente el anticuerpo monoclonal de ratón 225, su derivado químico ratón-humano C225, o un anticuerpo

humanizado derivado de esta anticuerpo 225 o agentes naturales derivados, dianilinoftalimidas, pirazolo- o pirrolopiridopirimidinas, quinazilinas, gefitinib, erlotinib, cetuximab, ABX-EFG, canertinib, EKB-569 y PKI-166), o inhibidor dual EGFR/HER-2, tal como lapatanib. Los segundos medicamentos adicionales incluyen alemtuzumab (CAMPATH™), FavID (IDKLH), anticuerpos CD20 con glicosilación alterada, tal como GA-101/GLYCART™, oblimersen (GENA SENSE™), talidomida y análogos de los mismos, tales como lenalidomida (REVLIMID™), imatinib, sorafenib, ofatumumab (HUMAX-CD20™), anticuerpo contra CD40, por ejemplo, SGN-40, y anticuerpos contra CD-80, por ejemplo, galiximab.

[0374] El agente antiemético es preferiblemente clorhidrato de ondansetron, clorhidrato de granisetron, metoclopramida, domperidona, haloperidol, ciclizina, lorazepam, procloroperazina, dexametasona, levomepromazina, o tropisetron. La vacuna es preferiblemente ADN de GM-CSF y vacunas basadas en células, vacuna de células dendríticas, vacunas virales recombinantes, vacunas proteínicas de choque térmico (HSP), vacunas de tumores autólogas o alogénicas. El agente analgésico es preferiblemente ibuprofeno, naproxeno, trisalicilato de colín magnesio, o clorhidrato de oxicodona. El agente antivascular es preferiblemente bevacizumab, o rhuMAb-VEGF. Otros segundos medicamentos incluyen agentes antiproliferativos, tales como inhibidores de farnesil proteína transferasa, inhibidores de anti-VEGF, inhibidores de p53, o inhibidores de PDGFR. El segundo medicamento en el presente documento incluye también terapia de reconocimiento biológico, tal como tratamiento con anticuerpos, así como terapia dirigida a moléculas pequeñas, por ejemplo, contra ciertos receptores.

[0375] Se han identificado muchos agentes antiangiogénicos y son conocidos en la técnica, incluyendo los indicados aquí, por ejemplo, indicados en las Definiciones y, por ejemplo, en Carmeliet y Jain, Nature 407:249-257 (2000); Ferrara et al., Nature Reviews: Drug Discovery, 3:391-400 (2004); y Sato Int. J. Clin. Oncol., 8:200-206 (2003). Véase también, la solicitud de patente de Estados Unidos US20030055006. En una realización, se utiliza un anticuerpos contra KLβ en combinación con un anticuerpos neutralizante contra VEGF (o fragmento) y/o otro antagonista de VEGF o un antagonista de receptor de VEGF que incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, receptor de VEGF soluble (por ejemplo, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, fragmentos de neuropilinas (por ejemplo, NRP1, NRP2)), aptámeros capaces de bloquear VEGF o VEGFR, anticuerpos neutralizantes contra VEGFR, inhibidores de peso molecular bajo de tirosinas quinasas de VEGFR (RTK), estrategias antisentido para VEGF, ribozimas contra receptores de VEGF o VEGF, variantes antagonistas de VEGF; y cualquier combinación de los mismos. Alternativamente, o adicionalmente, se pueden coadministrar opcionalmente dos o más inhibidores de la angiogénesis al paciente además del antagonista de VEGF y otro agente. En ciertas realización, se pueden administrar uno o más agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, agentes anticancerígenos, en combinación con un antagonista de KLβ (tal como un anticuerpo contra KLβ), el antagonista de VEGF, y un agente anti-angiogénesis.

[0376] Los agentes quimioterapéuticos útiles en el presente documento se describen anteriormente, por ejemplo, en la definición de "agente quimioterapéutico".

[0377] Los segundos medicamentos de ejemplo incluyen un agente alquilante, un antagonista de folato, un antagonista de pirimidina, un antibiótico citotóxico, un compuesto de platino o un compuesto de base platino, un taxano, un vinca alcaloide, un inhibidor de c-Kit, un inhibidor de topoisomerasa, un inhibidor anti-angiogénesis, tal como un inhibidor del anticuerpo contra VEGF, un inhibidor de HER-2, un inhibidor de EGFR o inhibidor dual de EGFR/HER-2 quinasa, un anti-estrógeno, tal como fulvestrant, y un agente de terapia hormonal, tal como carboplatino, cisplatino, gemcitabina, capecitabina, epirubicina, tamoxifeno, un inhibidor de aromatasa y prednisona. Lo más preferible, el cáncer es cáncer colorrectal y el segundo medicamento es un inhibidor de EGFR, tal como erlotinib, un inhibidor anti-VEGF, tal como bevacizumab, o es cetuximab, arinotecan, irinotecan, o FOLFOX, o el cáncer es cáncer de mama y el segundo medicamento es un modulador anti-estrógeno, tal como fulvestrant, tamoxifeno o un inhibidor de aromatasa, tal como letrozol, exemestano, o anastrozol, o es un inhibidor de VEGF, tal como bevacizumab, o es un agente quimioterapéutico, tal como doxorubicina, y/o un taxano, tal como paclitaxel, o es un inhibidor anti-HER-2, tal como trastuzumab, o un inhibidor dual de EGFR/HER-2 quinasa, tal como lapatinib o un subregulador de HER-2, tal como 17AAG (derivado de geldanamicina que es una proteína de choque térmico [Hsp] 90 poison) (por ejemplo, para cáncer de mama que ha progresado en trastuzumab). En otras realizaciones, el cáncer es cáncer de pulmón, tal como cáncer de pulmón de célula pequeña y el segundo medicamento es un inhibidor de VEGF, tal como bevacizumab, o un inhibidor de EGFR, tal como, por ejemplo, erlotinib o un inhibidor de c-Kit, tal como, por ejemplo, imatinib. En otras realizaciones, el cáncer es cáncer de hígado, tal como carcinoma hepatocelular, y el segundo medicamento es un inhibidor de EGFR, tal como erlotinib, un agente quimioterapéutico, tal como doxorubicina o irinotecan, un taxano, tal como paclitaxel, talidomida y/o interferón. Además, un agente quimioterapéutico preferido para la terapia de línea frontal de cáncer es taxotero, solo o en combinación con otros segundos medicamentos. Lo más preferible, si se administra quimioterapia, se administra primero, seguido de los anticuerpos.

[0378] Dichos segundos medicamentos se pueden administrar en 48 horas después de administrar los anticuerpos o en 24 horas, o en 12 horas, o en 3-12 horas después de dicho agente, o se pueden administrar durante un periodo de tiempo preseleccionado, que es preferiblemente de aproximadamente 1 a 2 días. Además, la dosis de dicho agente puede ser subterapéutica.

[0379] El antagonista de KL β se puede administrar simultáneamente, secuencialmente o alternativamente con el segundo medicamento o después de la falta de respuesta con otra terapia. De este modo, la administración combinada de un segundo medicamento incluye la coadministración (administración simultánea) utilizando formulaciones separadas o una formulación farmacéutica única, y la administración consecutiva en cualquier orden, donde preferiblemente existe un periodo mientras ambos (o todos) los medicamentos ejercen simultáneamente sus efectos biológicos. Todos estos segundos medicamentos se pueden utilizar en combinación entre sí o por sí mismos con el primer medicamento, de manera que la expresión "segundo medicamento", tal como se utiliza aquí, no significa que es el único medicamento además del primer medicamento, respectivamente. De este modo, el segundo medicamento no necesita ser un medicamento, sino que puede constituir o comprender más de un fármaco.

[0380] Estos segundos medicamentos tal como se establecen aquí se pueden utilizar en las mismas dosis y con las rutas de administración como los primeros medicamentos, o aproximadamente de 1 a 99% de las dosis de los primeros medicamentos. Si dichos segundos medicamentos se utilizan en cantidades inferiores que si el primer medicamento no estaba presente, especialmente en dosificaciones posteriores más allá de la dosificación inicial con el primer medicamento, para eliminar o reducir los efectos secundarios causados por el mismo.

[0381] La presente invención también proporciona métodos y composiciones para inhibir o prevenir la recaída del crecimiento tumoral o recaída del crecimiento de células tumorales. La recaída del crecimiento tumoral o recaída del crecimiento de células tumorales se utiliza para describir una condición en que los pacientes que se someten o son tratados con una o más de las terapias actualmente disponibles (por ejemplo, terapias contra el cáncer, tales como quimioterapia, terapia con radiación, cirugía, terapia hormonal y/o terapia biológica/inmunoterapia, terapia con anticuerpos contra VEGF, particularmente una pauta terapéutica estándar para el cáncer concreto) no son clínicamente adecuados para tratar los pacientes o los pacientes no reciben ningún efecto beneficioso adicional de la terapia, de manera que estos pacientes necesitan una terapia eficaz adicional. Tal como se utiliza aquí, la frase también puede referirse a una condición del paciente "sin respuesta/refractario", por ejemplo, que describe pacientes que responden a la terapia, pero sufren efectos secundarios, desarrollan resistencia, no responden a la terapia, no responden satisfactoriamente a la terapia, etc. En varias realizaciones, un cáncer es la recaída del crecimiento tumoral o recaída del crecimiento de células tumorales, donde el número de células cancerosas no se ha reducido significativamente, o se ha incrementado o el tamaño del tumor no se ha reducido significativamente, o se ha incrementado, o no se consigue una reducción adicional en el tamaño o en el número de células cancerosas. La determinación de si las células cancerosas son del crecimiento tumoral en recaída o crecimiento de células tumorales en recaída se puede realizar in vivo o in vitro mediante cualquier métodos conocido en la técnica para analizar la efectividad del tratamiento en células cancerosas, utilizando los significados aceptados en la técnica de "recaída" o "refractario" o "sin respuesta" en dicho contexto. Un tumor resistente al tratamiento contra VEGF es un ejemplo de un crecimiento tumoral en recaída.

[0382] La presente invención proporciona métodos de bloqueo o reducción de recaída del crecimiento tumoral o recaída del crecimiento de células tumorales en un individuo mediante la administración de uno o más antagonistas de KL β (tal como un anticuerpo contra KL β) para bloquear o reducir la recaída del crecimiento tumoral o la recaída del crecimiento de células tumorales en un sujeto. En ciertas realizaciones, el antagonista de KL β se puede administrar posteriormente a la terapia contra el cáncer. En ciertas realizaciones, el antagonista de KL β se administra simultáneamente con la terapia contra el cáncer. Alternativa, o adicionalmente, la terapia con antagonista de KL β alterna con otra terapia contra el cáncer, que se puede realizarse en cualquier orden. La invención también comprende métodos para administrar uno o más anticuerpos inhibidores para evitar la aparición o reaparición del cáncer en pacientes predispuestos a tener cáncer. En general, el sujeto estaba o está simultáneamente sometido a terapia contra el cáncer. En una realización, la terapia contra el cáncer es un tratamiento con un agente antiangiogénesis, por ejemplo, un antagonista de VEGF. El agente antiangiogénesis incluye los conocidos en la técnica y los hallados bajo las Definiciones en el presente documento. En una realización, el agente antiangiogénesis es un anticuerpo neutralizante contra VEGF o un fragmento (por ejemplo, A4.6.1 humanizado, AVASTIN® (Genentech, South San Francisco, CA), Y0317, M4, G6, B20, 2C3, etc.). Véase, por ejemplo, patentes de Estados Unidos 6,582,959, 6,884,879, 6,703,020; WO98/45332; WO 96/30046; WO94/10202; EP 0666868B1; solicitudes de patentes de Estados Unidos 20030206899, 20030190317, 20030203409, y 20050112126; Popkov et al., Journal of Immunological Methods 288:149-164 (2004); y, WO2005012359. Los agentes adicionales se pueden administrar en combinación con un antagonista de VEGF y un antagonista de KL β para bloquear o reducir la recaída del crecimiento tumoral o recaída del crecimiento de células tumorales.

[0383] Los antagonistas de KL β (y agentes terapéuticos auxiliares) se administran mediante cualquier medio adecuado, que incluye administración parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal, y, si se desea, para el tratamiento local, administración intralesional. Las perfusiones parenterales incluyen la administración intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, o subcutánea. Además, los antagonistas de KL β se administran de manera adecuada mediante perfusión por pulsos, particularmente con dosis decrecientes del anticuerpo. La dosificación puede ser mediante cualquier ruta adecuada, por ejemplo, mediante inyecciones, tales como inyecciones intravenosa o subcutánea, dependiendo en parte de si la administración es breve o crónica.

[0384] La composición de antagonista de KL β se formulará, dosificará y administrará de una manera consistente con las buenas prácticas médicas. Los factores para la consideración en este contexto incluyen el trastorno en particular

en tratamiento, el mamífero en particular en tratamiento, la condición clínica del paciente individual, la causa del trastorno, el punto de liberación del agente, el método de administración, la pauta de administración, y otros factores conocidos por los médicos. El antagonista de KL β no necesita formularse, aunque opcionalmente se formula con uno o más agentes utilizados actualmente para prevenir o tratar el trastorno en cuestión. La cantidad efectiva de dichos otros agentes depende de la cantidad antagonista de KL β presente en la formulación, el tipo de trastorno o tratamiento y otros factores descritos anteriormente. Éstos se utilizan en general en las mismas dosis y con las rutas de administración, tal como se indican aquí, o desde aproximadamente el 1 al 99% de las dosis empleadas aquí.

[0385] Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosis apropiada de un antagonista de KL β (cuando se utiliza solo o en combinación con otros agentes) dependerá del tipo de enfermedad a tratar, el tipo de anticuerpo, la gravedad y evolución de la enfermedad, si el anticuerpo se administra para fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta al anticuerpo, y el criterio del médico. El anticuerpo se administra de manera adecuada al paciente de una vez o mediante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y la gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 μ g/kg a 15 mg/kg (por ejemplo 0,1 mg/kg-10mg/kg) de un anticuerpo contra KL β es una dosis candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una dosis diaria habitual podría variar desde aproximadamente 1 μ g/kg hasta 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la condición, el tratamiento se mantiene hasta que tenga lugar la supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Una dosis de ejemplo del anticuerpo estaría en el intervalo desde aproximadamente 0,05 mg/kg hasta aproximadamente 10 mg/kg. De este modo, se pueden administrar al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Dichas dosis se pueden administrar de forma intermitente, por ejemplo, cada semana o cada tres semanas (por ejemplo, de manera que el paciente recibe desde aproximadamente dos hasta aproximadamente veinte, o por ejemplo aproximadamente seis dosis del anticuerpo. Se puede administrar una dosis de carga inicial más elevada, seguido de una o más dosis inferiores. Una pauta de dosificación de ejemplo comprende administrar una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguido de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg del anticuerpo. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales.

Usos que comprenden la detección de KL β

[0386] En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para la detección de KL β , comprendiendo los métodos la detección de KL β en una muestra. El término "detección" tal como se utiliza aquí, incluye la detección cualitativa y/o cuantitativa (valores de medición) con o sin la referencia a un control.

[0387] En un aspecto, la presente invención proporciona métodos para la detección de un trastorno asociado con la expresión y/o actividad de KL β , comprendiendo los métodos la detección de KL β en una muestra biológica de un individuo. En algunas realizaciones, la expresión de KL β es la expresión incrementada o la expresión anormal. En algunas realizaciones, el trastorno es un tumor, cáncer, y/o un trastorno proliferativo celular (tal como carcinoma hepatocelular y cáncer pancreático), un trastorno del hígado (tal como cirrosis), o cualquier trastorno aquí descrito. En algunas realizaciones, la muestra biológica es suero o es de un tumor.

[0388] Por ejemplo, se puede analizar una muestra por un antígeno diana (por ejemplo, KL β , FGF19, y/o FGFR4) mediante la obtención de la muestra de una fuente deseada, la mezcla de la muestra con anticuerpo contra antígeno diana para permitir que el anticuerpo forme un complejo anticuerpo/antígeno diana con cualquiera presente en la mezcla y la detección de cualquier complejo anticuerpo/antígeno diana presente en la mezcla. La muestra biológica se puede preparar para el análisis mediante métodos conocidos en la técnica que son adecuados para la muestra particular. Los métodos de mezcla de la muestra con anticuerpos y los métodos de detección del complejo anticuerpo/antígeno diana se eligen según el tipo de análisis utilizado. Dichos análisis incluyen inmunohistoquímica, ensayos comparativos y de sándwich, y ensayos de inhibición estérica. Para la preparación de la muestra, se puede utilizar una muestra de tejido o célula de un mamífero (habitualmente de un paciente humano). Entre los ejemplos de muestra se incluyen, pero sin limitación, células de cáncer, tales como células de cáncer de colon, mama, próstata, ovario, pulmón, estómago, páncreas, linfoma y leucemia. También se puede medir en el suero antígeno diana. La muestra se puede obtener mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, la extirpación quirúrgica, aspiración o biopsia. El tejido puede ser fresco o congelado. En una realización, las muestras se fijan y bañan en parafina o similar. La muestra de tejido puede estar fijada (es decir, conservada) mediante metodología convencional (Véase, por ejemplo, "Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology," 3ª edición (1960) Lee G. Luna, HT (ASCP) Editor, The Blakston Division McGraw-Hill Book Company, New York; The Armed Forces Institute of Pathology Advanced Laboratory Methods in Histology and Pathology (1994) Ulreka V. Mikel, Editor, Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington, D.C.). Un experto en la materia entenderá que la elección de un fijador se determina mediante el objetivo por el cual la muestra debe ser teñida histológicamente o en cualquier caso analizada. Un experto en la materia también entenderá que la longitud de la fijación depende del tamaño de la muestra de tejido y el fijador utilizado. A modo de ejemplo, se puede utilizar para fijar la mezcla la formalina en tampón neutro, de Bouin o paraformaldehído. En general, la muestra se fija primero y a continuación se deshidrata a través de una serie

ascendente de alcoholes, se infiltra y se baña con parafina u otro medio de separación, de manera que la muestra de tejido se puede separar. De manera alternativa, se puede separar el tejido y fijar las secciones obtenidas. A modo de ejemplo, la muestra de tejido se puede bañar y procesar en parafina mediante metodología convencional (véase, por ejemplo, "Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology", supra). Ejemplos de parafina que se pueden utilizar incluyen, pero sin limitación, Paraplast, Broid, y Tissuemay. Una vez la muestra de tejido se baña, la muestra se puede separar por un microtomo o similar (véase, por ejemplo, "Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology", supra). A modo de ejemplo para este procedimiento, las secciones pueden variar de aproximadamente tres micras a aproximadamente cinco micras de grosor. Una vez separadas, las secciones se pueden unir a portaobjetos mediante varios métodos estándar. Ejemplos de portaobjetos adhesivos incluyen, pero sin limitación, silano, gelatina, poli-L-lisina y similares. A modo de ejemplo, las secciones bañadas en parafina se pueden unir a portaobjetos cargados positivamente y/o portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina. Si se ha utilizado la parafina como material de baño, las secciones de tejido generalmente se desparafinan y se rehidratan en agua. Las secciones de tejido se pueden desparafinar mediante varias metodologías estándar convencionales. Por ejemplo, se pueden utilizar xilenos y una serie gradualmente descendente de alcoholes (véase, por ejemplo, "Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology", supra). Alternativamente, se pueden utilizar agentes no orgánicos desparafinantes disponibles comercialmente, tales como Hemo-De7 (CMS, Houston, Texas).

[0389] Los anticuerpos contra KL β son útiles en ensayos que detectan la expresión de KL β (tal como ensayos de diagnóstico o pronóstico) en células o tejidos específicos en los que los anticuerpos están marcados tal como se describe a continuación y/o están inmovilizados en una matriz insoluble. Sin embargo, se entiende que se puede utilizar cualquier anticuerpo contra KL β adecuado en realizaciones que implican la detección y el diagnóstico. En el presente documento se describen algunos métodos para producir anticuerpos contra KL β y los métodos para producir anticuerpos contra KL β son conocidos en la técnica, por ejemplo, anticuerpos descritos en Ito et al (2005) J Clin Invest 115(8): 2202-2208; R&D Systems Catalog Nos. MAB3738 y AF2619.

[0390] Los métodos analíticos para un antígeno diana utilizan todos uno o más de los siguientes reactivos: análogo de antígeno diana marcado, análogo de antígeno diana inmovilizado, anticuerpo contra antígeno diana marcado, anticuerpo contra antígeno diana inmovilizado y conjugados estéricos. Los reactivos marcados son conocidos también como "rastreadores".

[0391] El marcador utilizado es cualquier funcionalidad detectable que no interfiere con la unión del antígeno diana y el anticuerpo contra el antígeno diana. Se conocen numerosos marcadores para utilizar en inmunoensayo, entre los ejemplos se incluyen grupos que se pueden detectar directamente, tales como marcadores fluorocromo, quimioluminiscente y radioactivo, así como grupos, tales como enzimas, que deben reaccionar o derivarse para ser detectados.

[0392] El marcador utilizado es cualquier funcionalidad detectable que no interfiere con la unión del antígeno diana y el anticuerpo contra el antígeno diana. Se conocen numerosos marcadores para utilizar en inmunoensayo, entre los ejemplos se incluyen grupos que se pueden detectar directamente, tales como marcadores fluorocromo, quimioluminiscente y radioactivo, así como grupos, tales como enzimas, que deben reaccionar o derivarse para ser detectados. Entre los ejemplos de dichos marcadores se incluyen los radioisótopos ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , y ^{131}I , fluoróforos, tales como quelatos de tierras raras, o fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, luciferasas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (patente de Estados Unidos No. 4,737,456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinedionas, peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa, y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas, tales como uricasa y xantina oxidasa, acoplados con una enzima que utiliza peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de colorante, tal como HRP, lactoperoxidasa, o microperoxidasa, biotina/avidina, marcadores de spin, marcadores bacteriófagos, radicales libres estables, y similares.

[0393] Los métodos convencionales están disponibles para unir estos marcadores covalentemente a proteínas o polipéptidos. Por ejemplo, se pueden utilizar agentes acoplantes, tales como dialdehídos, carbodiimidas, dimaleimidas, bis-imidatos, bis-benzidina diazotizada, y similares, para etiquetar anticuerpos con el marcador fluorescente, quimioluminiscente y enzimas mencionados anteriormente. Véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos. 3,940,475 (fluorimetría) y 3,645,090 (enzimas); Hunter et al., Nature, 144: 945 (1962); David et al., Biochemistry, 13: 1014-1021 (1974); Pain et al., J. Immunol. Methods, 40: 219-230 (1981); y Nygren, J. Histochem. and Cytochem., 30: 407-412 (1982). Los marcadores preferentes del presente documento son enzimas, tales como peroxidasa de rábano picante y fosfatasa alcalina. La conjugación de dicho marcador, incluyendo las enzimas, al anticuerpo es un proceso de manipulación estándar para un experto en técnicas de inmunoensayo. Véase, por ejemplo, O'Sullivan et al., "Methods for the Preparation of Enzyme-antibody Conjugates for Use in Enzyme Immunoassay," en Methods in Enzymology, ed. J.J. Langone y H. Van Vunakis, Vol. 73 (Academic Press, New York, New York, 1981), pág. 147-166.

[0394] La inmovilización de reactivos es necesaria para ciertos métodos de ensayo. La inmovilización comprende separar el anticuerpo contra el antígeno diana de cualquier antígeno diana que permanece libre en solución. Esto se

consigue convencionalmente mediante la insolubilización del anticuerpo contra el antígeno diana o análogo de antígeno diana antes del procedimiento de ensayo, como mediante adsorción a una matriz o superficie insoluble en agua (Bennich et al., U.S. 3,720,760), mediante acoplamiento covalente (por ejemplo, utilizando reticulación con glutaraldehído), o mediante insolubilización del anticuerpo contra el antígeno diana o análogo de antígeno diana posterior, por ejemplo, mediante inmunoprecipitación.

[0395] La expresión de proteínas en una muestra se puede examinar utilizando protocolos de inmunohistoquímica y tinción. Se ha observado que la tinción inmunohistoquímica de secciones de tejido es un método fiable de valoración o detección de la presencia de proteínas en una muestra. Las técnicas de inmunohistoquímica ("IHC") utilizan un anticuerpo para sonda y visualizar antígenos celulares in situ, generalmente mediante métodos cromogénicos o fluorescentes. Para la preparación de muestras, se puede utilizar una muestra de tejido o célula de un mamífero (habitualmente un paciente humano). La muestra se puede obtener mediante una serie de procedimientos conocidos en la técnica, que incluyen, sin limitación, la extirpación quirúrgica, la aspiración o biopsia. El tejido puede ser fresco o congelado. En una realización, la muestra está fijada e incluida en parafina o similar. La muestra de tejido puede estar fijada (es decir, conservada) mediante metodología convencional. Un experto en la materia entenderá que la elección de un fijador se determina por el objetivo por el cual la muestra va a ser teñida histológicamente o en cualquier caso analizarse. Un experto en la materia entenderá que la longitud de la fijación depende del tamaño de la muestra de tejido y el fijador utilizado.

[0396] La IHC se puede realizar en combinación con técnicas adicionales, tales como tinción morfológica y/o hibridación in situ con fluorescencia. Existen dos métodos generales de IHC; ensayos directos e indirectos. Según el primer ensayo, la unión del anticuerpo al antígeno diana (por ejemplo, KL β) se determina directamente. El ensayo directo utiliza un reactivo marcado, tal como una etiqueta fluorescente o un anticuerpo primario marcado con enzima, que se puede visualizar sin interacción con anticuerpo adicional. En un ensayo indirecto típico, el anticuerpo primario no conjugado se une al antígeno y a continuación un anticuerpo secundario marcado se une al anticuerpo primario. Cuando el anticuerpo secundario se conjuga a un marcador enzimático, se añade un sustrato cromogénico o fluorogénico para proporcionar la visualización del antígeno. La amplificación de señal tiene lugar debido a que varios anticuerpos secundarios pueden reaccionar con diferentes epítomos en el anticuerpo primario.

[0397] El anticuerpo primario y/o secundario utilizado para inmunohistoquímica se marcará habitualmente con un grupo detectable. Existen numerosos marcadores que se pueden agrupar en general en las siguientes categorías:

[0398] A parte de los procedimientos de preparación de muestras descritos anteriormente, se puede desear el tratamiento adicional de la sección de tejido antes, durante o después de la IHC. Por ejemplo, se pueden llevar a cabo métodos de extracción de epítomos, tales como el calentamiento de la muestra en tampón citrato (véase, por ejemplo, Leong et al. Appl. Immunohistochem. 4(3):201 (1996)).

[0399] Después de una etapa de bloqueo opcional, la sección de tejido se expone a un anticuerpo primario durante un periodo de tiempo suficiente y bajo condiciones adecuadas, de manera que el anticuerpo primario se une al antígeno en la muestra de tejido. Las condiciones apropiadas para conseguir esto se pueden determinar mediante experimentación de rutina. El grado de unión de anticuerpo a la muestra se determina mediante la utilización de cualquiera de los marcadores detectables descritos anteriormente. Preferiblemente, el marcador es un marcador enzimático (por ejemplo, HRPO) que cataliza una alteración química del sustrato cromogénico, tal como cromógeno de 3,3'-diaminobenzidina. Preferiblemente, el marcador enzimático se conjuga a anticuerpo que se une específicamente al anticuerpo primario (por ejemplo, el anticuerpo primario es anticuerpo policlonal de conejo y el anticuerpo secundario es anticuerpo de cabra anti-conejo).

[0400] Las muestras preparadas de este modo se pueden montar y poner el cubreobjetos. A continuación, se determina la evaluación del portaobjetos, por ejemplo, utilizando un microscopio, y se pueden utilizar criterios de intensidad de tinción utilizados habitualmente en la técnica.

[0401] Otros métodos de ensayo, conocidos como ensayos competitivos o sandwich, están bien establecidos y se utilizan ampliamente en la industria de diagnóstico comercial.

[0402] Los ensayos competitivos se basan en la capacidad de un análogo de antígeno diana rastreador para competir con el antígeno diana de muestra de prueba por un número limitado de sitios de unión a antígeno del anticuerpo anti-antígeno diana. El anticuerpo anti-antígeno diana se insolubiliza generalmente antes o después de la competición y a continuación se separan el rastreador y el antígeno diana unido al anticuerpo anti-antígeno diana del rastreador y el antígeno diana no unidos. Esta separación se realiza mediante decantación (donde el compañero de unión se preinsolubilizó) o mediante centrifugación (donde el compañero de unión se precipitó después de la reacción competitiva). La cantidad de antígeno diana de muestra de prueba es inversamente proporcional a la cantidad de rastreador unido medida por la cantidad de sustancia marcadora. Las curvas dosis-respuesta con cantidades conocidas de antígeno diana se preparan y comparan con los resultados de la prueba para determinar cuantitativamente la cantidad de antígeno diana presente en la muestra de prueba. Estos ensayos se denominan sistemas ELISA cuando se utilizan enzimas como marcadores detectables.

[0403] Otro tipo de ensayo competitivo, denominado ensayo “homogéneo”, no requiere una separación de fases. En este caso, se prepara un conjugado de una enzima con el antígeno diana y se utiliza de manera que cuando el anticuerpo anti-antígeno diana se une al antígeno diana, la presencia del anticuerpo anti-antígeno diana modifica la actividad de la enzima. En este caso, el antígeno diana o sus fragmentos inmunológicamente activos se conjugan con un puente orgánico bifuncional a una enzima, tal como peroxidasa. Los conjugados se seleccionan para utilizar con un anticuerpo anti-antígeno diana, de manera que la unión del anticuerpo anti-antígeno diana inhibe o potencia la actividad de la enzima del marcador. Este método *per se* se realiza ampliamente bajo el nombre de EMIT.

[0404] Los conjugados estéricos se utilizan en métodos de impedimento estérico para un ensayo homogéneo. Estos conjugados se sintetizan mediante la unión covalente de un hapteno de peso molecular bajo a un fragmento de antígeno diana pequeño, de manera que el anticuerpo para el hapteno es incapaz sustancialmente de unirse al conjugado a la vez que el anticuerpo anti-antígeno diana. Bajo este procedimiento de ensayo, el antígeno diana presente en la muestra de prueba se unirá al anticuerpo anti-antígeno diana, permitiendo así que el anti-hapteno se una al conjugado, dando lugar a un cambio en el carácter del hapteno conjugado, por ejemplo, un cambio en la fluorescencia cuando es hapteno es un fluoróforo.

[0405] Los ensayos sándwich son particularmente útiles para la determinación del antígeno diana o anticuerpos anti-antígeno diana. En ensayos sándwich secuencial, se utiliza un anticuerpo anti-antígeno diana inmovilizado para adsorber el antígeno diana de la muestra de análisis, la muestra de análisis se extrae mediante lavado, el antígeno diana unido se utiliza para adsorber un segundo anticuerpo anti-antígeno diana marcado, y a continuación el material unido se separa del rastreador residual. La cantidad de rastreador residual es directamente proporcional al antígeno diana de la muestra de prueba. En ensayos sándwich “simultáneos”, la muestra de prueba no se separa antes de añadir el anti-antígeno diana marcado. Un ensayo sandwich secuencial que utiliza un anticuerpo monoclonal anti-antígeno diana como un anticuerpo y un anticuerpo policlonal anti-antígeno diana como el otro es útil en el análisis de muestras para el antígeno diana.

[0406] Los anteriores son únicamente ensayos de detección de ejemplo de un antígeno diana. Otros métodos actuales o desarrollados posteriormente que utilizan un anticuerpo anti-antígeno diana para la determinación del antígeno diana se incluyen en el alcance del presente documento, incluyendo los bioensayos aquí descritos.

[0407] En un aspecto, la presente invención proporciona métodos para detectar (por ejemplo, la presencia o ausencia o una cantidad) de un polinucleótido o polinucleótidos (por ejemplo, polinucleótidos diana) en una muestra biológica de un individuo, tal como un sujeto humano. Se puede utilizar un conjunto de métodos para detectar polinucleótidos e incluyen, por ejemplo, RT-PCR, taqman, métodos de amplificación, micromatrices de polinucleótidos, y similares.

[0408] Los métodos para la detección de polinucleótidos (tales como ARNm) son muy conocidos e incluyen, por ejemplo, ensayos de hibridación usando sondas de ADN complementario (tales como hibridación *in situ* usando ribosondas diana marcadas, transferencia Northern y técnicas relacionadas, y diversos ensayos de amplificación de ácidos nucleicos (tales como RT-PCR usando cebadores complementarios específicos para la diana, y otros métodos de detección de tipo amplificación tales como, por ejemplo, ADN ramificado, SPIA, Ribo-SPIA, SISBA, TMA y similares).

[0409] Las muestras biológicas de mamífero pueden analizarse convenientemente para, por ejemplo, ARNm diana usando transferencia Northern, transferencia de puntos o análisis de PCR. Por ejemplo, los ensayos de RT-PCR, tales como los ensayos de PCR cuantitativa, son muy conocidos en la técnica. En una realización ilustrativa, un método para detectar un ARNm diana en una muestra biológica comprende producir ADNc de la muestra mediante transcripción inversa usando al menos un cebador; amplificar el ADNc así producido usando un polinucleótido diana como cebadores codificantes y anticodificantes para amplificar el ADNc diana en el mismo; y detectar la presencia o ausencia del ADNc diana amplificado. Además, dichos métodos pueden incluir una o más etapas que permiten determinar la cantidad (los niveles) de ARNm diana en una muestra biológica (por ejemplo, examinando simultáneamente los niveles en la secuencia de ARNm de control comparativa de un gen “constitutivo” tal como un miembro de la familia de actina). Opcionalmente puede determinarse la secuencia del ADNc diana amplificado.

[0410] Las sondas y/o cebadores pueden marcarse con un marcador detectable tal como, por ejemplo, un radioisótopo, compuesto fluorescente, compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, quelante metálico o enzima. Dichas sondas y cebadores pueden usarse para detectar la presencia de polinucleótidos diana en una muestra y como medio para detectar una célula que expresa antígenos. Como entenderá el experto en la materia, pueden prepararse muchísimos cebadores y sondas diferentes (por ejemplo, basándose en las secuencias proporcionadas en este documento) y usarse eficazmente para amplificar, clonar y/o determinar la presencia o ausencia y/o los niveles de ARNm diana.

[0411] Los métodos opcionales de la invención incluyen protocolos que comprenden la detección de polinucleótidos, tales como polinucleótido diana, en una muestra de tejido o de células, mediante tecnologías de micromatrices (“microarrays”). Por ejemplo, usando micromatrices de ácido nucleico, se transcriben inversamente muestras de ARNm de prueba y de control de muestras de tejido de prueba y de control y se marcan para generar sondas de

ADNc. Las sondas se hibridan a continuación con un grupo de ácidos nucleicos inmovilizados sobre un soporte sólido. La matriz está configurada de forma que se conozca la secuencia y posición de cada miembro de la matriz. Por ejemplo, una selección de genes que tiene posibilidad de expresarse en ciertos estados patológicos puede disponerse en matrices sobre un soporte sólido. La hibridación de una sonda marcada con un miembro de la matriz particular indica que la muestra de la que se derivó la sonda expresa ese gen. El análisis de expresión génica diferencial de tejido enfermo puede proporcionar valiosa información. La tecnología de micromatrices utiliza técnicas de hibridación de ácidos nucleicos y tecnología de computación para evaluar la expresión del perfil de ARNm de miles de genes en un único experimento (véase, por ejemplo, documento WO 01/75166 publicado el 11 de octubre de 2001; (véanse, por ejemplo, el documento US 5.700.637, la patente de EE.UU. 5.445.934 y la patente de EE.UU. 5.807.522, Lockart, Nature Biotechnology, 14:1675-1680 (1996); Cheung, V.G. et al., Nature Genetics 21(Suppl):15-19 (1999) para una discusión de la fabricación de las matrices). Las micromatrices de ADN son matrices en miniatura que contienen fragmentos génicos que se sintetizan directamente o se aplican en puntos sobre vidrio u otros sustratos. Normalmente se representan miles de genes en una única matriz. Un experimento de micromatrices típico implica las siguientes etapas: 1. preparación de diana marcada fluorescentemente de ARN aislado de la muestra, 2. hibridación de la diana marcada con la micromatriz, 3. lavado, tinción y barrido de la matriz, 4. análisis de la imagen barrida y 5. generación de perfiles de expresión génica. Actualmente se están usando dos tipos principales de micromatrices de ADN: matrices de oligonucleótidos (normalmente 25 a 70 unidades) y matrices de expresión génica que contienen productos de PCR preparados a partir de ADNc. En la formación de una matriz, los oligonucleótidos pueden ser tanto prefabricados como aplicados por puntos a la superficie o sintetizarse directamente sobre la superficie (*in situ*).

[0412] El sistema Affymetrix GeneChip® es un sistema de micromatrices comercialmente disponible que comprende matrices fabricadas mediante síntesis directa de oligonucleótidos sobre una superficie de vidrio. Matrices de sondas/genes: los oligonucleótidos, normalmente de 25 unidades, se sintetizan directamente sobre una oblea de vidrio mediante una combinación de fotolitografía basada en semiconductores y tecnologías químicas de síntesis en fase sólida. Cada matriz contiene hasta 400.000 oligonucleótidos diferentes y cada oligonucleótido está presente en millones de copias. Como las sondas de oligonucleótidos se sintetizan en localizaciones conocidas sobre la matriz, los patrones de hibridación y las intensidades de señal pueden interpretarse en términos de identidad génica y niveles relativos de expresión por el software Affymetrix Microarray Suite. Cada gen está representado sobre la matriz por una serie de sondas de oligonucleótidos diferentes. Cada par de sondas consiste en un oligonucleótido de apareamiento perfecto y un oligonucleótido de desapareamiento. La sonda de apareamiento perfecto tiene una secuencia exactamente complementaria al gen particular y, por tanto, mide la expresión del gen. La sonda de desapareamiento se diferencia de la sonda de apareamiento perfecto en una única sustitución de bases en la posición de bases central, alterando la unión del transcrito del gen diana. Esto ayuda a determinar la hibridación de base y no específica que contribuye a la señal medida para el oligonucleótido de apareamiento perfecto. El software Microarray Suite resta las intensidades de hibridación de las sondas de desapareamiento de aquellas de las sondas de apareamiento perfecto para determinar el valor de intensidad absoluto o específico para cada conjunto de sondas. Las sondas se eligen basándose en la actual información de Genbank y otros repositorios de nucleótidos. Se cree que las secuencias reconocen regiones únicas del extremo 3' del gen. Se usa un GeneChip Hybridization Oven para llevar a cabo la hibridación de hasta 64 matrices a la vez. La estación hidráulica realiza el lavado y la tinción de las matrices de sondas. Está completamente automatizada y contiene cuatro módulos, conteniendo cada módulo una matriz de sondas. Cada módulo está controlado independientemente por el software Microarray Suite usando protocolos hidráulicos previamente programados. El escáner es un escáner de fluorescencia láser confocal que mide la intensidad de fluorescencia emitida por el ARNc marcado unido a las matrices de sondas. El terminal de trabajo informático con el software Microarray Suite controla la estación hidráulica y el escáner. El software Microarray Suite puede controlar hasta ocho estaciones hidráulicas usando protocolos de hibridación previamente programados, de lavado y de tinción para la matriz de sondas. El software adquiere y convierte los datos de intensidad de hibridación en una llamada de presencia/ausencia para cada gen usando algoritmos apropiados. Finalmente, el software detecta cambios en la expresión génica entre experimentos por análisis de comparación y formatea las salidas en archivos .txt que pueden usarse con otros programas informáticos para el análisis de datos adicional.

[0413] En algunas realizaciones, se detecta la delección de genes, mutación de genes o amplificación de genes (por ejemplo, la delección de genes, mutación de genes o amplificación de genes de $KL\beta$ y/o $FGFR4$ y/o $FGF19$). La delección de genes, mutación de genes o amplificación de genes se pueden medir mediante cualquiera de una amplia variedad de protocolos, conocidos en la técnica, 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 de puntos (análisis de ADN), o hibridación *in situ* (por ejemplo, FISH), utilizando una sonda marcada apropiadamente, métodos citogenéticos o hibridación genómica comparativa (CGH) utilizando una sonda marcada apropiadamente. Además, estos métodos se pueden utilizar para detectar la delección de genes diana, la mutación de ligandos o la amplificación de genes. Tal como se utiliza aquí, "detectar la expresión $KL\beta$ " comprende la detección de la delección de gen, mutación de gen o amplificación de gen de $KL\beta$.

[0414] Adicionalmente, se puede examinar el estado de metilación del gen diana en una muestra de tejido o célula. La desmetilación y/o hipermetilación aberrante de islas de CpG en las regiones reguladoras 5' del gen se produce frecuentemente en células inmortalizadas y transformadas, y pueden dar lugar a la expresión alterada de varios

genes. Se conocen en la técnica un conjunto de ensayos para examinar el estado de metilación de un gen. Por ejemplo, se puede utilizar, en estrategias con hibridación Southern, enzimas de restricción sensibles a metilación que no pueden dividir secuencias que contienen sitios de CpG metilados para evaluar el estado de metilación de islas de CpG. Además, la MSP (PCR específica de metilación) puede perfilar rápidamente el estado de metilación de todos los sitios d CpG presentes en una isla de CpG de un gen determinado. Este procedimiento implica la modificación inicial de ADN mediante bisulfito de sodio (que convertirá todas las citosinas no metiladas en uracilo), seguido de la amplificación utilizando cebadores específicos para ADN metilado frente a no metilado. Los protocolos que implican la interferencia de metilación también se hallan por ejemplo en Current Protocols In Molecular Biology, Unit 12, Frederick M. Ausubel et al. eds., 1995; De Marzo et al., Am. J. Pathol. 155(6): 1985-1992 (1999); Brooks et al, Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 1998, 7:531-536); and Lethe et al., Int. J. Cancer 76(6): 903-908 (1998). Tal como se utiliza aquí, "detectar la expresión de KLβ" comprende la detección de la metilación del gen de KLβ.

[0415] En algunas realizaciones, utilizando los métodos conocidos en la técnica, incluyendo aquellos aquí descritos, se puede detectar la expresión del polinucleótido y/o polipéptido de una o más dianas. A modo de ejemplo, las técnicas de IHC descritas anteriormente se pueden emplear para detectar la presencia de una o más de dichas moléculas en la muestra. Tal como se utiliza aquí, "conjuntamente" significa comprender cualquier detección simultánea y/o secuencias. De este modo, se contempla que en realizaciones en que se examina una muestra biológica no sólo por la presencia de una primera diana, sino también por la presencia de una segunda diana Fa, se pueden preparar portaobjetos separados del mismo tejido o muestra, y cada portaobjetos se analiza con un reactivo que se una a la primera y/o segunda diana, respectivamente. Alternativamente, se puede preparar un único portaobjetos de la muestra de tejido o células, y se pueden utilizar anticuerpos dirigidos a la primera y segunda diana, respectivamente, en relación con un protocolo de tinción con múltiples colores para permitir la visualización y la detección de la primera y segunda diana.

[0416] Las muestras biológicas se describe aquí, por ejemplo, en la definición de Muestra biológica. En algunas realizaciones, la muestra biológica es suero o es de un tumor.

Artículos de fabricación

[0417] En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en el recipiente o asociado con el mismo. Entre los recipientes adecuados se incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, etc. Los recipientes pueden estar formados de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que, por sí misma o combinada con otra composición o composiciones, es eficaz para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de la condición y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa o vial de solución intravenosa que tiene un tapón penetrable por una aguja de inyección hipodérmica). Por lo menos un agente activo en la composición es un anticuerpo. La etiqueta o prospecto indica que la composición se utiliza para el tratamiento de la condición de elección, tal como cáncer. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en el mismo, en el que la composición comprende un antagonista de KLβ (tal como un anticuerpo contra KLβ); y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en el mismo. El artículo de fabricación en esta realización de la invención puede comprender además un prospecto que indica que las composiciones de primer y segundo anticuerpo se pueden utilizar para tratar una condición particular, por ejemplo, cáncer. Alternativamente, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWI), una solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir también otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

[0418] Los siguientes son ejemplos de los métodos y composiciones de la invención. Se entiende que se pueden realizar otras realizaciones, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

EJEMPLOS

[0419] Se utilizaron los siguientes materiales y métodos en los ejemplos 1-15.

Construcciones de ADN:

[0420] *Construcción de Klotho Beta humano de longitud completa:* Se extrajo el ARN total de la línea celular hepatocelular de carcinoma de HepG2 utilizando el kit RNeasy (Quiagen). El Klotho beta humano (KLβ) se clonaron mediante la PCR de transcriptasa inversa (RT-PCR) utilizando el kit Rt-PCR de una etapa SuperScript III (Invitrogen) y los siguientes cebadores:

Cebador codificante 5'-CGGGCGCTAGCATGAAGCCAGGCTGTGCGGGAGG-3' (SEQ ID NO:3)

Cebador anticodificante 5'-

**CAGTGGATCCTTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCGCTAACAACTCTCTTGCCTT
TCTTTC-3' (SEQ ID NO:4)**

[0421] El producto de PCR de KLβ resultante se digirió con NheI y BamHI y se unió en pIRESpuo3 (Clontech) para obtener la construcción etiquetada con flag c-terminal de KLβ humana de longitud completa (pCMVhKLβ-Flag (SEQ ID NO: 49)).

[0422] *Construcción de FGFR4 humano de longitud completa:* Se extrajo el ARN total de la línea celular hepatocelular de carcinoma de HepG2 utilizando el kit RNeasy (Quiagen). El ADNc de FGFR4 se clonó mediante la PCR de transcriptasa inversa (RT-PCR) utilizando el kit Rt-PCR de una etapa SuperScript III (Invitrogen) y los siguientes cebadores:

Cebador codificante 5'-CCGCCGGATATCATGCGGCTGCTGCTGGCCCTGTTGG-3' (SEQ ID NO:5)
Cebador no codificante 5'-CCGCCGGAATTCTGTCTGCACCCAGACCCGAAGGGG-3' (SEQ ID NO:6)

[0423] El producto de PCR de FGFR4 resultante se digirió con EcoRV y EcoRI y se unió en pIRESpuo3 (Clontech) para obtener el FGFR4 humano de longitud completa.

[0424] *Construcción FGFR4 humana con etiqueta Flag c-terminal:* se añadió la etiqueta Flag C-terminal en pIRESpuo3FGFR4 humano utilizando el kit de mutagénesis dirigida de sitio QuickChange Stratagene XL y los siguientes cebadores:

Cebador codificante : 5'-GGT CTG GGG TGC AGA CAG GTA AGC CTA TCC CTA
ACC CTC TCC TCG GTC TCG ATT CTA CGT AGG AAT TCG GAT CCG CGG C-3'
(SEQ ID NO:7)

Cebador anticodificante : 5'-GCC GCG GAT CCG AAT TCC TAC GTA GAA TCG AGA CCG
AGG AGA GGG TTA GGG ATA GGC TTA CCT GTC TGC ACC CCA GAC C-3' (SEQ ID
NO:8)

[0425] *Construcción KLβ secretada humana con etiqueta de His C-Terminal:* el dominio extracelular de KLβ secretada humana se obtuvo mediante PCR utilizando pCMVHuKLβ-Flag como plantilla y los siguientes cebadores:

Cebador anticodificante : 5'-GAA TTC CAC CAT GAA GCC AGG CTG TGC GGC AGG
ATC TCC AG-3' (SEQ ID NO:9)

Cebador codificante : 5'-GGC GCG CCG ACA AGG AAT AAG CAG ACA GTG CAC
TCT G-3' (SEQ ID NO:10)

[0426] El producto de PCR secretado resultante se digirió con EcoRI y Ascl y se unió en pRK5_c-His (DNA540910) para obtener pRK5HuKLβΔTM-His (SEQ ID NO:50).

[0427] *Construcción de E416A y E693A de KLβ humana:* Se obtuvo la construcción de E416A de KLβ con flag c-terminal (pCMVhKLβ-Flag E416A (SEQ ID NO:51)) mediante la mutación de E416 a A416 en pCMVHuKLβ_Flag utilizando el kit de mutagénesis dirigida de sitio QuickChange Stratagene XL y los siguientes cebadores:

Cebador codificante

: 5'-CCC TCG AAT CTT GAT TGC TGC GAA TGG CTG GTT CAC
AGA CAG-3' (SEQ ID NO:11)

Cebador anticodificante

: 5'-CTG TCT GTG AAC CAG CCA TTC GCA GCA ATC AAG ATT
CGA GGG-3' (SEQ ID NO:12)

[0428] La construcción de flag c-terminal E693A con KLβ (pCMVhKLβ-Flag E693A (SEQ ID NO:52)) se obtuvo mediante la mutación de E693 a A693 en pCMVHuKLβ_Flag utilizando el kit de mutagénesis directa de sitio XL QuickChange (Stratagene) y los siguientes cebadores:

Cebador codificante

: 5'-GCT CTG GAT CAC CAT CAA CGC GCC TAA CCG GCT
AAG TGA C-3' (SEQ ID NO:13)

Cebador anticodificante

: 5'-GTC ACT TAG CCG GTT AGG CGC GTT GAT GGT GAT CCA
GAG C-3' (SEQ ID NO:14)

Medio acondicionado con hKLβΔTM

[0429] Las células HEK 293 se transfectaron con un vector vacío o con un vector de expresión que contenía el dominio extracelular de Klotho beta humana marcada con his C-terminales (hKLβΔTM). Después de la transfección, las células se mantuvieron en medio PS25 libre de suero durante 72-96 horas. El medio resultante se filtró, se complementó a HEPES 40 mM pH 7,2, se concentró 4 veces y se evaluó el contenido de hKLβΔTM mediante transferencia Western utilizando un anticuerpo monoclonal que se une a hKLβ (R&D Systems, catálogo no. MAB3738)

Coprecipitación

[0430] El medio de control concentrado o condicionado con hKLβΔTM se complementó con Triton-X100 (Calbiochem) hasta una concentración final de 0,5% y se incubó con o sin FGFR-IgG 0,5 mg/ml (R&D Systems, números de catálogos siguientes: FGFR1 alfa IIIb, 655-FR-050; FGFR1 alfa III, 658-FR-050; FGFR1 beta IIIb, 765-FR-050; FGFR1 beta IIIc, 661-FR-050; FGFR2 alfa III, 663-FR-050; FGFR2 alfa IIIc, 712-FR-050; FGFR2 beta IIIb, 665-FR-050; FGFR2 beta IIIc, 684-FR-050; FGFR3 IIIb, 1264-FR-050; FGFR3 IIIc, 766-FR-050; FGFR4, 685-FR-050), 0,5 mg/ml heparina (Sigma), 1 mg/ml FGF19 (R&D Systems), 10 ml de gel de afinidad de proteína A EZ view Red (Sigma) a 4°C durante 18 h. La matriz de afinidad se centrifugó y se lavó tres veces con PBS/Triton-X 100 al 0,5% y una vez con PBS. El péptido se eluyó con tampón de muestra de SDS-PAGE que contenía β-mercaptoetanol al 5% y se analizó mediante transferencia Western utilizando anticuerpo monoclonal contra Klotho β (R&D Systems catálogo no. MAB3738), un anticuerpo contra FGF19 (clon 1A6; Genentech Inc.), un anticuerpo contra FGFR4 (clon 8G11; Genentech Inc.) o un anticuerpo contra IgG humana conjugado a HRP (Jackson Immunochemical).

Líneas de cultivo celular y células estables

[0431] Las células HEK 293 (No. Acceso ATCC CRL-1573), HepG2 (No. Acceso ATCC HB-8065) y Hep 3B (No. Acceso ATCC HB-8064) se obtuvieron de la American Type Culture Collection y se mantuvieron en una mezcla de F-12:DMEM (50:50) complementada con suero bovino fetal al 10% (FBS) L-glutamina 2 mM. Se crearon células HEK 293 que expresaban de manera estable vectores vacíos, receptor 4 de factor de crecimiento de fibroblastos humanos (hFGFR4) R388-V5, hFGFR4 G388-V5, Klotho b-FLAG humano (hKLβ-FLAG), hFGFR4 R388-V5 y hKLβ-FLAG, o hFGFR4 R388-V5 y hKLβ-FLAG y se desarrollaron en medio selectivo que contenía 500 μg/ml de geneticina y 2,5 μg/ml puomicina.

Evolución con el tiempo de la expresión génica en células tratadas con FGF19

[0432] Las células se emplacaron a 10⁶ células /pocillo en una placa de 6 pocillos y se desarrollaron durante la noche en un medio completo. Las células se lavaron 2 veces con PBS y una vez con medio libre de suero y se mantuvo durante la noche en medio libre de suero. El día siguiente las células se trataron con 20 ng/ml de FGF19 durante 1, 2, 4, 6 ó 24 horas y al final del tratamiento se extrajo ARN utilizando el kit de RNeasy (Qiagen). El nivel de expresión relativo de c-fos, c-jun, junB y KLβ se determinó mediante Taqman.

RT-PCR semicuantitativa

[0433] Se extrajo el ARN total utilizando el kit de RNeasy (Quiagen). Se utilizaron cebadores específicos y sondas fluorogénicas para amplificar y cuantificar la expresión génica. Las señales específicas de los genes se normalizaron al gen constitutivo RPL19. Se promediaron los grupos de datos por triplicado para cada condición. Todos los reactivos RT-PCR de TaqMan se adquirieron de Applied Biosystems (Foster City, California). Los datos se presentan como la media $\pm$ SEM. Cebadores y sondas Taqman (el colorante informador fue FAM y el colorante de desactivación fue TAMRA). Las secuencias de cebadores fueron las siguientes:

cebador codificante RPL 19: AGC GGA TTC TCA TGG AAC A (SEQ ID NO:15)
 cebador no codificante RPL19: CTG GTC AGC CAG GAG CTT (SEQ ID NO:16)
 sonda RPL 19: TCC ACA AGC TGA AGG CAG ACA AGG (SEQ ID NO:17)
 cebador codificante hKL β : GCA GTC AGA CCC AAG AAA ATA CAG A (SEQ ID NO:18)
 cebador no codificante hKL β : CCC AGG AAT ATC AGT GGT TTC TTC (SEQ ID NO:19)
 sonda no codificante hKL β : TGC ACT GTC TGC TTA TTC CTT GT (SEQ ID NO:20)
 cebador codificante hc-fos: CGA GCC CTT TGA TGA CTT CCT (SEQ ID NO:21)
 cebador no codificante hc-fos: GGA GCG GGC TGT CTC AGA (SEQ ID NO:22)
 sonda hc-fos probe: CCC AGC ATC ATC CAG GCC CAG (SEQ ID NO:23)
 cebador codificante hjunb: AGT CCT TCC ACC TCG ACG TTT (SEQ ID NO:24)
 cebador no codificante hjunb: AAT CGA GTC TGT TTC CAG CAG AA (SEQ ID NO:25)
 sonda hjunb: AGC CCC CCC TTC CAC TTT TT (SEQ ID NO:26)
 cebador codificante hc-jun: CGT TAA CAG TGG GTG CCA ACT (SEQ ID NO:27)
 cebador no codificante hc-jun: CCC GAC GGT CTC TCT TCA AA (SEQ ID NO:28)
 sonda hc-jun: ATG CTA ACG CAG CAG TTG CAA ACA (SEQ ID NO:29)
 mKL β codificante: TGT GGT GAG CGA AGG ACT GA (SEQ ID NO:30)
 mKL β no codificante: GGA GTG GGT TGG GTG GTA CA (SEQ ID NO:31)
 sonda de mKL β : CTG GGC GTC TTC CCC ATG G (SEQ ID NO:32)
 mc-fos codificante: CCT GCC CCT TCT CAA CGA (SEQ ID NO:33)
 mc-fos no codificante: TCC ACG TTG CTG ATG CTC TT (SEQ ID NO:34)
 sonda de mc-fos: CCA AGC CAT CCT TGG AGC CAG T (SEQ ID NO:35)
 mFGFR4 codificante: CGC CAG CCT GTC ACT ATA CAA A (SEQ ID NO:36)
 mFGFR4 no codificante: CCA GAG GAC CTC GAC TCC AA (SEQ ID NO:37)
 sonda de mFGFR4: CGT TTC CCT TTG GCC CGA CAG TTC T (SEQ ID NO:38)

Transfección de ARNsi en células HEPG2 y HEP3B:

[0434] Se obtuvieron los oligo de ARNsi de KL β y GAPDH de Dharmacon.

ARNsi de KL β :

[0435]

Doble cadena 1: Codificante: 5'-GCACACUACUACAAACAGAUU-3' (SEQ ID NO:39)
 Anti-codificante: 5'-UCUGUUUGUAGUAGUGUGCUU-3' (SEQ ID NO:40)
 Doble cadena2: Codificante: 5'-GCACGAAUGGUUCCAGUGAUU-3' (SEQ ID NO:41)
 Anti-codificante: 5'-UCACUGGAACCAUUCGUGCUU-3' (SEQ ID NO:42)
 Doble cadena3: Codificante: 5'-CGAUGGAUUAUUAUCAAUUGUU-3' (SEQ ID NO:43)
 Anti-codificante: 5'-CAUUGAAUAUAUCCAUCGUU-3' (SEQ ID NO:44)
 Doble cadena4: Codificante: 5'-UGAAUAUACCACACGCUAUUU-3' (SEQ ID NO:45)
 Anti-codificante: 5'-AUAGCGUGUGGUUAUUAUUAU-3' (SEQ ID NO:46)
 ARNsi de GAPDH: Codificante: 5'-UGGUUUACAUGUCCAAUA-3' (SEQ ID NO:47)
 Anticodificante: 5'-UAUUGGAACAUGUAAACCA-3' (SEQ ID NO:48)

[0436] Se transfectaron las diversas cadenas dobles de ARNsi utilizando el kit de transfección de DharmaFECT (Dharmacon) y siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Veinticuatro horas después de la transfección, las células se lavaron dos veces con PBS y una vez con medio libre de suero y se mantuvieron en medio libre de suero durante la noche. Los siguientes días las células se trataron con 20 ng/ml de FGF19 (R&D Systems) durante 2 horas. Las muestras de ARN se prepararon con un kit de RNeasy kit (Qiagen). Se determinaron los niveles de la expresión de c-fos, RPL19, y KL β mediante Taqman.

Tratamiento con anticuerpo contra KL β in vitro

[0437] Se emplacaron células HEPG2 a 10^6 células/pocillo en una placa de 6 pocillos y se desarrollaron durante la noche en un medio completo. Las células se lavaron 3 veces con medio libre de suero que contenía BSA al 0,1% y se mantuvo el mismo medio durante la noche. El día siguiente las células se trataron con 10 mg/ml de anticuerpo policlonal específico de KL β (R&D Systems; cat# AF2619) o un anticuerpo de control durante 4 h. A continuación, las

células se trataron con 100 ng/ml de FGF19 durante 2 horas y se extrajo el ADN utilizando el kit RNeasy (Qiagen). El nivel de expresión relativo de c-fos se determinó mediante Taqman.

Coinmunoprecipitación

[0438] Las células 293 HEK que expresan de manera transitoria (24-48 horas de transfección) o de manera estable un vector vacío, hFGFR4 R388-V5, hKLB-FLAG, o hFGFR4 R388-V5 y hKLB-FLAG se lisaron con tampón de lisis RIPA (PBS que contiene Triton X-100 al 1% y NP-40 al 1%) complementado con cóctel completo de inhibidores de proteasas libres de EDTA (Roche). Se determinaron las concentraciones de proteína total mediante un ensayo de proteínas BCA (Pierce). Se inmunoprecipitaron cantidades iguales de proteína total para cada lisado de muestra con gel de afinidad de M2 anti-FLAG EZview Red (Sigma) o gel de afinidad anti-V5 agarosa (Sigma) a 4°C durante la noche. Las proteínas inmunoprecipitadas se lavaron tres veces con TBST y a continuación se incubaron sin o con 1 mg/ml FGF-19 (R&D Systems) en mezcla F-12:DMEM (50:50) complementada con FBS al 0,5% y Triton X-100 al 0,5% a 4°C durante 3 horas. A continuación, las partículas se lavaron una vez con tampón Krebs-Ringer-HEPES (KRH) que contenía Triton X-100 al 1% y tres veces con tampón KRH. Las proteínas inmunoprecipitadas se eluyeron mediante la adición de 1X tampón de muestra NuPAGE LDS (Invitrogen) y en ebullición durante 5 minutos. Las proteínas eluidas en tampón de muestra se recuperaron y se añadió 1X de agente reductor NuPAGE (Invitrogen) y a continuación se puso en ebullición durante 10 minutos. Las muestras de proteína se sometieron a electroforesis en geles de Bis-Tris NuPAGE al 4-12% seguido de la transferencia a membranas de nitrocelulosa y se sometieron a posteriores análisis de inmunotransferencia utilizando anticuerpo contra hKLB (1 mg/ml, R&D Systems; catálogo no. MAB3738), anticuerpo contra hFGFR4 (1 mg/ml, clon 8G1, Genentech), o anticuerpo contra FGF-19 (1 mg/ml, clon 1A6, Genentech). La señal se detectó utilizando sustrato ECL Plus (GE Healthcare).

Activación del mecanismo de FGF

[0439] Las células 293 HEK que expresan de manera transitoria (24 horas de transfección) o estable un vector vacío, hFGFR4 R388-V5, hFGFR4 G388-V5, hKLB-FLAG, hFGFR4 R388-V5 y hKLB-FLAG, o hFGFR4 G388-V5 y hKLB-FLAG se trataron con 0, 1, 10, ó 100 µg/ml de FGF-19 (R&D Systems), 20 µg/ml de FGF-1 (FGF ácido, R&D Systems), o 20 µg/ml de factor de crecimiento epidérmico (Roche) durante 10 minutos. Las células se lisaron con tampón de lisis RIPA (Upstate) suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasa libres de EDTA completo (Roche) y los cócteles 1 y 2 de inhibidores de fosfatasa (Sigma). Las concentraciones de proteína total se determinaron mediante ensayo de proteína BCA (Pierce). Para el análisis de la fosforilación de FRS2 y ERK1/2, se pasaron por electroforesis cantidades iguales de proteína total en geles de NuPAGE Bis-Tris al 10% (Invitrogen), seguido de la transferencia a membranas de nitrocelulosa y los posteriores análisis de inmunotransferencia utilizando anticuerpo anti-fosfo-FRS2 (1: 1,000, Cell Signaling Technology) o anticuerpo anti-ERK1/2 (1:1,000, Cell Signaling Technology). Para la detección de FRS2 y ERK1/2 total, las membranas se pusieron en tiras y se volvieron a sondear con anticuerpo anti-FRS2 (1 mg/ml, Upstate Biotechnology) o anticuerpo anti-ERK1/2 (1:1,000, Cell Signaling Technology). La señal se detectó utilizando el sustrato ECL Plus (GE Healthcare).

Experimentos In vivo

[0440] Todos los protocolos de animales fueron aprobados por el Institutional Animal Care and Use Committee. Se obtuvieron ratones FVB hembras de cinco a seis semanas de los laboratorios Charles River. A los ratones se les proporcionó comida y agua estándar ad libitum hasta 12 horas antes del tratamiento en cuyo momento se eliminó la comida. Los ratones se inyectaron intravenosamente con vehículo (PBS) o con 1 mg/kg de FGF19. Cuando se indicó, los ratones se inyectaron intravenosamente con 2,2 mg/kg de anticuerpo contra KLB (R&D Systems; cat# AF2619) 3, 9 ó 24 horas de la inoculación intravenosa de FGF19. Después de 30 min, los ratones de todos los grupos se sacrificaron y se recogieron las muestras de tejido, se congelaron en nitrógeno líquido, y se almacenaron a -70°C. Se preparó el ARN total de las muestras de tejido congeladas utilizando el kit RNeasy (Qiagen). Se analizaron grupos de 3-5 animales para cada condición. Los datos se presentan como la media ± SEM y se analizaron mediante el test t de Student.

Análisis de expresión In silico

[0441] Para el análisis de expresión de KLB y FGFR4, las representaciones se basan en los datos de expresión de genes normalizados extraídos de la base de datos de BioExpress™ (Gene Logic, Inc., Gaithersburg, MD, USA). La expresión de KLB aquí descrita corresponda a la señal proporcionada por la sonda número 244276_at y 204579_at, respectivamente, en tejidos humanos analizados en Chips de Genes Affymetrix. La línea central negrita indica la mediana; el recuadro (blanco, normal; gris, tumor) representa el intervalo entre cuartiles entre el primer y el tercer cuartil. La distribución de los valores para una muestras determinadas se indica por las líneas discontinuas. La colección de muestras humanas se ha descrito por el creador de la base de datos BioExpress™ (Shen-Ong GL et al. Cancer Res 2003; 63: 3296-301. Las hibridaciones respectivas se realizaron en chips de oligonucleótidos HG-U133P de Affymetrix (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA, USA): Brevemente, estos chips se basan en oligonucleótidos de 25 unidades y permiten la detección de más de 33.000 genes humanos bien caracterizados con grupos de sondas de 11 oligonucleótidos por transcrito.

Ejemplo 1: Las especificidades de unión del dominio extracelular de KLβ y FGF19 se limitan a FGFR4.

[0442] Se incubaron las proteínas FGF 19, heparina y de fusión FGFRs-Fc en medio acondicionado que contenía KLβΔTM. A continuación, se analizaron las interacciones de las proteínas mediante coprecipitación. Las KLβ y FGF19 coasociadas sólo con FGFR4 se captaron sólo con FGFR4-Fc (Figura 1A). Estos datos indicaron que las especificidades de unión del dominio extracelular de KLβ y FGF19 se limitan a FGFR4 y que el dominio extracelular de KLβ, FGF19 y FGFR4 forman probablemente un complejo de tres partes

Ejemplo 2: La unión de KLβ a FGFR4 está inducida por FGF19 y heparina.

[0443] Para evaluar la contribución de cada componente en la formación del complejo, se utilizó un ensayo de coprecipitación. Se incubó un medio que contenía control o KLβΔTM en presencia o ausencia de FGFR4-Fc, FGF19, y heparina. En ausencia de heparina y FGF19, no se detectó interacción entre KLβ y FGFR4-Fc (Figura 1B). La heparina era un promotor débil, mientras que FGF19 era un promotor fuerte de la interacción KLβ-FGFR4. EL nivel máximo de estabilización de la interacción KLβ-FGFR4-Fc tuvo lugar en presencia de heparina y FGF19. En cambio, la unión de FGF19 a FGFR4-Fc requería la presencia de heparina o KLβ. El nivel máximo de unión de FGF19 a FGFR4 tuvo lugar cuando la heparina y KLβ estaban incluidos en la reacción. Estos datos demuestran que KLβ es suficiente para apoyar la unión de FGF19 a FGFR4. También se muestra que KLβ induce lo demostrado previamente, la interacción dependiente de heparina de FGF19 con FGFR4 (Xie et al (1999) Cytokine 11:729-35). Por lo tanto, cada componente individual contribuye a la estabilidad del complejo FGF 19-FGFR4-KLβ-heparina.

[0444] En comparación con los miembros de la familia de FGF paracrin, el FGF19 tiene una afinidad de unión a heparina baja que le permite actuar de una manera endocrina sin unirse al proteoglicano pericelular de las células secretoras (Choi, M et al (2006) Nat Med 12: 1253-5; Harmer, NJ et al (2004) Biochem 43:629-40; Inagaki, Y et al (2005) Cell Metab 2:217-25; Lundasen, T et al (2006) J Intern Med 260:530-6). La topología del sitio de unión a heparina de FGF19 evita que el FGF19 forme enlaces de hidrógeno con heparina cuando el FGF19 se une a su receptor. Gocet, R et al (2007) Mol Cell Biol. 27: 3417-28). Por lo tanto, KLβ puede actuar como un coreceptor de FGFR4 que estabiliza la interacción débil de FGF19-FGFR4-heparina.

Ejemplo 3: Interacción de FGFR4 y KLβ transfectados en la superficie celular.

[0445] Para analizar si KLβ y FGFR4 también participan en la formación de un complejo con FGF19 y heparina en la superficie celular, se evaluó la capacidad de FGFR4 y KLβ de inmunoprecipitar FGF 19 a partir de lisados de células transfectadas de manera transitoria o estable en presencia o ausencia de heparina. No coprecipitó FGF19 detectable a partir de los lisados de células transfectadas con sólo un control o un vector de expresión de FGFR4 (figura 1C y 1D). FGFR4 y KLβ captaron FGF19 del lisado de células transfectadas con KLβ sólo en presencia de heparina indicando que la transfección de KLβ induce la unión de FGF19 dependiente de heparina al FGFR4 endógeno de HEK293.

[0446] Estos descubrimientos sugieren que FGFR4 y KLβ existen como un complejo preformado y que su interacción no está potenciada por FGF19.

Ejemplo 4: Interacción de FGFR4 y KLβ endógenos en la superficie celular.

[0447] Los dominios transmembrana de KLβ y FGFR4 podían interaccionar directamente entre sí o inducir la interacción de las proteínas mediante la su unión a la superficie celular. Para analizar la hipótesis de que KLβ y FGFR4 forman un complejo constitutivo en la superficie celular, se evaluó si la KLβ coimmunoprecipitaba con FGFR4 a partir de lisados de celulares de HEPG2 en ausencia de FGF o heparina. La incubación de lisados celulares de HEPG2 con un anticuerpo contra FGFR4 inmunoprecipitó FGFR4 y KLB, mientras que no inmunoprecipitó proteína con el anticuerpo de control (Figura 1E), demostrando que KLβ y FGFR4 de transmembrana endógenas forman un complejo constitutivo independiente de heparina y ligando. El complejo de la superficie celular KLβ-FGFR4 podría alterar la dimerización de receptores inducida por heparina y ligando que se describió previamente para FGF paracrin (Plonikov, A (1999) Cell 98:641-50; Schlessinger, J et al (2000) Mol Cell 6:743-50). Estos datos indican que la KLβ y FGFR4 endógenas interaccionan en la superficie celular. Los solicitantes indican que la figura 4 de la solicitud anterior del solicitante, US Serial No. 60/909,699, presentada el 2 de abril del 2007, (correspondiente a la figura 1E de la presente solicitud) muestra una marca de peso molecular a 150kDa, mientras que la figura 1E muestra una marca de peso molecular de 130kDa. La falta de indicación de la figura 4 de la solicitud '699 fue un error obvio inadvertido, ya que se sabe que KLβ es una proteína de 130 kDa (véase, por ejemplo, Ito et al., Mech. Dev. 98 (2000) 115-119).

Ejemplo 5: Unión de FGF19 a FGFR4 y KLβ en la superficie celular.

[0448] Para analizar si KLβ y FGFR4 también participan en la formación de un complejo con FGF19 y heparina en la superficie celular, se evaluó la capacidad de FGFR4 y KLβ de inmunoprecipitar FGF 19 a partir de lisados de células transfectadas de manera transitoria o estable en presencia o ausencia de heparina. No coprecipitó FGF19 detectable a partir de los lisados de células transfectadas con sólo un control o un vector de expresión de FGFR4

(figura 1C y 1D). FGFR4 y KL β captaron FGF19 del lisado de células transfectadas con KL β sólo en presencia de heparina indicando que la transfección de KL β induce la unión de FGF19 dependiente de heparina al FGFR4 endógeno de HEK293.

[0449] En lisados de células cotransfectadas con KL β y FGFR4, KL β y FGFR4 fácilmente captó FGF19. Esta interacción se estabilizó posteriormente en presencia de heparina (Figura 1C y 1D). Estos datos muestran que la KL β es necesaria para la unión de FGF19 a FGFR4 de la superficie celular y que la heparina induce esta interacción. Además, FGFR4 y KL β fácilmente interaccionaban de una manera dependiente con heparina y ligando en células cotransfectadas. Este resultado contrasta con la formación de complejo dependiente de heparina y ligando observada con las proteínas FGFR4 y KL β quiméricas secretadas. Esta discrepancia indica un papel para los dominios transmembrana de KL β y FGFR4 en la formación del complejo.

[0450] Estos descubrimientos sugieren que FGF19 se une a KL β y FGFR4 en la superficie celular y que la heparina aumenta esta interacción.

Ejemplo 6: FGF19 reprime la expresión de Klotho beta

[0451] Se evaluó el efecto de FGF19 en la expresión de KL β en varias líneas celulares. Se detectó una expresión elevada de KL β en líneas celulares de hígado (HepG2 y Hep3B), pero solo trazas en las líneas celulares de riñón (HEK293) o colon (SW620 y Colo205; Figura 3A). Tras la exposición a FGF19, se reprimió gradualmente la expresión de KL β en HepG2 y Hep3B, hasta un 50-60% del nivel de células no expuestas después de 6 horas, y permanecieron a este nivel por lo menos 24 horas. La exposición a FGF19 no afectó a los niveles de expresión de KL β en otras líneas celulares. La represión de la expresión de KL β por FGF 19 podría ser un mecanismo de retroalimentación negativo regulador en las células del hígado.

Ejemplo 7: El FGF19 es necesario para la modulación cascada abajo de FGF19 de la expresión génica

[0452] Debido a que un exceso de estímulos fisiológicos y patológicos inducen los genes de la familia de Fos y Jun en una amplia variedad de tipos de células, se analizó si el FGF19 modula la expresión de c-Fos, JunB, y c-Jun en varias líneas celulares (Ashida, R et al (2005) Inflammapharmacology 13: 113-25; Hess, J et al (2004) Biochemistry 43:629-40; Shaulian, E et al (2002) Nat Cell Biol 4:E131-6). El FGF19 sobrerregulaba la expresión de c-Fos y JunB, así como la expresión de c-Jun en menor grado, en células que expresan KL β (HepG2 y HEP3B; Figuras 3 B-D). La inducción de la expresión de c-Fos, JunB y c-Jun tuvo lugar en 30 minutos de la exposición a FGF19 y en la mayoría de los casos volvió a niveles basales después de 6 horas. La expresión de JunB permaneció elevada durante por lo menos 24 horas en células HEP3B (Figura 3C).

[0453] Estos datos indican que FGF19 inducía la expresión de c-Fos, JunB y c-Jun sólo en células que expresaban KL β .

Ejemplo 8: La eliminación de KL β inhibe la inducción de c-fos dependiente de FGF19.

[0454] Para analizar si KL β induce la señalización de FGF19 y la inducción de c-Fos en células HEP3B y HEPG2, se inhibió la expresión de KL β utilizando ARNsi específicos. La transfección de ARNsi de KL β redujo significativamente el ARNm de KL β y la expresión proteica en células HEP3B (Figuras 3G y E) y HEPG2 (Figura 5A). La transfección individual de cuatro ARNsi de KL β diferentes atenuó significativamente la fosforilación de FRS2 y ERK1/2 mediada por FGF19 (Figuras 3F, 5B). Además, la transfección de células HEP3B con la transfección de ARNsi de KL β inhibió la inducción de c-Fos mediada por FGF19 en un 62%-80%, en comparación con las células de control (figura 3G). De manera similar, la transfección de células HEPG2 con el ARNsi de KL β redujo los niveles de fosforilación de FRS2 y ERK1/2 mediada por FGF19, así como la inducción de c-Fos en comparación con las células de control (figura 5C). Estos resultados indican que la expresión de KL β es necesaria para la activación del mecanismo y la inducción de c-Fos dependiente de FGF19. Estos resultados indican que la expresión de KL β es necesaria para la inducción de c-Fos dependiente de FGF19.

[0455] Para evaluar adicionalmente la participación de KL β en la inducción de c-Fos mediada por FGF19, se transfectaron células HEK293 con vectores vacíos, de expresión de KL β , FGFR4, o una combinación de KL β y FGFR4 y se expusieron las células a FGF19. Sólo las células transfectadas con los vectores de expresión de KL β y FGFR4 indujeron c-Fos en respuesta a FGF19 (Figura 3H). Estos datos indican que KL β es necesario para la activación del mecanismo de FGF19 y la modulación de la regulación génica.

Ejemplo 9: Tratamiento con un anticuerpo contra KL β inhibe la inducción de c-Fos dependiente de FGF19.

[0456] Para evaluar la contribución de KL β a la inducción de c-Fos dependiente de FGF19, se trataron células HEPG2 con un anticuerpo contra KL β (desarrollado contra KL β de ratón, pero que reacciona de forma cruzada con KL β humano) o un anticuerpo de control antes del tratamiento de las células con FGF19. El tratamiento con el anticuerpo contra KL β redujo la inducción de c-Fos dependiente de FGF19 en un 80%, mientras que el anticuerpo de control no mostró ningún efecto significativo (Figura. 6).

[0457] Estos resultados demuestran que el reconocimiento de KL β con un anticuerpo específico inhibe la actividad de FGF19.

5 **Ejemplo 10: KL β es necesaria para la señalización de FGF19.**

[0458] Para analizar si KL β contribuye a la activación del mecanismo de señalización de FGF19, se evaluaron los efectos de FGF-19 en la fosforilación del sustrato 2 de FGFR (FRS2) y la quinasa 1 y 2 regulada por la señal extracelular (ERK1/2) en células HEK 293 transfectadas con KL β y/o FGFR4, así como los controles. FGF19 no indujo la fosforilación de FRS2 o ERK1/2 en células transfectadas con un vector de expresión vacío (figura 2). Las células HEK 293 transfectadas con KL β o FGF4 sólo mostraron un incremento débil dependiente de la dosis en la fosforilación de ERK1/2, pero fue detectable en la fosforilación de FRS2 después de la exposición a FGF19. La cotransfección de FGFR4 con KLB indujo la señalización de FGF19 en células 293 HEK, indicado por el incremento robusto dependiente de la dosis de la fosforilación de FRS2 y ERK1/2. Una posible explicación de este efecto es que las concentraciones locales elevadas de FGF19 y FGFR4 permite la señalización débil en ausencia de KL β . Sin embargo, dado que FGF19 tiene una función endocrina y su concentración circulante promedio es 193 ± 36 pg/mL (intervalo de 49-590 pg/mL), esto es improbable (Lundasen, T et al (J Intern Med 260:530-6). Por lo tanto, la inducción robusta por KL β de la señalización de FGF19 tiene lugar probablemente a concentraciones fisiológicas de FGF19.

20 **Ejemplo 11: La mutación del sitio activo de KL β inhibe la activación del mecanismo de FGF19.**

[0459] Se evaluó el requisito de KL β para la actividad estimulada por FGF19 mediante la detección de señalización cascada abajo (es decir, fosfo-FRS2 y fosfo-ERK1/2) en células 293 HEK transfectadas con KL β de tipo natural (wt) o mutantes de KL β . Las células transfectadas con KL β Wt mostraron fosfo-FRS2 y fosfo-ERK1/2 detectables tras el tratamiento con 100 ng/ml de FGF19 (Figura 7). Cuando se trata con la misma dosis de FGF19, el mutante E416A de KL β (que contiene una mutación de glutamato a alanina en uno de los posibles sitios activos; véase Ito et al. (2000) Mech. Dev. 98 (1-2):115-119 para una descripción de este residuo) no mostró la fosforilación detectable de FRS2 o ERK1/2. De este modo, una mutación en el posible sitio activo de KL β E416 eliminaba la señalización cascada abajo de FGFR4, sugiriendo que la actividad enzimática de KL β es necesaria para la señalización de FGFR4.

[0460] El tratamiento con FGF19 de células transfectadas con el mutante E693A de KL β ((que contiene una mutación de glutamato a alanina en uno de los posibles sitios activos; véase Ito et al., supra, para una descripción de este residuo) mostró niveles similares de fosforilación de fosfo-FRS2 o fosfo-ERK1/2 en células tratadas con FGF19 que expresan KL β de tipo natural (Figura 7). De este modo, una mutación en el posible sitio activo E693 de KL β no afectó en la actividad de KL β . Por lo tanto, sólo el posible sitio activo E416 de KL β es necesario para la estimulación dependiente de FGF19 de la fosforilación de FRS2 y ERK1/2. La expresión de la proteína KL β se detectó para demostrar que las células transfectadas con vectores que expresan KL β natural o mutante expresaban cantidades equivalentes de proteína.

[0461] Estos hallazgos corroboran el descubrimiento de que la señalización de FGF19 a través de FGFR4 se aumenta mediante la presencia de KL β y además sugiere que la actividad enzimática de KL β es necesaria para la señalización de FGFR4.

45 **Ejemplo 12: Distribución de la expresión de KL β en tejidos de ratón in vivo.**

[0462] Para analizar la hipótesis de que FGF19 actúa sólo en tejidos que expresan FGFR4 y KL β , se examinó la distribución de KL β y FGFR4 en varios órganos de ratón utilizando RT-PCR semicuantitativa. Los niveles de ARNm relativos representan la proporción de expresión relativa, en comparación con el cerebro (órgano con la menor expresión analizada). Se expresó predominantemente KL β en hígado (Figura 4C). También se hallaron niveles inferiores de expresión de KL β en tejido adiposo y colon. Los órganos adicionales analizados mostraron niveles de expresión marginales de KL β . FGFR4 se expresó de manera elevada en hígado, pulmón, glándulas adrenales, riñón y colon (Figura 4D). También se observaron niveles inferiores de FGFR4 en intestino, ovarios, músculo y páncreas. La distribución global de KL β y FGFR4 en tejidos de ratón fue similar a la de tejidos humanos. Sin embargo, a diferencia de los hallazgos en tejidos humanos, no se pudo detectar una expresión de KL β o FGFR4 consistente en páncreas de ratón. Además, se detectó un nivel bajo de expresión de KL β en colon de ratón, mientras que no se halló expresión en los correspondientes tejidos humanos. Estas diferencias podrían ser atribuibles a la distribución de tejido específica de especie y/o cepa. Estos datos indican que el hígado es el único órgano de ratón en que KL β y FGFR4 se coexpresan de manera elevada.

60 **Ejemplo 13: FGF19 actúa específicamente en hígado de ratón.**

[0463] Para determinar el sitio específico de acción de FGF19, se compararon los niveles de la expresión de c-Fos en órganos de ratones inyectados con FGF19 con aquellos ratones inyectados con PBS (controles). Se eligió controlar la respuesta de c-Fos a FGF19 porque la expresión de c-Fos es ubicua y su inducción es sensible a la

estimulación de FGF19. La expresión de c-Fos fue 1300 veces superior en los hígados de ratones inyectados con FGF19 en comparación con los hígados de ratones inyectados con PBS (Figura 4E). La inducción de c-fos dependiente de FGF19 fue de por lo menos 150 veces menor en todos los otros órganos analizados. La actividad de FGF19 en el hígado se confirmó por la inhibición en un 98% de la expresión de CYP7A1 (Figura 4F). Estos datos demuestran que FGF19 actúa específicamente en el hígado, el único órgano del ratón que expresa niveles elevados de KLβ y FGFR4.

[0464] Conjuntamente, los datos mostrados en los ejemplos 12 y 13 demuestran que FGF19 requiere la unión de KLβ a FGFR4, la señalización intracelular y la modulación génica cascada abajo. De manera más destacada, el requisito para KLβ limita la actividad endocrina de FGF19 a los tejidos que expresan FGFR4 y KLβ. La actividad específica del hígado de FGF19 está soportado por este mecanismo molecular. Estos datos demuestran que el hígado es el sitio de acción principal de FGF19 en el ratón.

Ejemplo 14: El tratamiento con anticuerpo anti-KLβ in vivo inhibe la inducción de c-Fos dependiente de FGF19 en hígado de ratón.

[0465] Para evaluar el requisito de KLβ para la actividad de FGF19 in vivo, se determinó la inducción de c-Fos dependiente de FGF19 en hígado de ratón tratado con un anticuerpo contra KLβ para diferentes periodos de tiempo. El tratamiento de ratones con 2,5 mg/kg de anticuerpo contra KLβ 3, 9 ó 24 horas antes de una inyección de FGF19 redujo la inducción de c-Fos mediada por FGF19 específica de hígado en un 58%, 68% y 91% respectivamente (Figura 8).

[0466] Estos datos indican que es necesario la KLβ para la señalización de FGF19 a través de FGFR4 in vivo. Además, los datos demuestran además que se pueden utilizar anticuerpos específicos de KLβ para inhibir la actividad de FGF19 in vivo.

Ejemplo 15: Análisis de la expresión de KLβ y FGFR4 en tejidos normales y de cáncer.

[0467] La expresión de KLβ y FGFR4 se evaluó en una variedad de tejidos humanos mediante el análisis de la base de datos de BioExpress Gene Logic, Inc., Gaithersburg, MD, USA). Al disminuir el orden de la intensidad de la señal, se expresaba KLβ en tejidos adiposo, hígado, páncreas y mama (Figura 4A). Al disminuir el orden de la intensidad de la señal, FGFR4 se expresó en tejido de hígado, pulmón, vesícula biliar, intestino delgado, páncreas, colon, linfode, ovario y mama (Figura 4B). Estos datos muestran que la expresión de KLβ se limita sólo a pocos tejidos, mientras que la expresión de FGFR4 se distribuye de manera más amplia. Se observó un nivel elevado de coexpresión de KLβ y FGFR4 en hígado y páncreas. Debido a que la expresión de KLβ y FGFR4 es necesaria para la actividad de FGF19, este hallazgo sugiere que el hígado y páncreas son los órganos principales en que son activos. También se observaron niveles marginales de la expresión de KLβ y FGFR4 en tejidos de mama. KLβ se expresó de forma elevada en tejidos adiposo, pero la ausencia de FGFR4 excluye la función de FGF19 en este tejido. Es posible que KLβ induzca la actividad de otros miembros de la familia de FGF endocrinos con especificidad de unión a FGFR diferente en tejidos adiposos. De manera destacada, FGF21 regula la captación de glucosa al actuar específicamente en tejido adiposo mediante un mecanismo endocrino (Kharitonov, A, et al (2005) J Clin Invest 115:1627-35). Debido a su baja afinidad de unión a heparina, FGF21 podría requerir que KLβ señale a través de FGFR1 y FGFR2 (Goetz, R et al (2007) Mol Cell Biol 27:3417-28; Kharitonov, supra).

[0468] La expresión de KLβ y FGFR4 también se evaluaron en una serie de tejidos de cáncer. La expresión de KLβ en general se reduce en otros tejidos de cáncer en comparación con el tejido normal relevante (figura 9). En orden decreciente de intensidad de señal, el FGFR4 se expresa en los siguientes tejidos de cáncer: hígado, colon, estómago, esófago, riñón, testículos, intestino delgado, páncreas, ovarios y mamas (figura 10). Estos datos muestran que la expresión de FGFR4 se distribuye de manera amplia y que su expresión normal se altera en el cáncer.

Ejemplo 16: Discusión

[0469] En este estudio, se han proporcionado evidencias de que FGF19 requiere que KLβ se una a FGFR4, la señalización intracelular y la modificación génica cascada abajo. Sin embargo, la razón para dicha necesidad no está aún clara. En comparación con los miembros de la familia de FGF paracrina, FGF19 presenta una afinidad de unión a heparina baja que permite que actúe de una manera endocrina sin estar unido al proteoglicano pericelular de las células secretoras (3, 6, 8, 15). La topología del sitio de unión a heparina de FGF19 evita que FGF19 forme enlaces de hidrógeno con heparina cuando FGF19 se une a su receptor (5). Por tanto, KLβ puede actuar como un coreceptor de FGFR4 que estabiliza la interacción débil de FGF19-FGFR4-heparina.

[0470] Además, se ha observado que FGFR4 y KLβ interaccionaban fácilmente de una manera independiente de la heparina y el ligando en la superficie celular. Este resultado contrasta con la formación del complejo dependiente de la heparina y el ligando observada con las proteínas FGFR4 y KLβ quiméricas secretadas. Esta discrepancia puede indicar un papel para los dominios transmembrana de KLβ y FGFR4 en la formación del complejo. Los dominios transmembrana de KLβ y FGFR4 podrían interaccionar directamente entre sí o inducir la interacción de las proteínas

mediante su unión a la superficie celular. El complejo en la superficie celular de KL β -FGFR4 podría alterar la dimerización de los receptores inducida por heparina y ligando que se describió previamente para los FGF paracrin. (18, 20).

[0471] Se observó una expresión elevada de KL β en tejido adiposo. Sin embargo, la ausencia de la expresión de FGFR4 excluye la actividad de FGF19 en este tejido. Por lo tanto, es posible que el KL β induzca la actividad de otros miembros de la familia de FGF endocrinos con diferente especificidad de unión a FGFR en tejidos adiposos. De manera destacada, se observó recientemente que KL β era necesario para la actividad específica de tejido adiposo de FGF21 (17). Debido a su baja afinidad de unión a heparina, FGF21 podría requerir señalar KL β a través de FGFR1 y FGFR2 (6, 12).

[0472] Conjuntamente, estos datos demuestran que FGF19 requiere la unión de KL β a FGFR4, la señalización intracelular y la modulación génica cascada abajo. De manera más destacada, el requisito para KL β limita la actividad endocrina de FGF19 a los tejidos que expresan FGFR4 y KL β . La actividad específica del hígado de FGF19 está soportado por este mecanismo molecular.

Lista parcial de referencias

[0473]

1. Ashida, R., et al. 2005. Inflammopharmacology 13:113-25.
2. Chiang, J. Y. 2004. J Hepatol 40:539-51.
3. Choi, M., A. et al. 2006. Nat Med 12:1253-5.
4. Fu, L., et al. 2004. Endocrinology 145:2594-603.
5. Goetz, R., A. et al. 2007. Mol Cell Biol 27:3417-28.
6. Harmer, N. J., et al. 2004. Biochemistry 43:629-40.
7. Hess, J., P. Angel, and M. Schorpp-Kistner. 2004. J Cell Sci 117:5965-73.
8. Inagaki, T., M. et al. 2005. Cell Metab 2:217-25.
9. Ito, S., T. et al. 2005. J Clin Invest 115:2202-8.
10. Ito, S. et al. 2000. Mech Dev 98:115-9.
11. Jelinek, D. F. et al. 1990. J Biol Chem 265:8190-7.
12. Kharitonov, A. et al. 2005. J Clin Invest 115:1627-35.
13. Kurosu, H. et al. 2006. J Biol Chem 281:6120-3.
14. Li, Y. C. et al. 1990. J Biol Chem 265:12012-9.
15. Lundasen, T. et al. 2006. J Intern Med 260:530-6.
16. Nicholes, K. et al. 2002. Am J Pathol 160:2295-307.
17. Ogawa, Y. et al. (2007) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104, 7432-7437
18. Plotnikov, A. N. et al. 1999. Cell 98:641-50.
19. Russell, D. W. 2003. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. Annu Rev Biochem 72:137-74.
20. Schlessinger, J. et al. 2000. Mol Cell 6:743-50.
21. Shaulian, E., and M. Karin. 2002. Nat Cell Biol 4:E131-6.
22. Tomlinson, E. et al. 2002. Endocrinology 143:1741-7.
23. Trauncr, M., and J. L. Boyer. 2004. Curr Opin Gastroenterol 20:220-30.
24. Urakawa, I. et al. 2006. Nature 444:770-4.
25. Winer, J. et al. 1999. Anal Biochem 270:41-9.
26. Xie, M. H. et al. 1999. Cytokine 11:729-35.

Listado de secuencias

[0474]

<110> GENENTECH, INC.

<120> KLOTHO BETA

<130> P2477R1 WO

<140> PCT/US2008/059032

<141> 2008-01-04

<150> US 60/909,699

<151> 2007-04-02

<150> US 60/916,187

<151> 2007-05-04

<160> 58

ES 2 422 605 T3

<210> 1
 <211> 3132
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 1

```

atgaagccag gctgtgcggc aggatctcca gggaatgaat ggattttctt 50
10  cagcactgat gaaataacca cacgctatag gaatacaatg tccaacgggg 100
    gattgcaaag atctgtcatc ctgtcagcac ttattctgct acgagctgtt 150
    actggattct ctggagatgg aagagctata tgggtctaaaa atcctaattt 200
15  tactccggta aatgaaagtc agctgtttct ctatgacact ttccctaaaa 250
    actttttctg ggggtattggg actggagcat tgcaagtgga agggagtgg 300
20  aagaaggatg gaaaaggacc ttctatatgg gatcatttca tccacacaca 350
    ccttaaaaaat gtcagcagca cgaatgggtc cagtgacagt tatatttttc 400
    tggaaaaaga cttatcagcc ctggatttta taggagtttc tttttatcaa 450
25  ttttcaattt cctggccaag gcttttcccc gatggaatag taacagtgtc 500
    caacgcaaaa ggtctgcagt actacagtac tcttctggac gctctagtgc 550
30  ttagaaacat tgaacctata gttactttat accactggga ttgaccttg 600
    gcactacaag aaaaatatgg ggggtggaaa aatgatacca taatagatat 650
    cttcaatgac tatgccacat actgtttcca gatgtttggg gaccgtgtca 700
35  aatattggat tacaattcac aaccatatac tagtggcttg gcatgggtat 750
    gggacaggta tgcatgcccc tggagagaag ggaaatttag cagctgtcta 800
40  cactgtggga cacaacttga tcaaggctca ctcgaaagtt tggcataact 850
    acaacacaca tttccgcca catcagaagg gttggttata gatcacgttg 900
    ggatctcatt ggatcgagcc aaaccggtcg gaaaacacga tggatatatt 950
45  caaatgtcaa caatccatgg tttctgtgct tggatggttt gccaaccta 1000
    tccatgggga tggcgactat ccagagggga tgagaaagaa gttgttctcc 1050
50  gttctaccca ttttctctga agcagagaag catgagatga gaggcacagc 1100
    tgattttctt gccttttctt ttggacccaa caacttcaag cccctaaaca 1150
    ccatggctaa aatgggacaa aatgtttcac ttaatttaag agaagcgctg 1200
55  aactggatta aactggaata caacaacct cgaatcttga ttgctgcgaa 1250
    tggctggttc acagacagtc gtgtgaaaac agaagacacc acggccatct 1300
60  acatgatgaa gaatttcctc agccagggtc ttcaagcaat aaggtagat 1350
    gaaatacgag tgtttgggta tactgcctgg tctctcctgg atggctttga 1400
    atggcaggat gcttacacca tccgccgagg attattttat gtggatttta 1450
65  acagtaaaca gaaagagcgg aaacctaatg cttcagcaca ctactacaaa 1500
    cagatcatac gagaaaatgg tttttcttta aaagagtcca cgccagatgt 1550
  
```

ES 2 422 605 T3

```

gcagggccag tttccctgtg acttctcctg ggggtgtcact gaatctgttc 1600
ttaagcccga gtctgtggct tcgtccccac agttcagcga tcctcatctg 1650
5  tacgtgtgga acgccactgg caacagactg ttgcaccgag tggaaggggt 1700
gaggctgaaa acacgacccg ctcaatgcac agattttgta aacatcaaaa 1750
10 aacaacttga gatgttggca agaatgaaag tcacccacta ccggtttgct 1800
ctggattggg cctcggtcct tcccactggc aacctgtccg cgggtgaaccg 1850
acaggccctg aggtactaca ggtgcgtggc cagtgaagggg ctgaagcttg 1900
15 gcatctccgc gatggtcacc ctgtattatc cgaccacgc ccacctaggc 1950
ctccccgagc ctctgttgca tgccgacggg tggtgaacc catcgacggc 2000
20 cgaggccttc caggcctacg ctgggctgtg cttccaggag ctggggggacc 2050
tggtgaagct ctggatcacc atcaacgcgc ctaaccggct aagtgacatc 2100
tacaaccgct ctggcaacga cacctacggg gcggcgacac accctgctggc 2150
25 ggcccacgcc ctggcctggc gcctctacga ccggcagttc aggccctcac 2200
agcgcgggggc cgtgtcgtg tcgctgcacg cggactgggc ggaacccgcc 2250
30 aaccctatg ctgactcgca ctggagggcg gccgagcgct tcctgcagtt 2300
cgagatcgcc tggttcgccg agccgctctt caagaccggg gactaccccg 2350
cggccatgag ggaatacatt gcctccaagc accgacgggg gctttccagc 2400
35 tcggccctgc cgcgcctcac cgaggccgaa aggaggctgc tcaagggcac 2450
ggtcgacttc tgcgcgtca accacttcac cactagggtc gtgatgcacg 2500
40 agcagctggc cggcagccgc tacgactcgg acagggacat ccagtttctg 2550
caggacatca cccgcctgag ctccccccacg cgcttggtg tgattccctg 2600
gggggtgcgc aagctgctgc ggtgggtccg gaggaactac ggcgacatgg 2650
45 acatttacat caccgccagt ggcacgacg accaggctct ggaggatgac 2700
cggctccgga agtactacct agggaaagtac cttcaggagg tgctgaaagc 2750
50 atacctgatt gataaagtca gaatcaaagg ctattatgca ttcaaactgg 2800
ctgaagagaa atctaaaccc agatttggat tcttcacatc tgattttaaa 2850
gctaaatcct caatacaatt ttacaacaaa gtgatcagca gcaggggctt 2900
55 cccttttgag aacagtagtt ctagatgcag tcagacccaa gaaaatacag 2950
agtgcactgt ctgcttattc cttgtgcaga agaaaccact gatattcctg 3000
60 ggttggttgc tcttctccac cctgggttcta ctcttatcaa ttgccatttt 3050
tcaaaggcag aagagaagaa agttttggaa agcaaaaaac ttacaacaca 3100
taccattaaa gaaaggcaag agagttgtta gc 3132
65

```

<210> 2
 <211> 1044
 <212> PRT

ES 2 422 605 T3

<213> Homo sapiens

<400> 2

5	Met	Lys	Pro	Gly	Cys	Ala	Ala	Gly	Ser	Pro	Gly	Asn	Glu	Trp	Ile
	1				5					10					15
	Phe	Phe	Ser	Thr	Asp	Glu	Ile	Thr	Thr	Arg	Tyr	Arg	Asn	Thr	Met
					20					25					30
10	Ser	Asn	Gly	Gly	Leu	Gln	Arg	Ser	Val	Ile	Leu	Ser	Ala	Leu	Ile
					35					40					45
	Leu	Leu	Arg	Ala	Val	Thr	Gly	Phe	Ser	Gly	Asp	Gly	Arg	Ala	Ile
					50					55					60
15	Trp	Ser	Lys	Asn	Pro	Asn	Phe	Thr	Pro	Val	Asn	Glu	Ser	Gln	Leu
					65					70					75
	Phe	Leu	Tyr	Asp	Thr	Phe	Pro	Lys	Asn	Phe	Phe	Trp	Gly	Ile	Gly
					80					85					90
20	Thr	Gly	Ala	Leu	Gln	Val	Glu	Gly	Ser	Trp	Lys	Lys	Asp	Gly	Lys
					95					100					105
25	Gly	Pro	Ser	Ile	Trp	Asp	His	Phe	Ile	His	Thr	His	Leu	Lys	Asn
					110					115					120
	Val	Ser	Ser	Thr	Asn	Gly	Ser	Ser	Asp	Ser	Tyr	Ile	Phe	Leu	Glu
					125					130					135
30	Lys	Asp	Leu	Ser	Ala	Leu	Asp	Phe	Ile	Gly	Val	Ser	Phe	Tyr	Gln
					140					145					150
	Phe	Ser	Ile	Ser	Trp	Pro	Arg	Leu	Phe	Pro	Asp	Gly	Ile	Val	Thr
					155					160					165
35	Val	Ala	Asn	Ala	Lys	Gly	Leu	Gln	Tyr	Tyr	Ser	Thr	Leu	Leu	Asp
					170					175					180
40	Ala	Leu	Val	Leu	Arg	Asn	Ile	Glu	Pro	Ile	Val	Thr	Leu	Tyr	His
					185					190					195
	Trp	Asp	Leu	Pro	Leu	Ala	Leu	Gln	Glu	Lys	Tyr	Gly	Gly	Trp	Lys
					200					205					210
45	Asn	Asp	Thr	Ile	Ile	Asp	Ile	Phe	Asn	Asp	Tyr	Ala	Thr	Tyr	Cys
					215					220					225
	Phe	Gln	Met	Phe	Gly	Asp	Arg	Val	Lys	Tyr	Trp	Ile	Thr	Ile	His
					230					235					240
50	Asn	Pro	Tyr	Leu	Val	Ala	Trp	His	Gly	Tyr	Gly	Thr	Gly	Met	His
					245					250					255
55	Ala	Pro	Gly	Glu	Lys	Gly	Asn	Leu	Ala	Ala	Val	Tyr	Thr	Val	Gly
					260					265					270
	His	Asn	Leu	Ile	Lys	Ala	His	Ser	Lys	Val	Trp	His	Asn	Tyr	Asn
					275					280					285
60	Thr	His	Phe	Arg	Pro	His	Gln	Lys	Gly	Trp	Leu	Ser	Ile	Thr	Leu
					290					295					300
	Gly	Ser	His	Trp	Ile	Glu	Pro	Asn	Arg	Ser	Glu	Asn	Thr	Met	Asp
					305					310					315
65	Ile	Phe	Lys	Cys	Gln	Gln	Ser	Met	Val	Ser	Val	Leu	Gly	Trp	Phe
					320					325					330

ES 2 422 605 T3

	Ala Asn Pro Ile	His 335	Gly Asp Gly Asp	Tyr 340	Pro Glu Gly Met	Arg 345
5	Lys Lys Leu Phe	Ser 350	Val Leu Pro Ile	Phe 355	Ser Glu Ala Glu	Lys 360
	His Glu Met Arg	Gly 365	Thr Ala Asp Phe	Phe 370	Ala Phe Ser Phe	Gly 375
10	Pro Asn Asn Phe	Lys 380	Pro Leu Asn Thr	Met 385	Ala Lys Met Gly	Gln 390
	Asn Val Ser Leu	Asn 395	Leu Arg Glu Ala	Leu 400	Asn Trp Ile Lys	Leu 405
	Glu Tyr Asn Asn	Pro 410	Arg Ile Leu Ile	Ala 415	Ala Asn Gly Trp	Phe 420
20	Thr Asp Ser Arg	Val 425	Lys Thr Glu Asp	Thr 430	Thr Ala Ile Tyr	Met 435
	Met Lys Asn Phe	Leu 440	Ser Gln Val Leu	Gln 445	Ala Ile Arg Leu	Asp 450
25	Glu Ile Arg Val	Phe 455	Gly Tyr Thr Ala	Trp 460	Ser Leu Leu Asp	Gly 465
	Phe Glu Trp Gln	Asp 470	Ala Tyr Thr Ile	Arg 475	Arg Gly Leu Phe	Tyr 480
30	Val Asp Phe Asn	Ser 485	Lys Gln Lys Glu	Arg 490	Lys Pro Lys Ser	Ser 495
	Ala His Tyr Tyr	Lys 500	Gln Ile Ile Arg	Glu 505	Asn Gly Phe Ser	Leu 510
	Lys Glu Ser Thr	Pro 515	Asp Val Gln Gly	Gln 520	Phe Pro Cys Asp	Phe 525
40	Ser Trp Gly Val	Thr 530	Glu Ser Val Leu	Lys 535	Pro Glu Ser Val	Ala 540
	Ser Ser Pro Gln	Phe 545	Ser Asp Pro His	Leu 550	Tyr Val Trp Asn	Ala 555
45	Thr Gly Asn Arg	Leu 560	Leu His Arg Val	Glu 565	Gly Val Arg Leu	Lys 570
	Thr Arg Pro Ala	Gln 575	Cys Thr Asp Phe	Val 580	Asn Ile Lys Lys	Gln 585
	Leu Glu Met Leu	Ala 590	Arg Met Lys Val	Thr 595	His Tyr Arg Phe	Ala 600
55	Leu Asp Trp Ala	Ser 605	Val Leu Pro Thr	Gly 610	Asn Leu Ser Ala	Val 615
	Asn Arg Gln Ala	Leu 620	Arg Tyr Tyr Arg	Cys 625	Val Val Ser Glu	Gly 630
60	Leu Lys Leu Gly	Ile 635	Ser Ala Met Val	Thr 640	Leu Tyr Tyr Pro	Thr 645
	His Ala His Leu	Gly 650	Leu Pro Glu Pro	Leu 655	Leu His Ala Asp	Gly 660
65	Trp Leu Asn Pro	Ser Thr Ala Glu	Ala Phe Gln Ala Tyr	Ala Gly		

ES 2 422 605 T3

					665					670					675
	Leu	Cys	Phe	Gln	Glu 680	Leu	Gly	Asp	Leu	Val 685	Lys	Leu	Trp	Ile	Thr 690
5	Ile	Asn	Ala	Pro	Asn 695	Arg	Leu	Ser	Asp	Ile 700	Tyr	Asn	Arg	Ser	Gly 705
10	Asn	Asp	Thr	Tyr	Gly 710	Ala	Ala	His	Asn	Leu 715	Leu	Val	Ala	His	Ala 720
	Leu	Ala	Trp	Arg	Leu 725	Tyr	Asp	Arg	Gln	Phe 730	Arg	Pro	Ser	Gln	Arg 735
15	Gly	Ala	Val	Ser	Leu 740	Ser	Leu	His	Ala	Asp 745	Trp	Ala	Glu	Pro	Ala 750
	Asn	Pro	Tyr	Ala	Asp 755	Ser	His	Trp	Arg	Ala 760	Ala	Glu	Arg	Phe	Leu 765
20	Gln	Phe	Glu	Ile	Ala 770	Trp	Phe	Ala	Glu	Pro 775	Leu	Phe	Lys	Thr	Gly 780
25	Asp	Tyr	Pro	Ala	Ala 785	Met	Arg	Glu	Tyr	Ile 790	Ala	Ser	Lys	His	Arg 795
	Arg	Gly	Leu	Ser	Ser 800	Ser	Ala	Leu	Pro	Arg 805	Leu	Thr	Glu	Ala	Glu 810
30	Arg	Arg	Leu	Leu	Lys 815	Gly	Thr	Val	Asp	Phe 820	Cys	Ala	Leu	Asn	His 825
	Phe	Thr	Thr	Arg	Phe 830	Val	Met	His	Glu	Gln 835	Leu	Ala	Gly	Ser	Arg 840
35	Tyr	Asp	Ser	Asp	Arg 845	Asp	Ile	Gln	Phe	Leu 850	Gln	Asp	Ile	Thr	Arg 855
40	Leu	Ser	Ser	Pro	Thr 860	Arg	Leu	Ala	Val	Ile 865	Pro	Trp	Gly	Val	Arg 870
	Lys	Leu	Leu	Arg	Trp 875	Val	Arg	Arg	Asn	Tyr 880	Gly	Asp	Met	Asp	Ile 885
45	Tyr	Ile	Thr	Ala	Ser 890	Gly	Ile	Asp	Asp	Gln 895	Ala	Leu	Glu	Asp	Asp 900
	Arg	Leu	Arg	Lys	Tyr 905	Tyr	Leu	Gly	Lys	Tyr 910	Leu	Gln	Glu	Val	Leu 915
50	Lys	Ala	Tyr	Leu	Ile 920	Asp	Lys	Val	Arg	Ile 925	Lys	Gly	Tyr	Tyr	Ala 930
55	Phe	Lys	Leu	Ala	Glu 935	Glu	Lys	Ser	Lys	Pro 940	Arg	Phe	Gly	Phe	Phe 945
	Thr	Ser	Asp	Phe	Lys 950	Ala	Lys	Ser	Ser	Ile 955	Gln	Phe	Tyr	Asn	Lys 960
60	Val	Ile	Ser	Ser	Arg 965	Gly	Phe	Pro	Phe	Glu 970	Asn	Ser	Ser	Ser	Arg 975
	Cys	Ser	Gln	Thr	Gln 980	Glu	Asn	Thr	Glu	Cys 985	Thr	Val	Cys	Leu	Phe 990
65	Leu	Val	Gln	Lys	Lys 995	Pro	Leu	Ile	Phe	Leu 1000	Gly	Cys	Cys	Phe	Phe 1005

ES 2 422 605 T3

Ser Thr Leu Val Leu Leu Leu Ser Ile Ala Ile Phe Gln Arg Gln
 1010 1015 1020
 5 Lys Arg Arg Lys Phe Trp Lys Ala Lys Asn Leu Gln His Ile Pro
 1025 1030 1035
 Leu Lys Lys Gly Lys Arg Val Val Ser
 1040
 10 <210> 3
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> la secuencia está sintetizada
 <400> 3
 20 cgggcgctag catgaagcca ggctgtgcgg cagg 34
 <210> 4
 <211> 63
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> la secuencia está sintetizada
 <400> 4
 30 cagtggatcc ttacttatcg tcgtcatcct tgtaatcgct aacaactctc 50
 ttgcctttct ttc 63
 <210> 5
 35 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> la secuencia está sintetizada
 <400> 5
 ccgccggaata tcatgcggct gctgctggcc ctgttgg 37
 45 <210> 6
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> la secuencia está sintetizada
 <400> 6
 55 ccgccggaat tctgtctgca cccagaccc gaagggg 37
 <210> 7
 <211> 79
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> la secuencia está sintetizada
 <400> 7
 65 ggtctgggggt gcagacaggt aagcctatcc ctaaccctct cctcggtctc 50
 gattctacgt aggaattcgg atccgcggc 79

<210> 8
 <211> 79
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> la secuencia está sintetizada

 10 <400> 8
 gccgcggatc cgaattccta cgtagaatcg agaccgagga gagggtagg 50
 gataggctta cctgtctgca cccagacc 79

 15 <210> 9
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> la secuencia está sintetizada

 <400> 9
 25 gaattccacc atgaagccag gctgtgcggc aggatctcca g 41

 <210> 10
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> la secuencia está sintetizada

 <400> 10
 35 ggcgcgccga caaggaataa gcagacagtg cactctg 37

 <210> 11
 <211> 42
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> la secuencia está sintetizada

 <400> 11
 45 ccctcgaatc ttgattgctg cgaatggctg gttcacagac ag 42

 <210> 12
 <211> 42
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> la secuencia está sintetizada
 55
 <400> 12
 ctgtctgtga accagccatt cgcagcaatc aagattcgag gg 42

 <210> 13
 60 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 65 <223> la secuencia está sintetizada

<400> 13
 gctctggatc accatcaacg cgcctaaccg gctaagtgac 40
 <210> 14
 5 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> la secuencia está sintetizada
 <400> 14
 gtcacttagc cggttaggcg cgttgatggt gatccagagc 40
 15 <210> 15
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> la secuencia está sintetizada
 <400> 15
 25 agcggattct catggaaca 19
 <210> 16
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> la secuencia está sintetizada
 <400> 16
 35 ctggtcagcc aggagctt 18
 <210> 17
 <211> 24
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> la secuencia está sintetizada
 45 <400> 17
 tccacaagct gaaggcagac aagg 24
 <210> 18
 <211> 25
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> la secuencia está sintetizada
 55 <400> 18
 gcagtcagac ccaagaaaat acaga 25
 <210> 19
 60 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 65 <223> la secuencia está sintetizada

<400> 19
 cccaggaata tcagtggttt cttc 24

 <210> 20
 5 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 10 <223> la secuencia está sintetizada

 <400> 20
 tgcactgtct gcttattcct tgt 23

 15 <210> 21
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> la secuencia está sintetizada

 <400> 21
 25 cgagcccttt gatgacttcc t 21

 <210> 22
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> la secuencia está sintetizada

 <400> 22
 35 ggagcgggct gtctcaga 18

 <210> 23
 <211> 21
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> la secuencia está sintetizada

 <400> 23
 45 cccagcatca tccaggccca g 21

 <210> 24
 <211> 21
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> la secuencia está sintetizada

 55 <400> 24
 agtccttcca cctcgacgtt t 21

 <210> 25
 60 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 65 <223> la secuencia está sintetizada

<400> 25
 aatcgagtct gtttccagca gaa 23

 5 <210> 26
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 10 <223> la secuencia está sintetizada

 <400> 26
 agccccccct tccacttttt 20

 15 <210> 27
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> la secuencia está sintetizada

 <400> 27
 25 cgттаacagt gggтgccaac t 21

 <210> 28
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> la secuencia está sintetizada

 <400> 28
 35 cccgacggtc tctcttcaaa 20

 <210> 29
 <211> 24
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> la secuencia está sintetizada

 45 <400> 29
 atgctaacgc agcagttgca aaca 24

 <210> 30
 <211> 20
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> la secuencia está sintetizada

 55 <400> 30
 tgtggtgagc gaaggactga 20

 <210> 31
 60 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 65 <223> la secuencia está sintetizada

<400> 31
 ggagtgggtt gggtggtaca 20
 5 <210> 32
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> la secuencia está sintetizada
 <400> 32
 ctgggcgtct tcccatgg 19
 15 <210> 33
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> la secuencia está sintetizada
 <400> 33
 25 cctgcccctt ctcaacga 18
 <210> 34
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> la secuencia está sintetizada
 <400> 34
 35 tccacgttgc tgatgctctt 20
 <210> 35
 <211> 22
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> la secuencia está sintetizada
 45 <400> 35
 ccaagccatc cttggagcca gt 22
 <210> 36
 <211> 22
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> la secuencia está sintetizada
 55 <400> 36
 cgccagcctg tcactataca aa 22
 <210> 37
 60 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 65 <223> la secuencia está sintetizada

<400> 37
 ccagaggacc tcgactccaa 20

 5 <210> 38
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 10 <223> la secuencia está sintetizada

 <400> 38
 cgtttccctt tggcccgaca gttct 25

 15 <210> 39
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> la secuencia está sintetizada

 <400> 39
 25 gcacacuacu acaaacagau u 21

 <210> 40
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> la secuencia está sintetizada

 <400> 40
 35 ucuguuugua guagugugcu u 21

 <210> 41
 <211> 21
 <212> ARN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> la secuencia está sintetizada

 45 <400> 41
 gcacgaaugg uuccagugau u 21

 <210> 42
 <211> 21
 50 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> la secuencia está sintetizada

 55 <400> 42
 ucacuggaac cauucgugcu u 21

 <210> 43
 60 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 65 <223> la secuencia está sintetizada

<400> 43
 cgauggauau auucaaau u 21

 <210> 44
 5 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 10 <223> la secuencia está sintetizada

 <400> 44
 cauugaaua uaucauau u 21

 15 <210> 45
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> la secuencia está sintetizada

 <400> 45
 25 ugaauaacc acacguauu u 21

 <210> 46
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> la secuencia está sintetizada

 <400> 46
 35 auagcgugug guauuuau u 21

 <210> 47
 <211> 19
 <212> ARN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> la secuencia está sintetizada

 45 <400> 47
 ugguuuau guuccaau 19

 <210> 48
 <211> 19
 50 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> la secuencia está sintetizada

 55 <400> 48
 uauuggaaca uguaaacca 19

 <210> 49
 60 <211> 3159
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 65 <223> la secuencia está sintetizada

ES 2 422 605 T3

<400> 49
atgaagccag gctgtgcggc aggatctcca gggaatgaat ggattttctt 50
5 cagcactgat gaaataacca cacgctatag gaatacaatg tccaacgggg 100
gattgcaaag atctgtcatc ctgtcagcac ttattctgct acgagctgtt 150
actggatttct ctggagatgg aagagctata tgggtctaaaa atcctaattt 200
10 tactccggta aatgaaagtc agctgtttct ctatgacact ttccctaaaa 250
actttttctg ggggtattggg actggagcat tgcaagtgga agggagtgg 300
aagaaggatg gaaaaggacc ttctatatgg gatcatttca tccacacaca 350
15 ccttaaaaaat gtcagcagca cgaatgggtc cagtgcacagt tatatttttc 400
tggaanaaga cttatcagcc ctggatttta taggagtttc tttttatcaa 450
20 ttttcaattt cctggccaag gcttttcccc gatggaatag taacagttagc 500
caacgcaaaa ggtctgcagt actacagtac tcttctggac gctctagtgc 550
ttagaaacat tgaacctata gttactttat accactggga ttgaccttg 600
25 gcactacaag aaaaatatgg ggggtggaaa aatgatacca taatagatat 650
cttcaatgac tatgccacat actgtttcca gatgtttggg gaccgtgtca 700
30 aatattggat tacaattcac aaccatatac tagtggcttg gcatgggtat 750
gggacaggta tgcattcccc tggagagaag ggaaatttag cagctgtcta 800
cactgtggga cacaacttga tcaaggctca ctcgaaagt ttggcataact 850
35 acaacacaca tttccgcca catcagaagg gttggttata gatcacgttg 900
ggatctcatt ggatcgagcc aaaccggctg gaaaacacga tggatatatt 950
40 caaatgtcaa caatccatgg tttctgtgct tggatgggtt gccaaccta 1000
tccatgggga tggcgactat ccagagggga tgagaaagaa gttgttctcc 1050
gttctaccca ttttctctga agcagagaag catgagatga gaggcacagc 1100
45 tgatttcttt gccttttctt ttggacccaa caacttcaag cccctaaaca 1150
ccatggctaa aatgggacaa aatgtttcac ttaatttaag agaagcgctg 1200
50 aactggatta aactggaata caacaacct cgaatcttga ttgctgagaa 1250
tggctgggtc acagacagtc gtgtgaaaac agaagacacc acggccatct 1300
acatgatgaa gaatttcctc agccagggtc ttcaagcaat aaggtagat 1350
55 gaaatacgag tggttggtta tactgcctgg tctctcctgg atggcttga 1400
atggcaggat gcttacacca tccgccgagg attattttat gtggatttta 1450
60 acagtaaaca gaaagagcgg aaacctaatg cttcagcaca ctactacaaa 1500
cagatcatac gagaaaatgg ttttcttta aaagagtcca cgccagatgt 1550
gcagggccag tttccctgtg acttctcctg ggggtgtcact gaatctgttc 1600
65 ttaagcccga gtctgtggct tcgtccccac agttcagcga tcctcatctg 1650
tacgtgtgga acgccaactg caacagactg ttgcaccgag tggaaggggt 1700

ES 2 422 605 T3

gaggctgaaa acacgacccg ctcaatgcac agatttttcta aacatcaaaa 1750
 5 aacaacttga gatgttggca agaataaaag tcacccacta ccggttttgct 1800
 ctggattggg cctcggtcct tcccactggc aacctgtccg cggatgaaccg 1850
 acaggccctg aggtactaca ggtgcgtggg cagtgaagggg ctgaagcttg 1900
 10 gcatctccgc gatggtcacc ctgtattatc cgacccacgc ccacctaggc 1950
 ctccccgagc ctctgttgca tgccgacggg tggctgaacc catcgacggc 2000
 cgaggccttc caggcctacg ctgggctgtg cttccaggag ctggggggacc 2050
 15 tggatgaagct ctggatcacc atcaacgagc ctaaccggct aagtgaacatc 2100
 tacaaccgct ctggcaacga cacctacggg gcggcgacac accctgctggg 2150
 20 ggcccacgcc ctggcctggc gcctctacga ccggcagttc aggcctcac 2200
 agcgcgggggc cgtgtcgtg tcgctgcacg cggactgggc ggaacccgcc 2250
 aaccctatg ctgactcgca ctggagggcg gccgagcgct tcctgcagtt 2300
 25 cgagatcgcc tgggttcgcc agccgctctt caagaccggg gactaccccg 2350
 cggccatgag ggaatacatt gcctccaagc accgacgggg gctttccagc 2400
 30 tcggccctgc cgcgcctcac cgaggccgaa aggaggctgc tcaagggcac 2450
 ggtcgacttc tgcgcgtca accacttcac cactagggtc gtgatgcacg 2500
 agcagctggc cggcagccgc tacgactcgg acagggacat ccagtttctg 2550
 35 caggacatca cccgcctgag ctccccacg cgctggctg tgattccctg 2600
 gggggtgcgc aagctgctgc ggtgggtccg gaggaactac ggcgacatgg 2650
 40 acatttacat caccgccagt ggcacgacg accaggctct ggaggatgac 2700
 cggctccgga agtactacct aggggaagtac cttcaggagg tgctgaaagc 2750
 atacctgatt gataaagtca gaatcaaagg ctattatgca ttcaaactgg 2800
 45 ctgaagagaa atctaaacc agatttggat tcttcacatc tgattttaaa 2850
 gctaaatcct caatacaatt ttacaacaaa gtgatcagca gcaggggctt 2900
 50 cccttttgag aacagtagtt ctagatgcag tcagacccaa gaaaatacag 2950
 agtgcactgt ctgcttattc cttgtgcaga agaaaccact gatattcctg 3000
 55 ggttggttgc tcttctccac cctggttcta ctcttatcaa ttgccatttt 3050
 tcaaaggcag aagagaagaa agttttggaa agcaaaaaac ttacaacaca 3100
 taccattaaa gaaaggcaag agagttgtta gcgattacaa ggatgacgac 3150
 60 gataagtaa 3159

<210> 50

<211> 3012

<212> ADN

65 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> la secuencia está sintetizada

ES 2 422 605 T3

```

<400> 50
atgaagccag gctgtgcggc aggatctcca gggaatgaat ggattttctt 50
5  cagcactgat gaaataacca cacgctatag gaatacaatg tccaacgggg 100
   gattgcaaag atctgtcatc ctgtcagcac ttattctgct acgagctgtt 150
   actggattct ctggagatgg aagagctata tgggtctaaaa atcctaattt 200
10  tactccggta aatgaaagtc agctgtttct ctatgacact ttccctaaaa 250
   actttttctg ggggtattggg actggagcat tgcaagtgga agggagtgtg 300
   aagaaggatg gaaaaggacc ttctatatgg gatcatttca tccacacaca 350
   ccttaaaaat gtcagcagca cgaatggttc cagtgacagt tatatttttc 400
   tggaaaaaga cttatcagcc ctggatttta taggagtttc tttttatcaa 450
20  ttttcaattt cctggccaag gcttttcccc gatggaatag taacagtgtc 500
   caacgcaaaa ggtctgcagt actacagtac tcttctggac gctctagtgc 550
   ttagaaacat tgaacctata gttactttat accactggga ttgacctttg 600
   gcactacaag aaaaatatgg ggggtggaaa aatgatacca taatagatat 650
   cttcaatgac tatgccacat actgtttcca gatgtttggg gaccgtgtca 700
30  aatattggat tacaattcac aaccatatac tagtggcttg gcatgggtat 750
   gggacaggta tgcatgcccc tggagagaag ggaaatttag cagctgtcta 800
   cactgtggga cacaacttga tcaaggctca ctcgaaagt tggcataact 850
   acaacacaca tttccgcca catcagaagg gttggttatc gatcacgttg 900
   ggatctcatt ggatcgagcc aaaccggtcg gaaaacacga tggatatatt 950
40  caaatgtcaa caatccatgg tttctgtgct tggatggttt gccaacccta 1000
   tccatgggga tggcgactat ccagagggga tgagaaaagaa gttgttctcc 1050
   gttctaccca ttttctctga agcagagaag catgagatga gaggcacagc 1100
   tgatttcttt gccttttctt ttggacccaa caacttcaag cccctaaaca 1150
   ccatggctaa aatgggacaa aatgtttcac ttaatttaag agaagcgctg 1200
50  aactggatta aactggaata caacaaccct cgaatcttga ttgctgagaa 1250
   tggctggttc acagacagtc gtgtgaaaac agaagacacc acggccatct 1300
   acatgatgaa gaatttcctc agccagggtgc ttcaagcaat aaggttagat 1350
   gaaatacgag tgtttgggta tactgcctgg tctctcctgg atggctttga 1400
   atggcaggat gcttacacca tccgccgagg attattttat gtggatttta 1450
60  acagtaaaca gaaagagcgg aaacctaatg cttcagcaca ctactacaaa 1500
   cagatcatac gagaaaatgg ttttctttta aaagagtcca cgccagatgt 1550
   gcagggccag tttccctgtg acttctcctg ggggtgtcact gaatctgttc 1600
65  ttaagccga gtctgtggct tcgtccccac agttcagcga tcctcatctg 1650

```

ES 2 422 605 T3

tacgtgtgga acgccactgg caacagactg ttgcaccgag tggaaggggt 1700
 gaggctgaaa acacgacccg ctcaatgcac agattttgta aacatcaaaa 1750
 5 aacaacttga gatgttggca agaatgaaag tcaccacta ccggtttgct 1800
 ctggattggg cctcggtcct tccactggc aacctgtccg cgggtgaaccg 1850
 10 acaggccctg aggtactaca ggtgcgtggt cagtgaagggg ctgaagcttg 1900
 gcatctccgc gatggtcacc ctgtattatc cgacccacgc ccacctaggc 1950
 ctccccgagc ctctgttgca tgccgacggg tggtgaacc catcgacggc 2000
 15 cgaggccttc caggcctacg ctgggctgtg cttccaggag ctgggggacc 2050
 tggatgaagct ctggatcacc atcaacgagc ctaaccggct aagtgcacatc 2100
 20 tacaaccgct ctggcaacga cacctacggg gcggcgacac acctgctggt 2150
 ggcccacgcc ctggcctggc gcctctacga ccggcagttc aggccctcac 2200
 agcgcggggc cgtgtcgtg tcgctgcacg cggactgggc ggaacccgcc 2250
 25 aaccctatg ctgactcgca ctggagggcg gccgagcgt tcctgcagtt 2300
 cgagatcgcc tggttcgccg agccgctctt caagaccggg gactaccccg 2350
 cggccatgag ggaatacatt gcctccaagc accgacgggg gctttccagc 2400
 30 tcggccctgc cgcgcctcac cgaggccgaa aggaggctgc tcaagggcac 2450
 ggtcgacttc tgcgcgtca accacttcac cactagggtt gtgatgcacg 2500
 35 agcagctggc cggcagccgc tacgactcg acagggacat ccagtttctg 2550
 caggacatca cccgcctgag ctccccacg cgcttggtg tgattccctg 2600
 gggggtgctc aagctgctgc ggtgggtccg gaggaactac ggcgacatgg 2650
 40 acatttacat caccgccagt ggcacgacg accaggctct ggaggatgac 2700
 cggctccgga agtactacct aggggaagtac cttcaggagg tgctgaaagc 2750
 45 atacctgatt gataaagtca gaatcaaagg ctattatgca ttcaaactgg 2800
 ctgaagagaa atctaaacc agatttggat tcttcacatc tgattttaaa 2850
 gctaaatcct caatacaatt ttacaacaaa gtgatcagca gcaggggctt 2900
 50 cccttttgag aacagtagtt ctagatgcag tcagacccaa gaaaatacag 2950
 agtgcactgt ctgcttattc cttgtcggcg cgcccatca tcatcatcat 3000
 55 catcaccact aa 3012
 <210> 51
 <211> 3159
 <212> ADN
 60 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> la secuencia está sintetizada
 65 <400> 51
 atgaagccag gctgtgcggc aggatctcca gggaatgaat ggattttctt 50
 cagcactgat gaaataacca cacgctatag gaatacaatg tccaacgggg 100

ES 2 422 605 T3

gattgcaaag atctgtcatc ctgtcagcac ttattctgct acgagctgtt 150
 5 actggattct ctggagatgg aagagctata tgggtctaaaa atcctaattt 200
 tactccggta aatgaaagtc agctgtttct ctatgacact ttccctaaaa 250
 actttttctg ggggtattggg actggagcat tgcaagtgga agggagttgg 300
 10 aagaaggatg gaaaaggacc ttctatatgg gatcatttca tccacacaca 350
 ccttaaaaat gtcagcagca cgaatgggtc cagtgacagt tatatttttc 400
 15 tggaaaaaga cttatcagcc ctggatttta taggagtttc tttttatcaa 450
 ttttcaattt cctggccaag gcttttcccc gatggaatag taacagttgc 500
 caacgcaaaa ggtctgcagt actacagtac tcttctggac gctctagtgc 550
 20 ttagaaacat tgaacctata gttactttat accactggga ttgaccttg 600
 gcactacaag aaaaatatgg ggggtggaaa aatgatacca taatagatat 650
 25 cttcaatgac tatgccacat actgtttcca gatgtttggg gaccgtgtca 700
 aatattggat tacaattcac aacctatc tagtggcttg gcatgggtat 750
 gggacaggta tgcattgccc tggagagaag ggaaatttag cagctgtcta 800
 30 cactgtggga cacaacttga tcaaggctca ctcgaaagt tggcataact 850
 acaacacaca tttccgcca catcagaagg gttggttatc gatcacgttg 900
 35 ggatctcatt ggatcgagcc aaaccggtcg gaaaacacga tggatatatt 950
 caaatgtcaa caatccatgg tttctgtgct tggatgggtt gccaaccta 1000
 tccatgggga tggcgactat ccagagggga tgagaaagaa gttgttctcc 1050
 40 gttctacca ttttctctga agcagagaag catgagatga gaggcacagc 1100
 tgatttcttt gccttttctt ttggacccaa caacttcaag cccctaaaca 1150
 45 ccatggctaa aatgggacaa aatgtttcac ttaatttaag agaagcgctg 1200
 aactggatta aactggaata caacaacct cgaatcttga ttgctgcgaa 1250
 tggctgggtc acagacagtc gtgtgaaaac agaagacacc acggccatct 1300
 50 acatgatgaa gaatttcctc agccagggtgc ttcaagcaat aaggttagat 1350
 gaaatacgag tgtttgggta tactgcctgg tctctcctgg atggctttga 1400
 55 atggcaggat gcttacacca tccgccgagg attattttat gtggatttta 1450
 acagtaaaca gaaagagcgg aaacctaat cttcagcaca ctactacaaa 1500
 cagatcatal gagaaaatgg ttttcttta aaagagtcca cgccagatgt 1550
 60 gcagggccag tttccctgtg acttctcctg ggggtgtcact gaatctgttc 1600
 ttaagcccga gtctgtggct tcgtccccac agttcagcga tcctcatctg 1650
 65 tacgtgtgga acgccactgg caacagactg ttgcaccgag tggaaggggt 1700
 gaggtgaaa acacgacccg ctcaatgcac agattttgta aacatcaaaa 1750
 aacaacttga gatgttggca agaataagaa tcacccacta ccggtttgct 1800

ES 2 422 605 T3

ctggattggg cctcggtcct tcccactggc aacctgtccg cggatgaaccg 1850
 5 acaggccctg aggtactaca ggtgcgtggt cagtgaagggg ctgaagcttg 1900
 gcatctccgc gatggtcacc ctgtattatc cgacccacgc ccacctaggc 1950
 ctccccgagc ctctgttgca tgccgacggg tggctgaacc catcgacggc 2000
 10 cgaggccttc caggcctacg ctgggctgtg cttccaggag ctgggggacc 2050
 tggatgaagct ctggatcacc atcaacgagc ctaaccggct aagtgcacac 2100
 15 tacaaccgct ctggcaacga cacctacggg gcggcgacac acctgctggt 2150
 ggcccacgcc ctggcctggc gcctctacga ccggcagttc aggccctcac 2200
 agcgcggggc cgtgtcgtg tcgctgcacg cggactgggc ggaacccgcc 2250
 20 aaccctatg ctgactcgca ctggagggcg gccgagcgt tcctgcagtt 2300
 cgagatcgcc tggttcgccg agccgctctt caagaccggg gactaccccg 2350
 25 cggccatgag ggaatacatt gcctccaagc accgacgggg gctttccagc 2400
 tcggccctgc cgcgcctcac cgaggccgaa aggaggctgc tcaagggcac 2450
 ggtcgacttc tgcgcgtca accacttcac cactagggtt gtgatgcacg 2500
 30 agcagctggc cggcagccgc tacgactcgg acagggacat ccagtttctg 2550
 caggacatca cccgcctgag ctccccacg cgcctggctg tgattccctg 2600
 35 gggggtgctc aagctgctgc ggtgggtccg gaggaactac ggcgacatgg 2650
 acatttacat caccgccagt ggcacgcacg accaggctct ggaggatgac 2700
 cggctccgga agtactacct aggggaagtac cttcaggagg tgctgaaagc 2750
 40 atacctgatt gataaagtca gaatcaaagg ctattatgca ttcaaactgg 2800
 ctgaagagaa atctaaaccc agatttggat tcttcacatc tgattttaaa 2850
 45 gctaaatcct caatacaatt ttacaacaaa gtgatcagca gcaggggctt 2900
 cccttttgag aacagtagtt ctagatgcag tcagacccaa gaaaatacag 2950
 agtgcactgt ctgcttattc cttgtgcaga agaaaccact gatattcctg 3000
 50 ggttggtgct tcttctccac cctggttcta ctcttatcaa ttgccatttt 3050
 tcaaaggcag aagagaagaa agttttggaa agcaaaaaac ttacaacaca 3100
 55 taccattaaa gaaaggcaag agagttgtta gcgattacaa ggatgacgac 3150
 gataagtaa 3159
 <210> 52
 <211> 3159
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> la secuencia está sintetizada
 65 <400> 52
 atgaagccag gctgtgcggc aggatctcca gggaatgaat ggattttctt 50

ES 2 422 605 T3

cagcactgat gaaataacca cacgctatag gaataacaatg tccaacgggg 100
 gattgcaaag atctgtcatc ctgtcagcac ttattctgct acgagctgtt 150
 5 actggattct ctggagatgg aagagctata tgggtctaaaa atcctaattt 200
 tactccggta aatgaaagtc agctgtttct ctatgacact ttccctaaaa 250
 actttttctg ggggtattggg actggagcat tgcaagtgga agggagtgtg 300
 10 aagaaggatg gaaaaggacc ttctatatgg gatcatttca tccacacaca 350
 ccttaaaaaat gtcagcagca cgaatggttc cagtgcacagt tatatttttc 400
 15 tggaaaaaga cttatcagcc ctggatttta taggagtttc tttttatcaa 450
 ttttcaattt cctggccaag gcttttcccc gatggaatag taacagtgtc 500
 caacgcaaaa ggtctgcagt actacagtac tcttctggac gctctagtgc 550
 20 ttagaaacat tgaacctata gttactttat accactggga tttgcctttg 600
 gcactacaag aaaaatatgg ggggtggaaa aatgatacca taatagatat 650
 25 cttcaatgac tatgccacat actgtttcca gatgtttggg gaccgtgtca 700
 aatattggat tacaattcac aacctatct tagtggcttg gcatgggtat 750
 gggacaggta tgcatgcccc tggagagaag ggaaatttag cagctgtcta 800
 30 cactgtggga cacaacttga tcaaggctca ctcgaaagt tggcataact 850
 acaacacaca tttccgcca catcagaagg gttggttctc gatcacgttg 900
 35 ggatctcatt ggatcgagcc aaaccggtcg gaaaacacga tggatatatt 950
 caaatgtcaa caatccatgg tttctgtgct tggatgggtt gccaaccta 1000
 tccatgggga tggcgactat ccagagggga tgagaaagaa gttgttctcc 1050
 40 gttctacca ttttctctga agcagagaag catgagatga gaggcacagc 1100
 tgattttctt gccttttctt ttggacccaa caacttcaag cccctaaaca 1150
 45 ccatggctaa aatgggacaa aatgtttcac ttaatttaag agaagcgctg 1200
 aactggatta aactggaata caacaacct cgaatcttga ttgctgcgaa 1250
 50 tggctgggtc acagacagtc gtgtgaaaac agaagacacc acggccatct 1300
 acatgatgaa gaatttcctc agccagggtc ttcaagcaat aaggtttagat 1350
 gaaatacgag tgtttggtta tactgcctgg tctctcctgg atggctttga 1400
 55 atggcaggat gcttacacca tccgccgagg attattttat gtggatttta 1450
 acagtaaaca gaaagagcgg aaacctaatg cttcagcaca ctactacaaa 1500
 cagatcatc gagaaaatgg ttttcttta aaagagtcca cgccagatgt 1550
 60 gcagggccag tttccctgtg acttctcctg ggggtgtcact gaatctgttc 1600
 ttaagcccga gtctgtggct tcgtccccac agttcagcga tcctcatctg 1650
 65 tacgtgtgga acgccactgg caacagactg ttgcaccgag tggaggggt 1700
 gaggctgaaa acacgacctg ctcaatgcac agattttgta aacatcaaaa 1750

ES 2 422 605 T3

aacaacttga gatgttggca agaatgaaag tcacccacta ccggttttgct 1800
 ctggattggg cctcggtcct tccactggc aacctgtccg cggatgaaccg 1850
 5 acaggccctg aggtactaca ggtgcgtggt cagtgaagggg ctgaagcttg 1900
 gcatctccgc gatggtcacc ctgtattatc cgacccacgc ccacctaggc 1950
 10 ctccccgagc ctctgttgca tgccgacggg tggctgaacc catcgacggc 2000
 cgaggccttc caggcctacg ctgggctgtg cttccaggag ctgggggacc 2050
 tggatgaagct ctggatcacc atcaacgcgc ctaaccggct aagtgcacatc 2100
 15 tacaaccgct ctggcaacga cacctacggg gcggcgacaca acctgctggt 2150
 ggcccacgcc ctggcctggc gcctctacga ccggcagttc aggccctcac 2200
 agcgcggggc cgtgtcgtg tcgctgcacg cggactgggc ggaacccgcc 2250
 20 aaccctatg ctgactcgca ctggagggcg gccgagcgct tcctgcagtt 2300
 cgagatcgcc tggttcgccg agccgctctt caagaccggg gactaccccg 2350
 25 cggccatgag ggaatacatt gcctccaagc accgacgggg gctttccagc 2400
 tcggccctgc cgcgcctcac cgaggccgaa aggaggctgc tcaagggcac 2450
 ggtcgacttc tgcgcgtca accacttcac cactagggtc gtgatgcacg 2500
 30 agcagctggc cggcagccgc tacgactcgg acagggacat ccagtttctg 2550
 caggacatca cccgcctgag ctccccacg cgcttggtg tgattccctg 2600
 35 gggggtgctc aagctgctgc ggtgggtccg gaggaactac ggcgacatgg 2650
 acatttacat caccgccagt ggcacgacg accaggctct ggaggatgac 2700
 cggctccgga agtactacct aggggaagtac cttcaggagg tgctgaaagc 2750
 40 atacctgatt gataaagtca gaatcaaagg ctattatgca ttcaaactgg 2800
 ctgaagagaa atctaaaccc agatttggat tcttcacatc tgattttaaa 2850
 45 gctaaatcct caatacaatt ttacaacaaa gtgatcagca gcaggggctt 2900
 cccttttgag aacagtagtt ctagatgcag tcagacccaa gaaaatacag 2950
 agtgcactgt ctgcttattc cttgtgcaga agaaaccact gatattcctg 3000
 50 ggttggttgct tcttctccac cctggttcta ctcttatcaa ttgccatttt 3050
 tcaaaggcag aagagaagaa agttttggaa agcaaaaaac ttacaacaca 3100
 55 taccattaaa gaaaggcaag agagttgtta gcgattacaa ggatgacgac 3150
 gataagtaa 3159

60 <210> 53
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> se sintetizó la secuencia

<400> 53
 Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Ser Phe Leu Ala

	5	10
	<210> 54	
	<211> 7	
5	<212> PRT	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> se sintetizó la secuencia	
10	<400> 54	
	Arg Ala Asn Arg Leu Val Ser	
	5	
15	<210> 55	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> Mus musculus	
20	<400> 55	
	Leu Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu Thr	
	5	
25	<210> 56	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> Mus musculus	
30	<400> 56	
	Gly Phe Ser Leu Thr Thr Tyr Gly Val His	
	5 10	
35	<210> 57	
	<211> 17	
	<212> PRT	
	<213> Mus musculus	
40	<400> 57	
	Gly Val Ile Trp Pro Gly Gly Gly Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe	
	1 5 10 15	
	Ile Ser	
45	<210> 58	
	<211> 10	
	<212> PRT	
	<213> Mus musculus	
50	<400> 58	
	Val Arg Lys Glu Tyr Ala Asn Leu Tyr Ala	
	5 10	

REIVINDICACIONES

1. Antagonista de KL β para utilizar en un método de tratamiento de un trastorno asociado con la expresión o actividad de KL β , comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz del antagonista de KL β a un individuo, en el que el trastorno es un tumor, un cáncer o un trastorno proliferativo celular, y en el que el antagonista de KL β es un anticuerpo contra KL β .
2. Utilización de un antagonista de KL β en la preparación de un medicamento para utilizar en un método de tratamiento de un trastorno asociado con la expresión o actividad de KL β comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz del antagonista de KL β a un individuo, en el que el trastorno es un tumor, un cáncer o un trastorno proliferativo celular, y en el que el antagonista de KL β es un anticuerpo contra KL β .
3. Antagonista de KL β para utilizar, según la reivindicación 1, o utilización, según la reivindicación 2, en el que el tumor, cáncer o trastorno proliferativo celular es carcinoma hepatocelular, cáncer pancreático, cáncer de pulmón de célula no pequeña, cáncer de mama, o cáncer colorrectal.
4. Antagonista de KL β para utilizar o utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el método comprende además administrar al individuo una cantidad eficaz de un segundo medicamento, en el que el antagonista de KL β es un primer medicamento.
5. Antagonista de KL β para utilizar o utilización, según la reivindicación 4, en el que el segundo medicamento es un anticuerpo, un agente quimioterapéutico, un agente citotóxico, un agente antiangiogénico, un agente inmunosupresor, un profármaco, una citoquina, un antagonista de citoquina, radioterapia citotóxica, un corticosteroide, un antiemético, una vacuna contra el cáncer, un analgésico o un agente inhibidor del crecimiento.
6. Antagonista de KL β para utilizar o utilización, según la reivindicación 5, en el que el segundo medicamento es tamoxifeno, letrozol, exemestano, anastrozol, irinotecan, cetuximab, fulvestrant, vinorelbina, erlotinib, bevacizumab, vincristina, imatinib, sorafenib, lapatinib, o trastuzumab.
7. Antagonista de KL β para utilizar o utilización, según la reivindicación 4, en el que el segundo medicamento se administra antes, simultáneamente o posteriormente a la administración del antagonista de KL β .
8. Antagonista de KL β para utilizar, según la reivindicación 1, o utilización, según la reivindicación 2, en el que el anticuerpo contra KL β es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo madurado por afinidad, un anticuerpo humano o un anticuerpo biespecífico.
9. Antagonista de KL β para utilizar, según la reivindicación 1, o utilización, según la reivindicación 2, en el que el anticuerpo contra KL β es un fragmento de anticuerpo.
10. Antagonista de KL β para utilizar, según la reivindicación 1, o utilización, según la reivindicación 2, en el que el anticuerpo contra KL β es un inmunoconjugado.
11. Antagonista de KL β para utilizar o utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que además una muestra biológica del individuo expresa (i) KL β , (ii) KL β y FGF, (iii) KL β y FGFR, opcionalmente FGFR4, o (iv) KL β , FGF y FGFR, opcionalmente KL β , FGF 19 y FGFR4.
12. Método de identificación de una sustancia inhibidora candidata que inhibe la unión de KL β a FGFR4, comprendiendo dicho método:
 - (a) poner en contacto una sustancia candidata con una primera muestra que comprende FGFR4, FGF 19 y KL β , y
 - (b) comparar la cantidad de actividad biológica de FGFR4 en la muestra con una cantidad de actividad biológica de FGFR4 en una muestra de referencia que comprende cantidades similares de KL β , FGF19 y FGFR4 como primera muestra, pero que no ha estado en contacto con dicha sustancia candidata, mediante lo cual una disminución en la cantidad de actividad biológica de FGFR4 en la primera muestra en comparación con la muestra de referencia indica que la sustancia candidata es capaz de inhibir la unión de KL β a FGFR4.
13. Método de determinación de si una sustancia candidata induce la actividad biológica de KL β , comprendiendo dicho método:
 - (a) poner en contacto una sustancia candidata con una primera muestra que comprende FGFR y KL β , y (b)
 - comparar la cantidad de actividad biológica de FGFR en la muestra con una cantidad de actividad biológica de FGFR en una muestra de referencia que comprende cantidades similares de KL β y FGFR como primera muestra, pero que no ha estado en contacto con dicha sustancia candidata, mediante lo cual un incremento en la cantidad de actividad biológica de FGFR en la primera muestra en comparación con la muestra de referencia indica que la sustancia candidata es capaz de inducir la unión de KL β a FGFR.

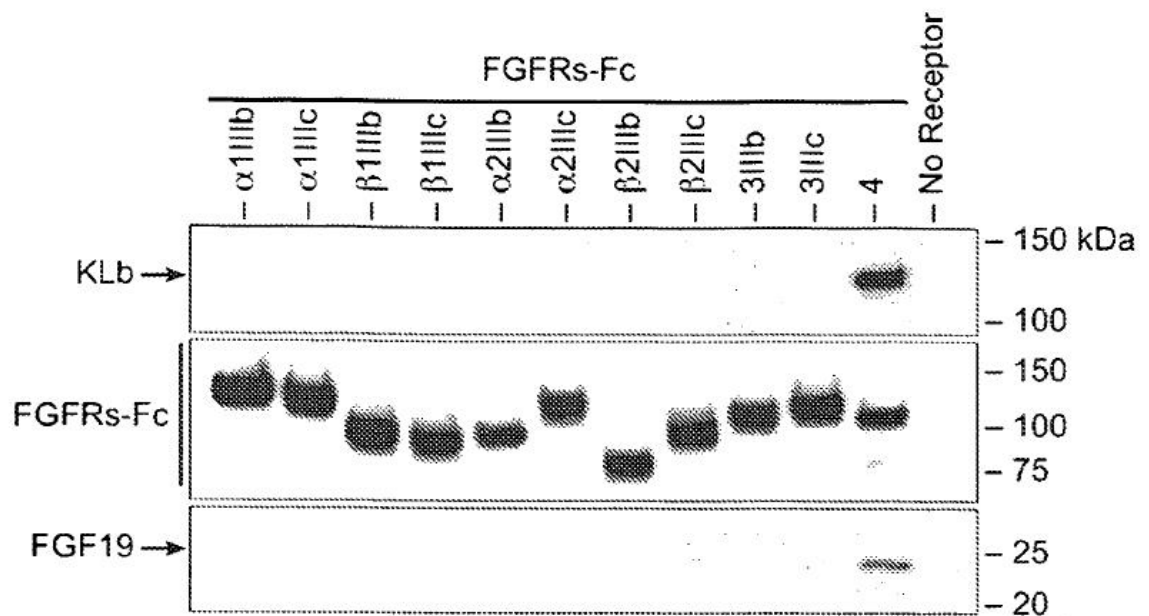


Figura 1A

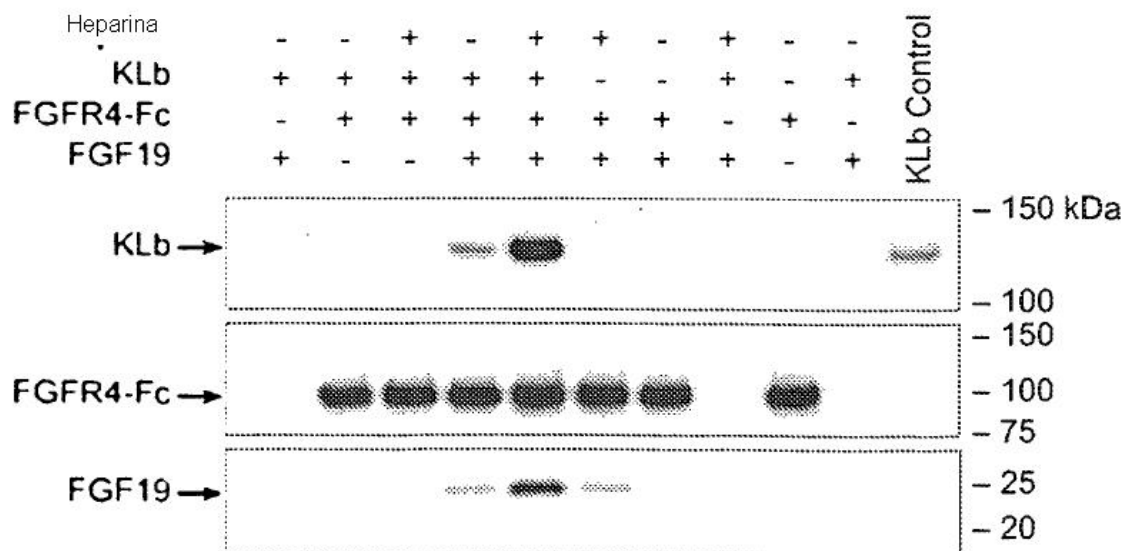


Figura 1B

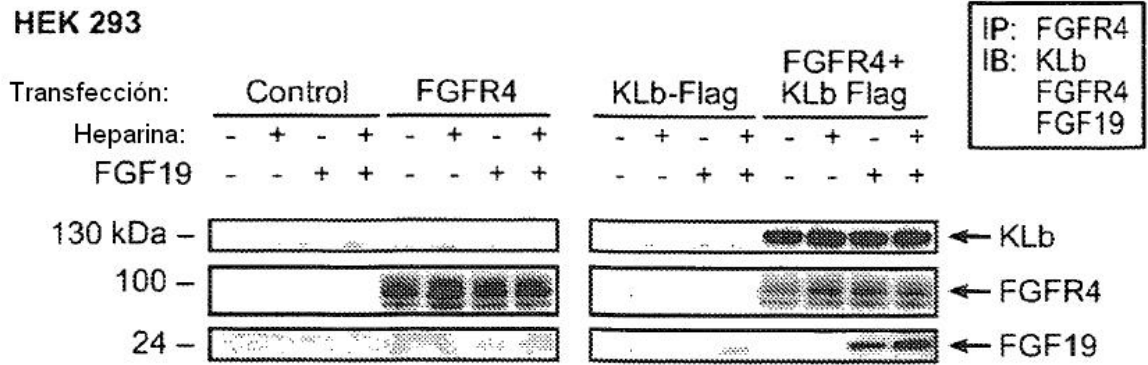


Figura 1C

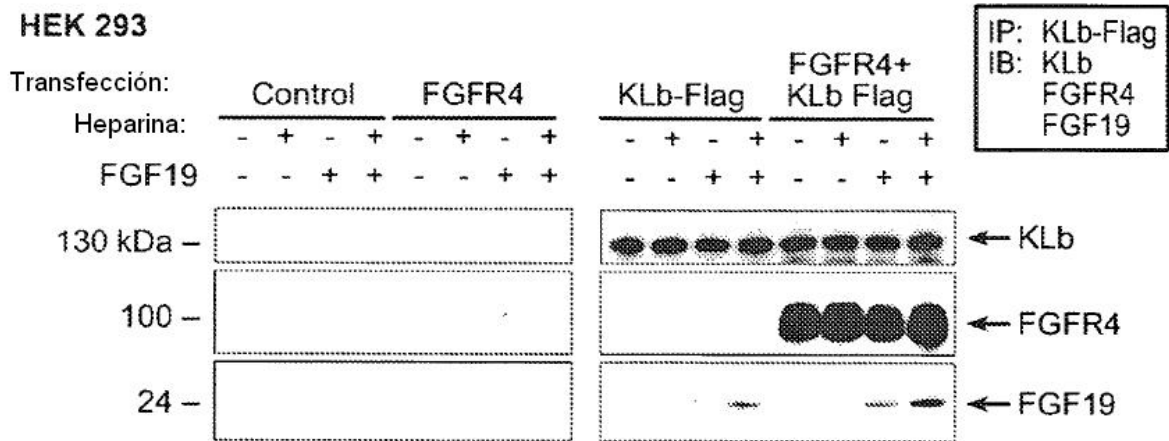


Figura 1D

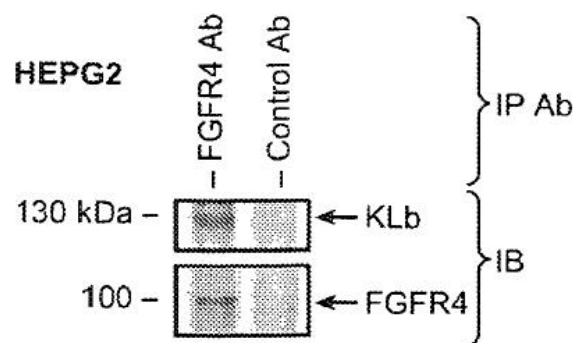
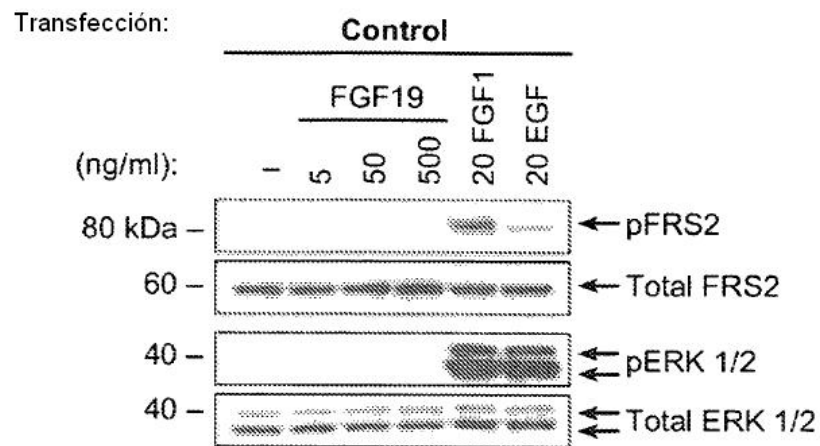


Figura 1E

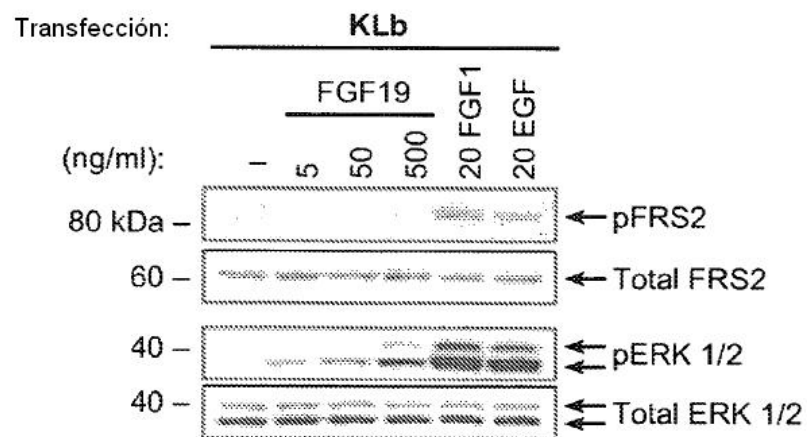
Células 293 HEK

Figura 2A



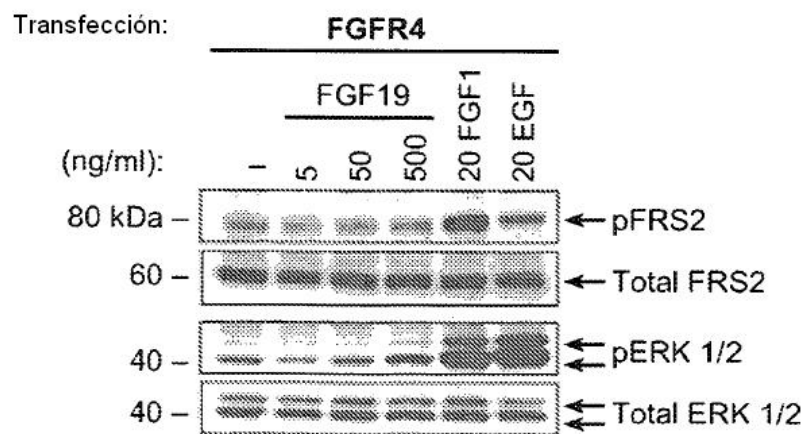
Células 293 HEK

Figura 2B



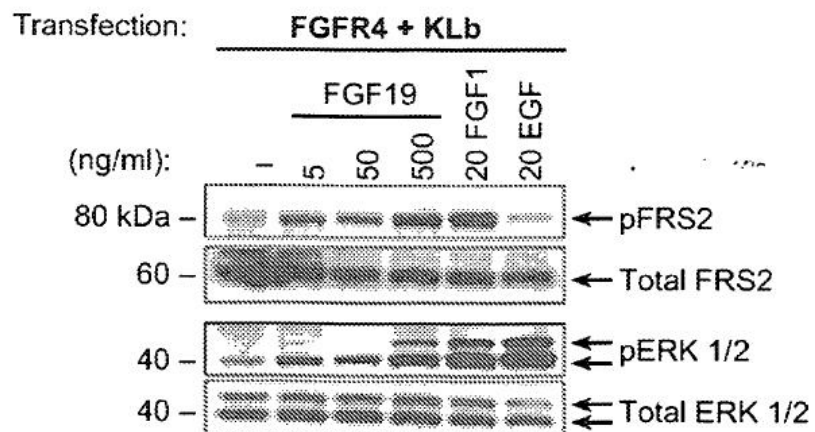
Células 293 HEK

Figura 2C



Células 293 HEK

Figura 2D



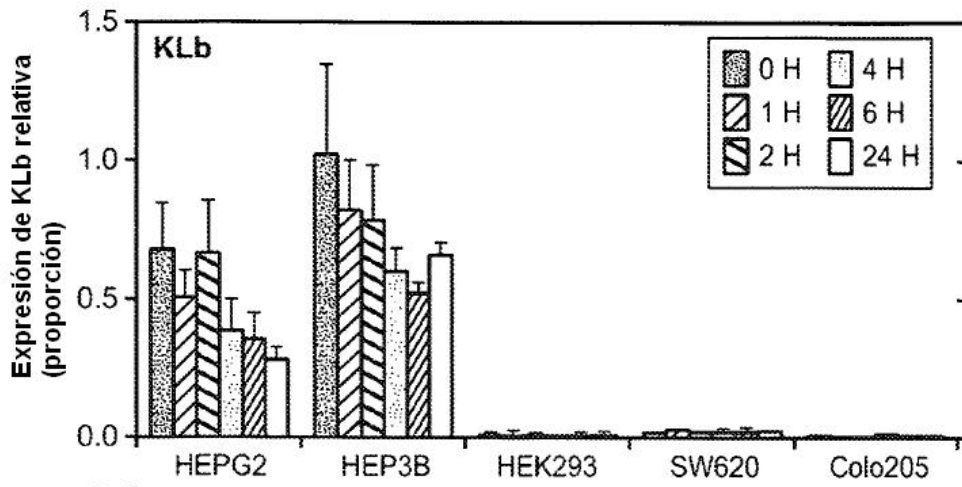


Figura 3A

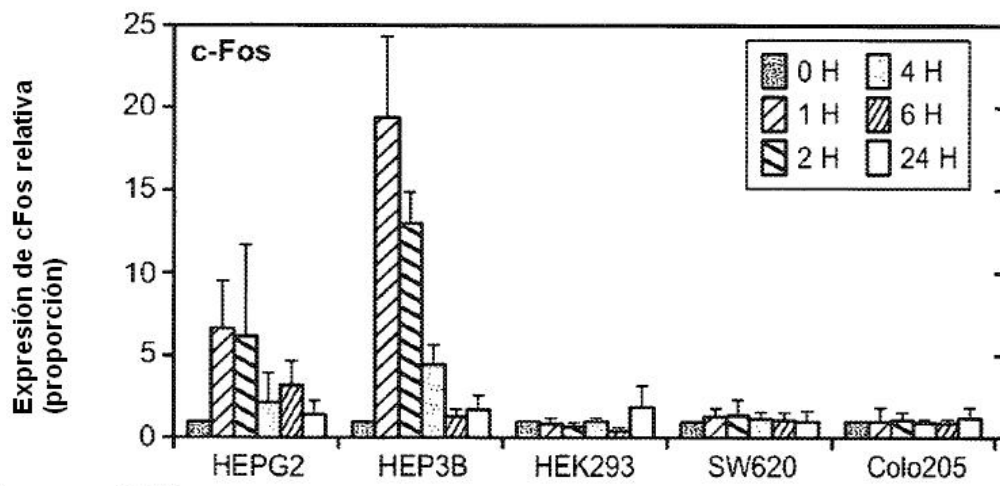


Figura 3B

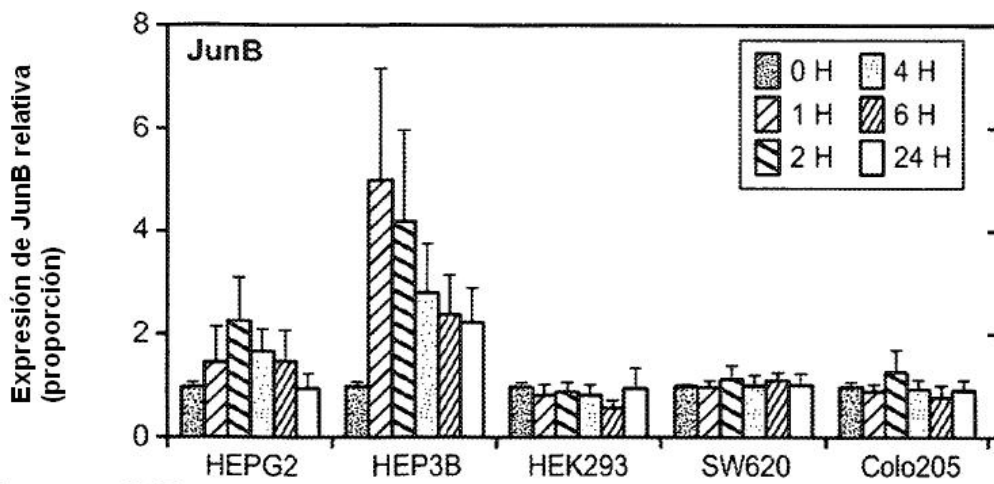


Figura 3C

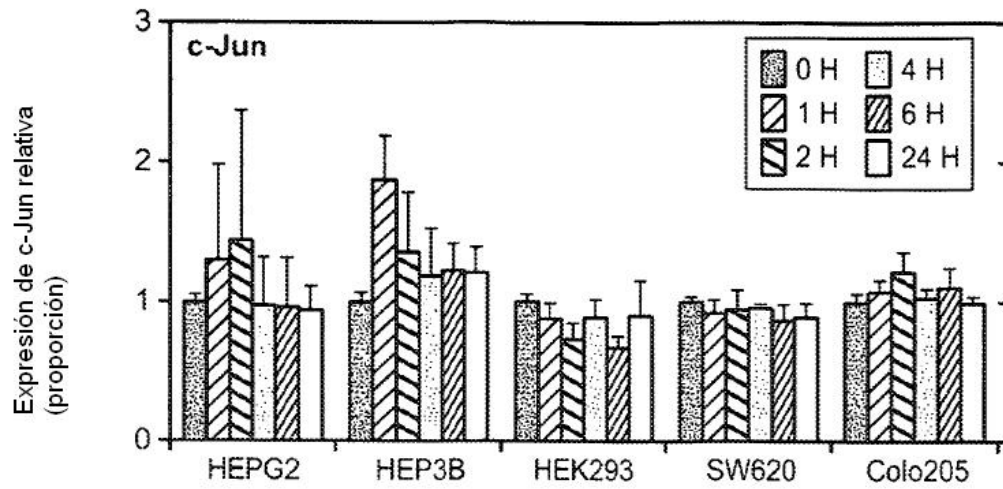


Figura 3D

Células HEP3B

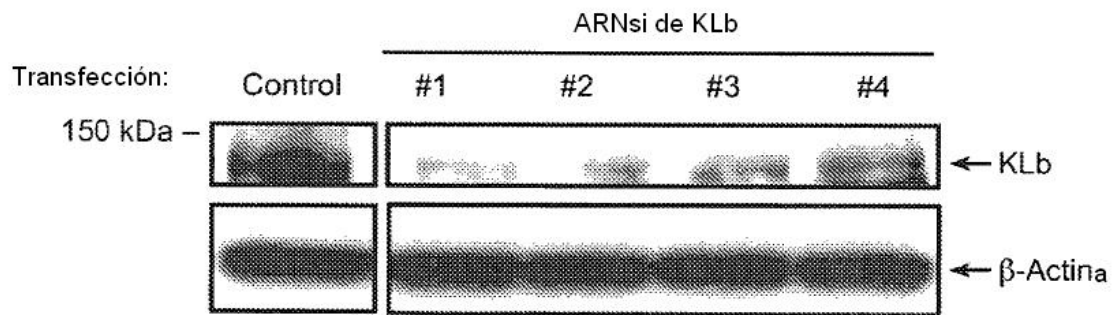


Figura 3E

Células HEP3B

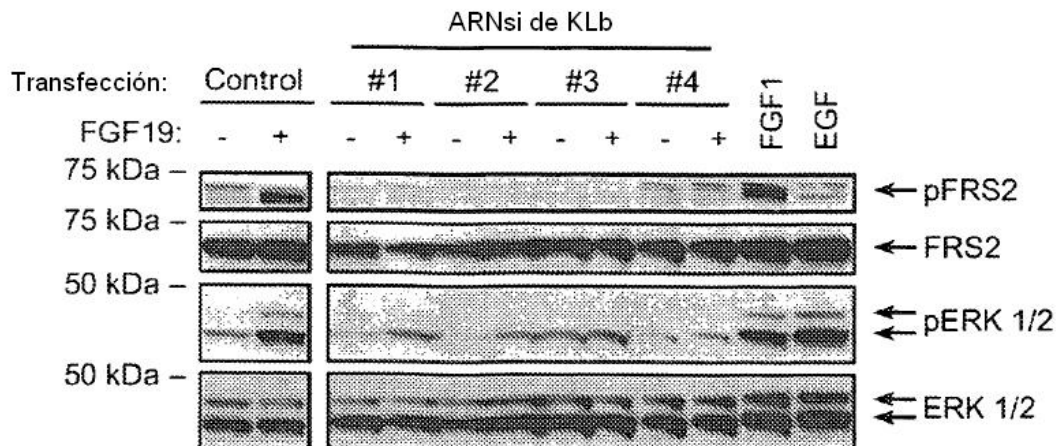


Figura 3F

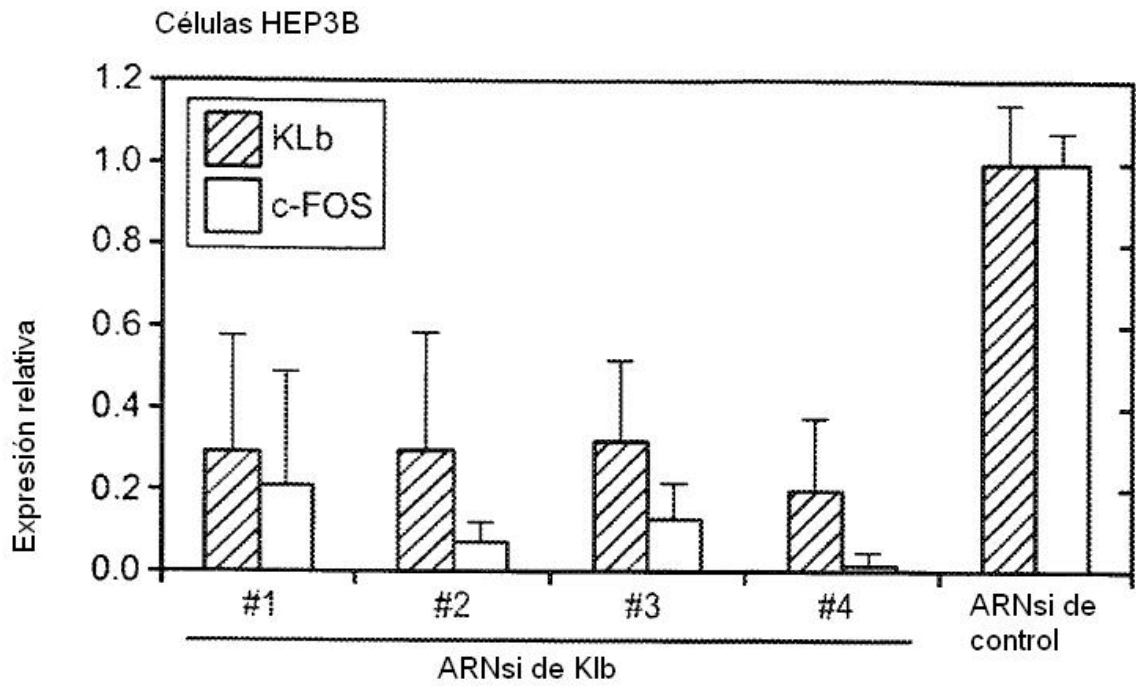


FIG. 3G

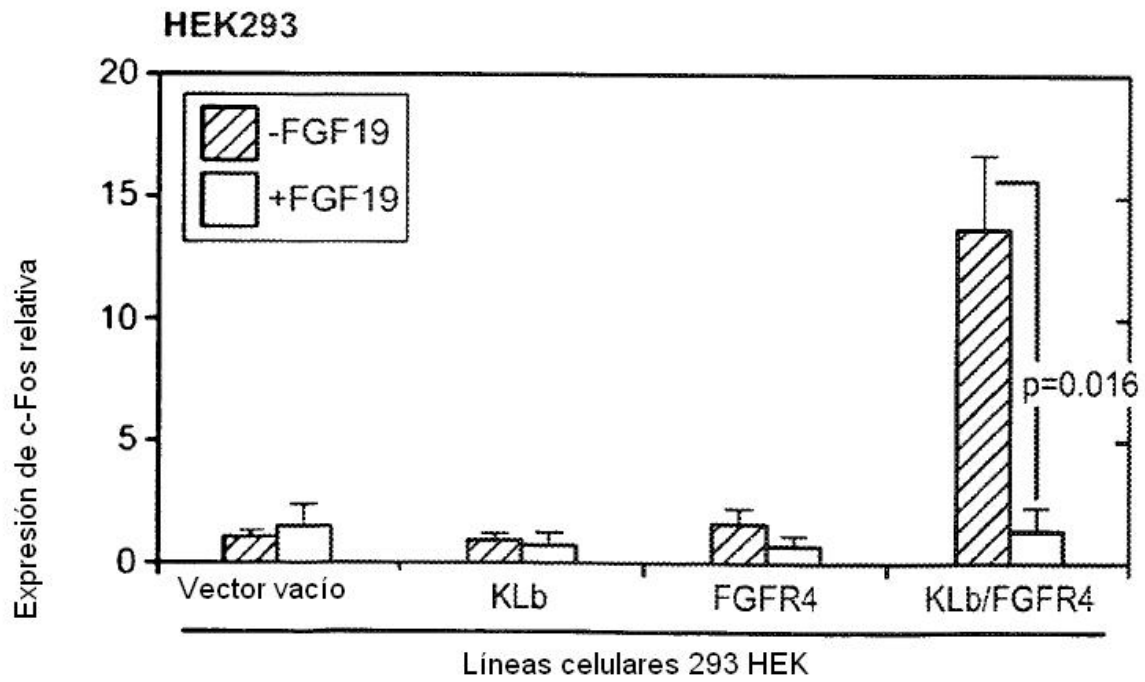


FIG. 3H

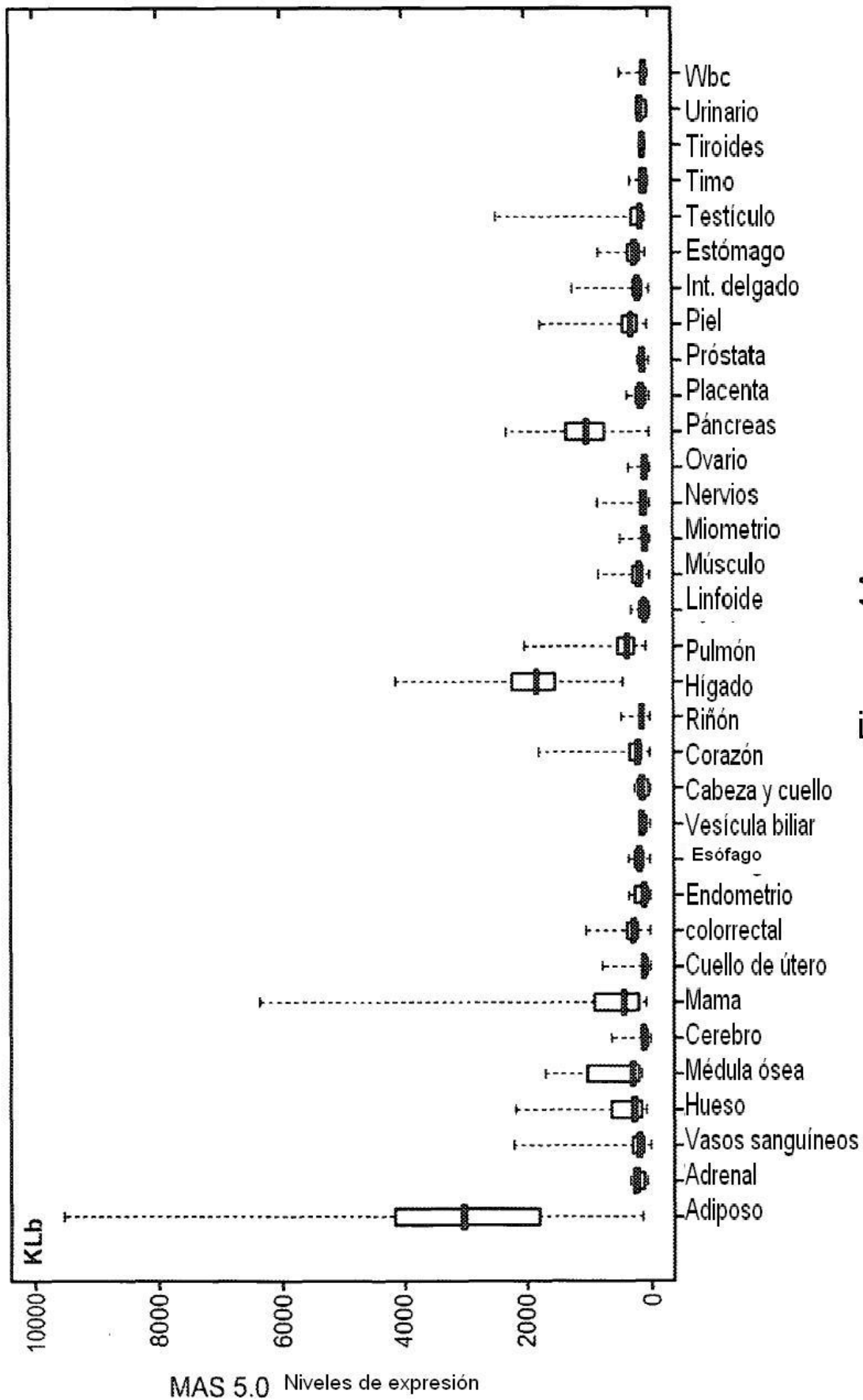


Figura 4A

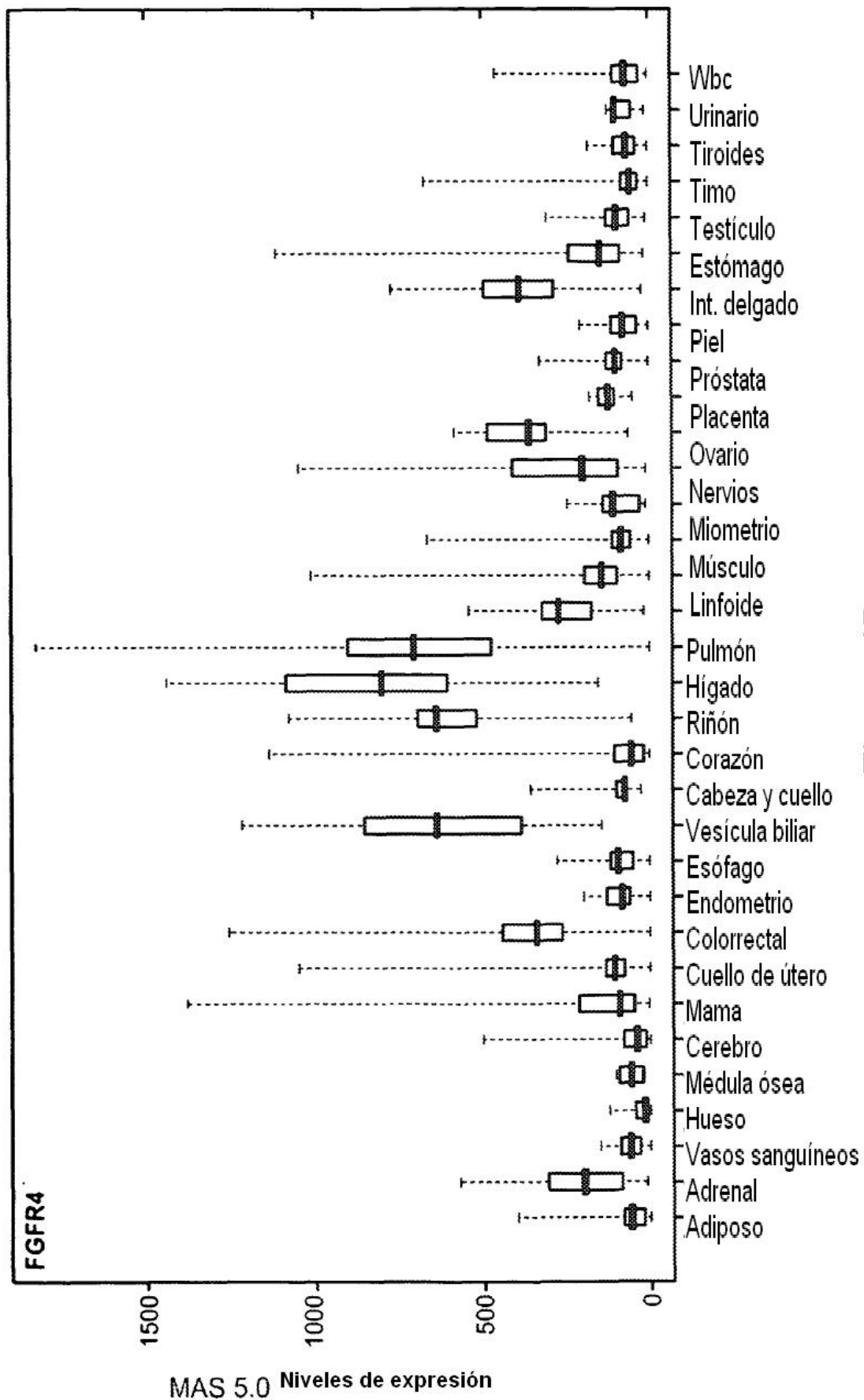
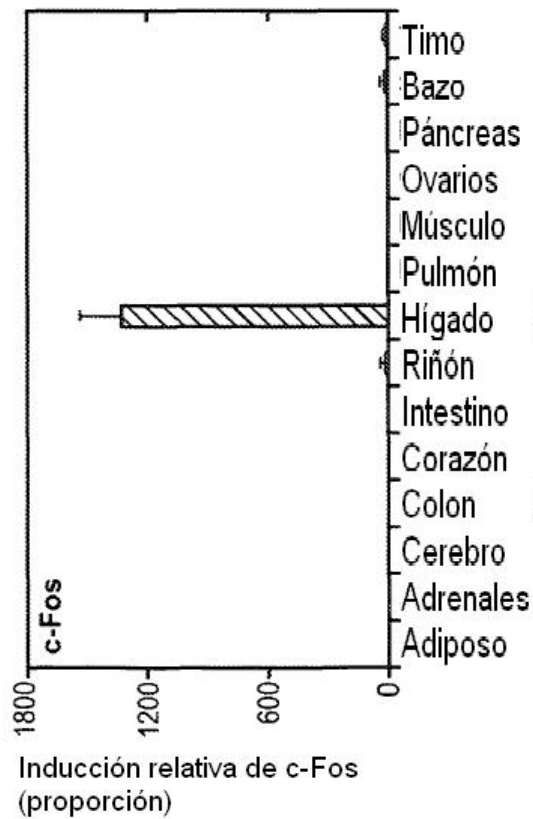
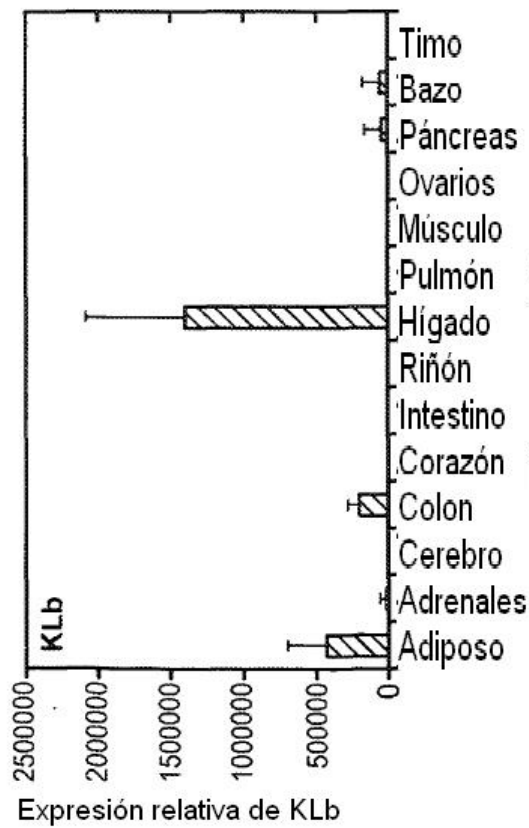
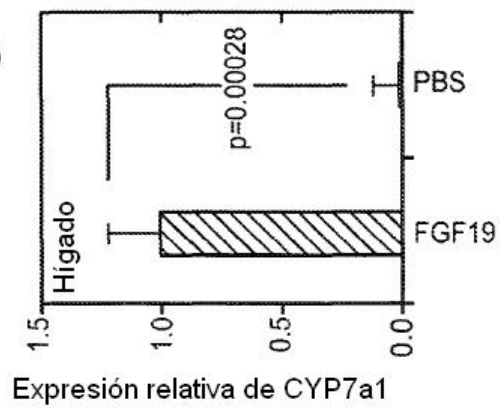
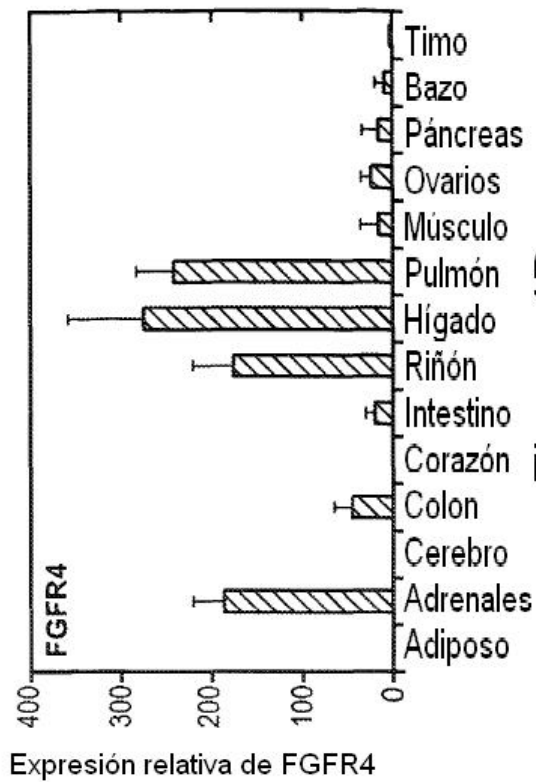


Figura 4B



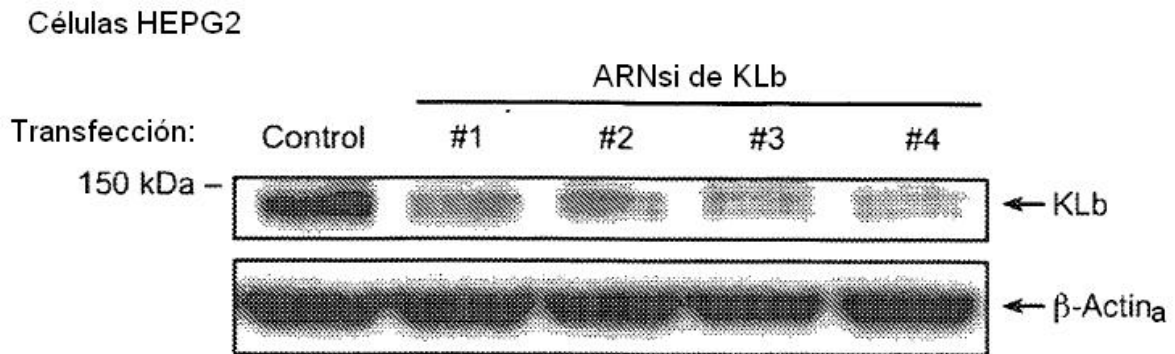


Figura 5A

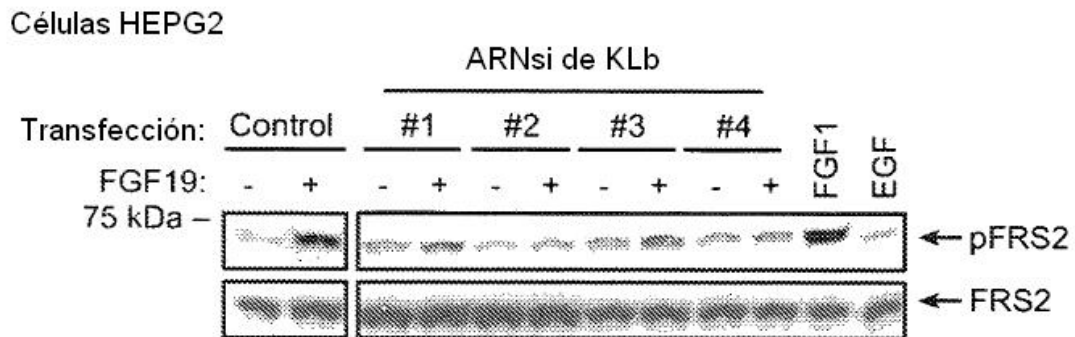


Figura 5B

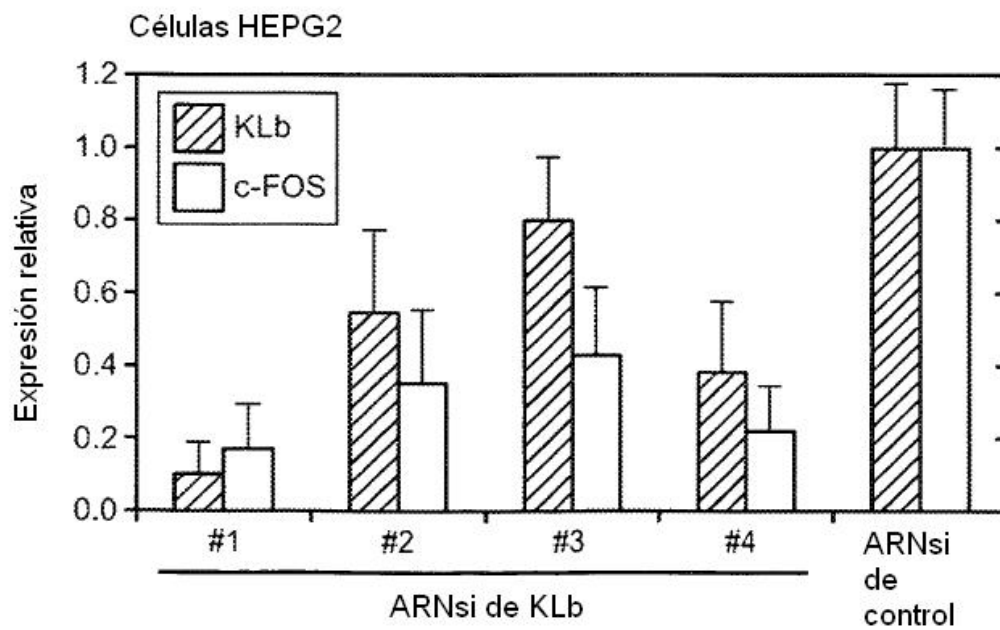


Figura 5C

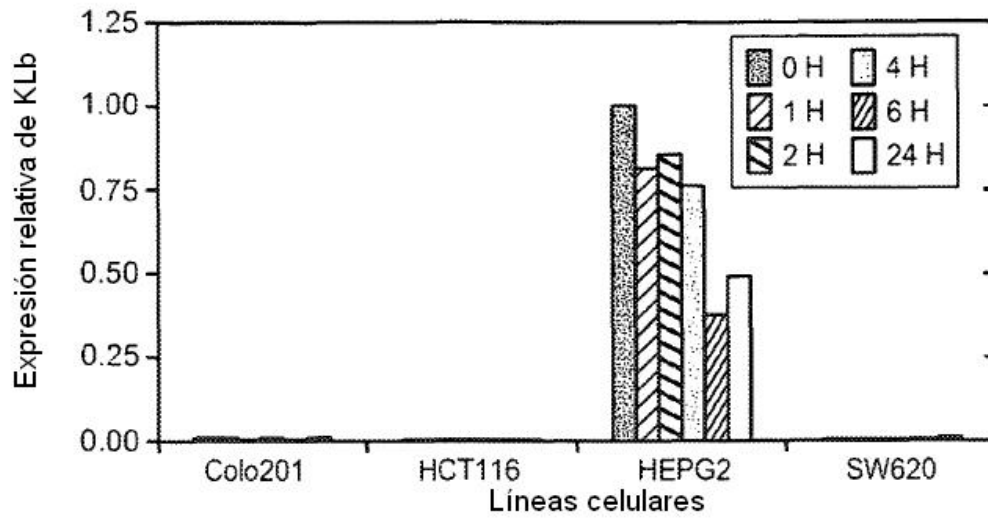


Figura 6

Células HEK 293

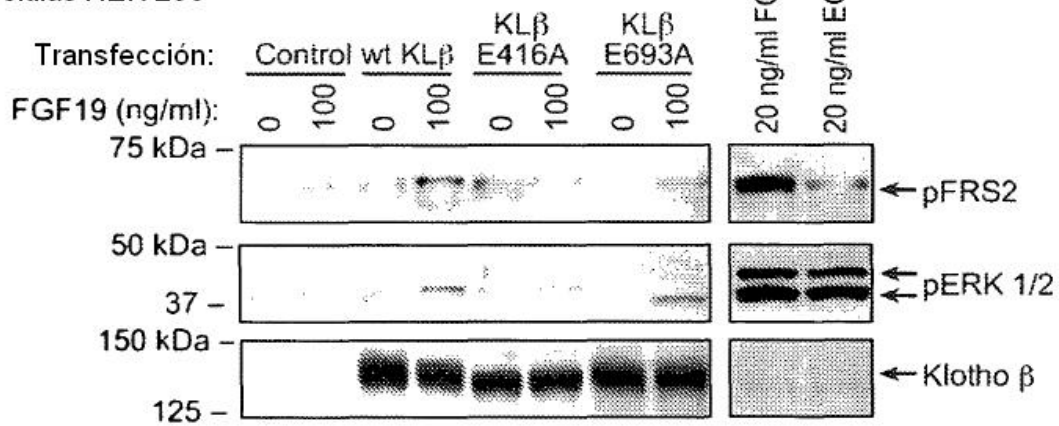


Figura 7

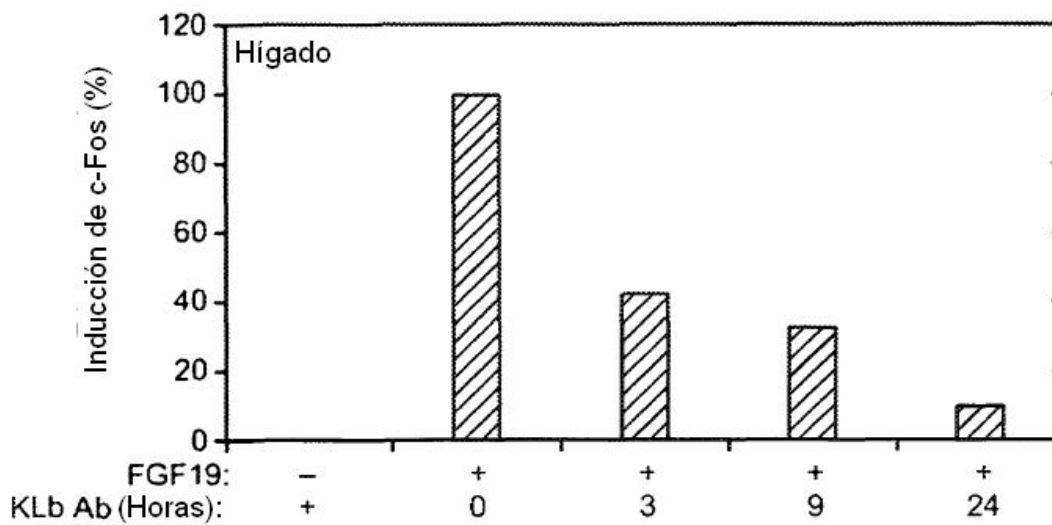


Figura 8

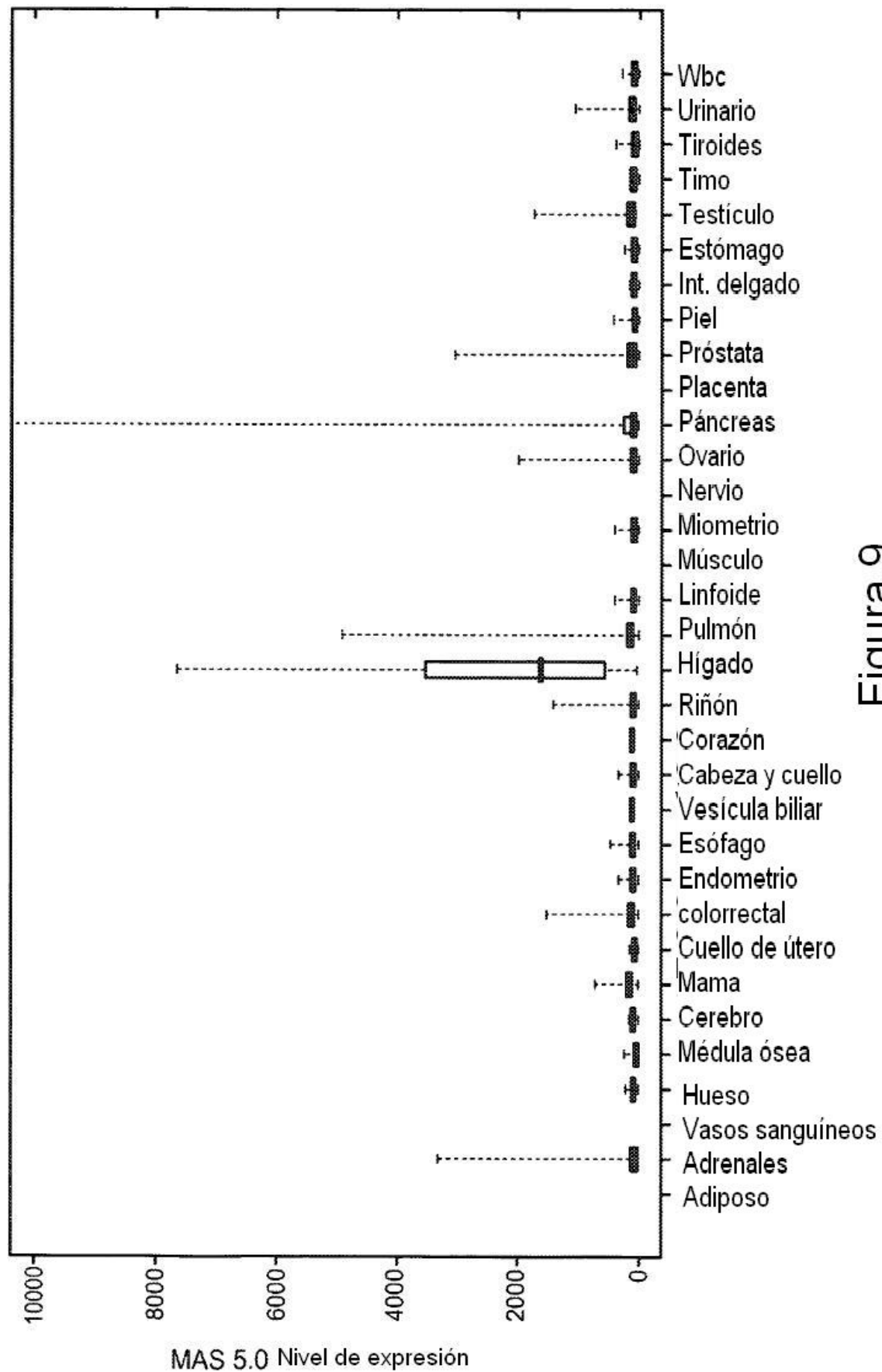


Figura 9

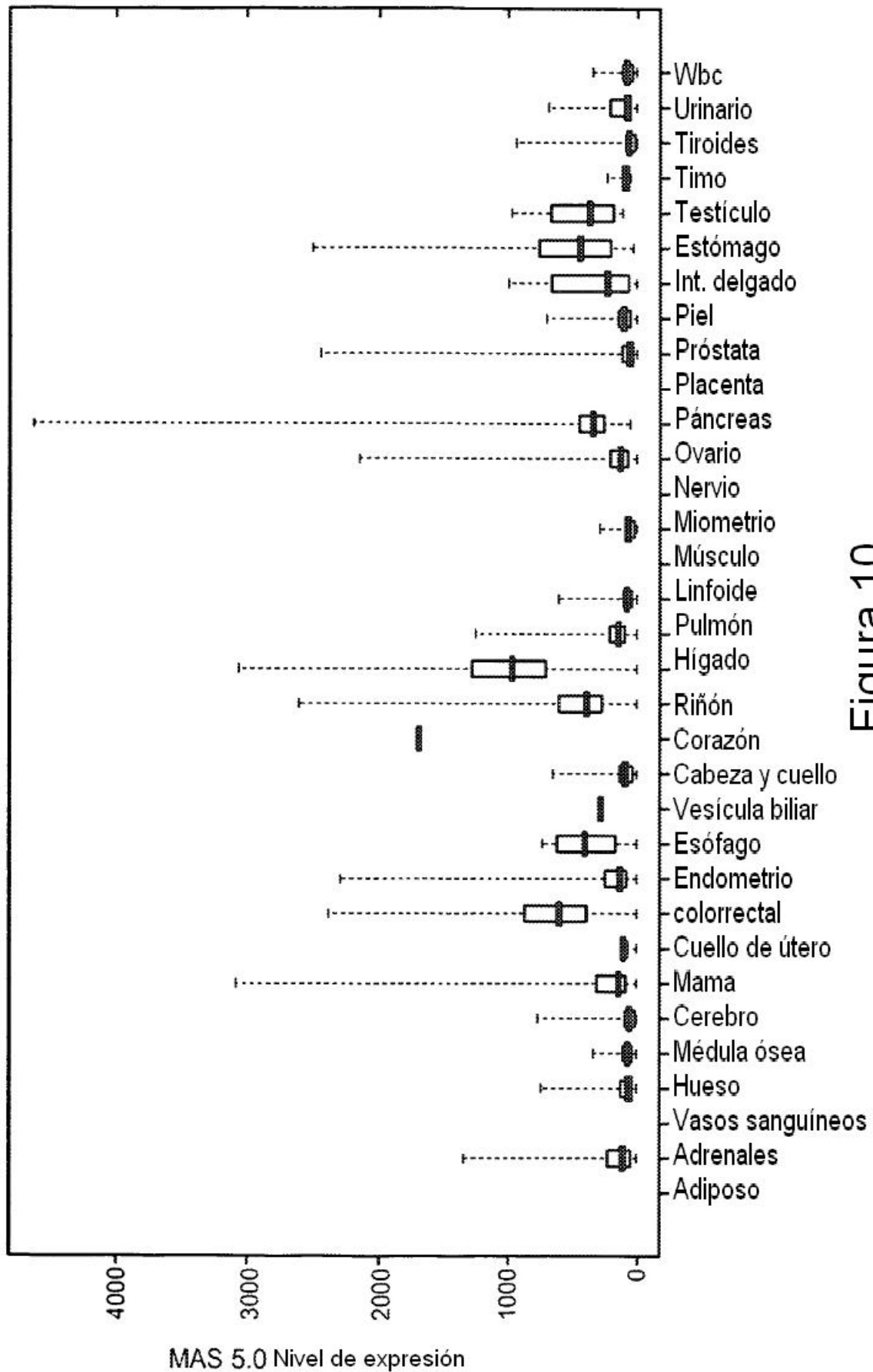


Figura 10

ácido nucleico de Klotho beta humano (SEQ ID NO: 1)

ATGAAGCCAGGCTGTGCGGCAGGATCTCCAGGGAATGAATGGATTTTCTTCAGCACTGATGAAA
 TAACCACACGCTATAGGAATACAATGTCCAACGGGGGATGCAAAGATCTGTCATCCTGTCAGC
 ACTTATTCTGCTACGAGCTGTTACTGGATTCTCTGGAGATGGAAGAGCTATATGGTCTAAAAAT
 CCTAATTTTACTCCGGTAAATGAAAGTCAGCTGTTTCTCTATGACACTTTCCCTAAAAACTTTT
 TCTGGGGTATTGGGACTGGAGCATTGCAAGTGGGAAGGGAGTTGGAAGAAGGATGGAAGGACC
 TTCTATATGGGATCATTTTCATCCACACACACCTTAAAAATGTCAGCAGCACGAATGGTTCCAGT
 GACAGTTATATTTTTCTGGAAAAAGACTTATCAGCCCTGGATTTTATAGGAGTTTCTTTTATC
 AATTTTCAATTTCTGGCCAAGGCTTTTCCCCGATGGAATAGTAACAGTTGCCAACGCAAAAGG
 TCTGCAGTACTACAGTACTCTTCTGGACGCTCTAGTGCTTAGAAACATTGAACCTATAGTTACT
 TTATACCACTGGGATTTGCCTTTGGCACTACAAGAAAAATATGGGGGGTGGAAAAATGATACCA
 TAATAGATATCTTCAATGACTATGCCACATACTGTTTCCAGATGTTTGGGGACCGTGTCAAATA
 TTGGATTACAATTCACAACCCATATCTAGTGGCTTGGCATGGGTATGGGACAGGTATGCATGCC
 CCTGGAGAGAAGGGAAATTTAGCAGCTGTCTACACTGTGGGACACAACCTTGATCAAGGCTCACT
 CGAAAGTTTGGCATAACTACAACACACATTTCCGCCCACATCAGAAGGGTTGGTTATCGATCAC
 GTTGGGATCTCATTTGGATCGAGCCAAACCGGTCGGAAAAACACGATGGATATATTTCAAATGTCAA
 CAATCCATGGTCTGTGCTTGGATGGTTTGGCAACCCATCCATGGGGATGGCGACTATCCAG
 AGGGGATGAGAAAGAAGTTGTTCTCCGTTCTACCCATTTTCTCTGAAGCAGAGAAGCATGAGAT
 GAGAGGCACAGCTGATTTCTTTGCCTTTTCTTTTGGACCCAACAACCTTCAAGCCCCCTAAACACC
 ATGGCTAAAATGGGACAAAATGTTTCACTTAATTTAAGAGAAGCGCTGAACTGGATTAACTGG
 AATACAACAACCCCTCGAATCTTGATTGCTGCGAATGGCTGGTTCACAGACAGTCGTGTGAAAAC
 AGAAGACACCACGGCCATCTACATGATGAAGAATTTCTCAGCCAGGTGCTTCAAGCAATAAGG
 TTAGATGAAATACGAGTGTGGTTATACTGCCTGGTCTCTCCTGGATGGCTTTGAATGGCAGG
 ATGCTTACACCATCCGCCGAGGATTATTTTATGTGGATTTTAAACAGTAAACAGAAAGAGCGGAA
 ACCTAAGTCTTCAGCACACTACTACAAACAGATCATAACGAGAAAAATGGTTTTTCTTTAAAGAG
 TCCACGCCAGATGTGCAGGGCCAGTTTCCCTGTGACTTCTCCTGGGGTGTCACTGAATCTGTTT
 TTAAGCCCCGAGTCTGTGGCTTCGTCCCCACAGTTTCAGCGATCCTCATCTGTACGTGTGGAACGC
 CACTGGCAACAGACTGTTGACCGAGTGGAAGGGGTGAGGCTGAAAACACGACCCGCTCAATGC
 ACAGATTTTGTAAACATCAAAAAACAACCTTGAGATGTTGGCAAGAATGAAAGTCACCCACTACC
 GGTTTGCTCTGGATTGGGCCTCGGTCCCTTCCCACTGGCAACCTGTCCGCGGTGAACCGACAGGC
 CCTGAGGTACTACAGGTGCGTGGTCAGTGAGGGGCTGAAGCTTGGCATCTCCGCGATGGTCACC
 CTGTATTATCCGACCCACGCCACCTAGGCCTCCCCGAGCCTCTGTTGCATGCCGACGGGTGGC
 TGAACCCATCGACGGCCGAGGCCTTCCAGGCCTACGCTGGGCTGTGCTTCCAGGAGCTGGGGGA
 CCTGGTGAAGCTCTGGATCACCATCAACGCGCCTAACCGGCTAAGTGACATCTACAACCGCTCT
 GGCAACGACACCTACGGGGCGGCGCACAACTGCTGGTGGCCACGCCCTGGCCTGGCGCCTCT
 ACGACCGGCAGTTCAGGCCCTCACAGCGCGGGGCGGTGTCGCTGTCGCTGCACGCGGACTGGGC
 GGAACCCGCCAACCCTATGCTGACTCGCACTGGAGGGCGGCGAGCGCTTCTGCAGTTCGAG
 ATCGCCTGGTTCGCGGAGCCGCTCTTCAAGACCGGGGACTACCCCGCGGCCATGAGGGAATACA
 TTGCCTCCAAGCACCGACGGGGGCTTTCCAGCTCGGCCCTGCCGCGCCTCACCGAGGCCGAAAG
 GAGGCTGCTCAAGGGCACGGTCGACTTCTGCGCGCTCAACCACTTCACTAGGTTCGTGATG
 CACGAGCAGCTGGCCGGCAGCCGCTACGACTCGGACAGGGACATCCAGTTTCTGCAGGACATCA
 CCCGCTGAGCTCCCCACGCGCCTGGCTGTGATTCCCTGGGGGGTGGCAAGCTGCTGCGGTG
 GGTCCGGAGGAACACGGCGACATGGACATTTACATCACCGCCAGTGGCATCGACGACCAGGCT
 CTGGAGGATGACCGGCTCCGGAAGTACTACCTAGGGAAGTACCTTCAGGAGGTGCTGAAAGCAT
 ACCTGATTGATAAAGTCAGAATCAAAGGCTATTATGCATTCAAACCTGGCTGAAGAGAAATCTAA
 ACCCAGATTTGGATTCTTCACATCTGATTTTAAAGCTAAATCCTCAATACAATTTTACAACAAA
 GTGATCAGCAGCAGGGGCTTCCCTTTTGAAGACAGTAGTTCTAGATGCAGTCAGACCCAAGAAA
 ATACAGAGTGCAGTGTCTGCTTATTCCTTGTGCAGAAAGAAACCACTGATATTCCTGGGTGTTG
 CTTCTTCTCCACCCTGGTTCTACTCTTATCAATTGCCATTTTTTCAAAGGCAGAAGAGAAGAAAG
 TTTTGGAAAGCAAAAAACTTACAACACATACCATTAAAGAAAGGCAAGAGAGTTGTTAGC

Figura 11

Secuencia de aminoácidos de Klotho beta humana (SEQ ID NO: 2)

MKPGCAAGSPGNEWIFFSTDEITTRYRNTMSNGGLQRSVILSALILLRAVTGFSGDGRAIWSKN
 PNFTPVNESQLFLYDTFPKNFFWGIGTGALQVEGSWKKDGKGPSIWDHFIHHLKNSSTNGSS
 DSYIFLEKDLSDFIGVSFYQFSISWPRLFPDGIPTVANAKGLQYYSTLLDALVLRNIEPIVT
 LYHWDLPALQEKYGGWKNDTIIDIFNDYATYCFQMFQMDRVKYWITIHNPLYVAWHGYGTGMHA
 PGEKGNLAAYTVGHNLIAHSAKVWHNYNTHFRPHQKGWLSITLGSHWIEPNRSENTMDIFKCQ
 QSMVSVLGWFANPIHGDGDYPEGMRKKLFSVLPIFSEAEMRGTADFFAFSFGPNNFKPLNT
 MAKMGQNVSLNLREALNWIKLEYNNPRILIAANGWFTDSRVKTEDTTAIYMMKNFLSQVLQAIR
 LDEIRVFGYTAWSLLDGFQDAYTIRRGFLFYVDFNSKQKERKPKSSAHYYKQIIRENGFSLKE
 STPDVQGGQPCDFSWGVTESVLKPESSVSSPQFSDPHLYVWNATGNRLLRVEGVRLKTRPAQC
 TDFVNIKKQLEMLARMKVTHYRFALDWASVLPTGNLSAVNRQALRYRRCVVSEGLKLGISAMVT
 LYYPTHAGLGLPEPLHAGWLNPTAEAFQAYAGLCFQELGDLVKLWITINAPNRLSDIYNRS
 GNDTYGAHNLLVAHALAWRLYDRQFRPSQRGAVSLSLHADWAEPANPYADSHWRAAERFLQFE
 IAWFAEPLFKTGDYPAAMREYIASKHRRGLSSSALPRLTEAERRLLKGTVDFCALNHFTTRFVM
 HEQLAGSRYDSRDIQFLQDITRLSSPTRLAVIPWGVKLLRWVRRNYGDMDIYITASGIDDQA
 LEDDLRLKYYLGKYLQEVKAYLIDKVRIKGYAFKLAEEKSKPRFGFFTSDFKAKSSIQFYNK
 VISSRGFPFENSSSRCSQTQENTECTVCLFLVQKKPLIFLGCCFFSTLVLLSIAIFQKQKRRK
 FWKAKNLQHIPLKKGKRVVS

Figura 12