

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 456 696**

51 Int. Cl.:

C12N 9/12 (2006.01)
C07K 1/00 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)
C12P 21/06 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A01N 61/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.09.2003 E 03749460 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2014 EP 1578760**

54 Título: **Composiciones y métodos para el diagnóstico y el tratamiento de tumores**

30 Prioridad:

11.09.2002 US 410166 P

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

23.04.2014

73 Titular/es:

GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA WAY
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, US

72 Inventor/es:

DESAUVAGE, FREDERIC J.;
WOOD, WILLIAM I. y
ZHANG, ZEMIN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 456 696 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones y métodos para el diagnóstico y el tratamiento de tumores

5 **Campo de la invención**

La presente invención se dirige a composiciones de materia útiles para el diagnóstico y el tratamiento de tumores en mamíferos y a métodos de utilización de esas composiciones de materia para los mismos.

10 **Antecedentes de la invención**

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

En intentos por descubrir dianas celulares efectivas para la terapia del cáncer, los investigadores han querido identificar polipéptidos que se sobreexpresen específicamente en un tipo particular de célula cancerosa en comparación con una o más células no cancerosas normales. La identificación de dichos polipéptidos celulares asociados a tumores ha dado lugar a la capacidad de dirigirse específicamente a las células cancerosas para su destrucción mediante terapias basadas en anticuerpos. En este sentido, se observa que la terapia basada en anticuerpos ha mostrado ser muy efectiva en el tratamiento de ciertos cánceres. Por ejemplo, HERCEPTIN® y RITUXAN® (ambos de Genentech Inc., South San Francisco, California) son anticuerpos que han sido utilizados con éxito para tratar el cáncer de mama y el linfoma no Hodgkin, respectivamente. Más concretamente, HERCEPTIN® es un anticuerpo monoclonal humanizado derivado de ADN recombinante que se une selectivamente al dominio extracelular del protooncogén del receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2 (HER2). Se observa sobreexpresión de la proteína HER2 en un 25-30 % de los cánceres primarios de mama. RITUXAN® es un anticuerpo monoclonal quimérico murino/humano sometido a ingeniería genética dirigido contra el antígeno CD20 que se encuentra en la superficie de los linfocitos B normales y malignos.

En otros intentos por descubrir dianas celulares efectivas para la terapia del cáncer, los investigadores han querido identificar polipéptidos que se sobreexpresen en un tipo particular de célula cancerosa en relación a la expresión normal de polipéptidos en una o más células no cancerosas normales. Se esperaría que la identificación de antagonistas de dichos polipéptidos sobreexpresados les hiciera servir como agentes terapéuticos efectivos para el tratamiento de dichos cánceres. Más aún, la identificación de la sobreexpresión de dichos polipéptidos sería útil para el diagnóstico de cánceres particulares en mamíferos.

Las cinasas que controlan las rutas de transducción de señal, el ciclo celular y la muerte celular programada son críticas para la regulación celular. La sobreexpresión o las mutaciones activantes de estas cinasas críticas pueden perturbar la regulación celular y conducir a la formación de tumores. Un veinte por ciento de todos los oncogenes conocidos son proteína cinasas. La identificación de la ruta de transducción de señal apropiada y el desarrollo de fármacos que inhiban específicamente estas cinasas oncogénicas han constituido un objetivo de gran importancia en la investigación del cáncer durante algún tiempo. El cribado de alto rendimiento ha dado lugar a la identificación de pequeñas moléculas con diferentes modos de inhibición, tales como: competición con el sitio de unión a trifosfato de adenosina catalítico, inhibición de la unión a sustratos o modificación del propio sustrato. Ciertos compuestos son altamente específicos para una sola cinasa, mientras que otros pueden inhibir varias cinasas con estructuras de unión similares (Busse *et al.*, Semin. Oncol. 2001, 28: 47-55). Por ejemplo, la tirosina cinasa Bcr-Abl ha sido identificada como un factor causal en la leucemia mieloide crónica (LMC). La pequeña molécula mesilato de imatinib (Novartis Pharmaceuticals Corp., East Hanover, NJ) fue recientemente aprobada para el tratamiento de la LMC, demostrándose que el tratamiento del componente cinasa de una ruta de transducción de señal es efectivo en el tratamiento del cáncer (Griffin J. Semin. Oncol. 2001, 28: 3-8).

A pesar de los avances antes identificados en la terapia del cáncer en mamíferos, existe una gran necesidad de agentes diagnósticos y terapéuticos adicionales capaces de detectar la presencia de un tumor en un mamífero y de una inhibición efectiva del crecimiento celular neoplásico, respectivamente. Por consiguiente, es un objetivo de la presente invención identificar polipéptidos que se sobreexpresen en ciertas células cancerosas en comparación con las células normales u otras células cancerosas diferentes y usar esos polipéptidos, y sus ácidos nucleicos codificantes, para producir composiciones de materia útiles en el tratamiento terapéutico y en la detección diagnóstica del cáncer en mamíferos.

Resumen de la invención

A. Realizaciones

5 En la presente memoria descriptiva, los Solicitantes describen por vez primera la identificación de diversos polipéptidos celulares (y sus ácidos nucleicos codificantes o fragmentos de los mismos) que se expresan en mayor grado en uno o más tipos de células cancerosas en comparación con uno o más tipos de células no cancerosas normales. Se hace aquí referencia a dichos polipéptidos como polipéptidos de CINASAS ASOCIADAS A TUMORES (polipéptidos "TASK" (TUMOR-ASSOCIATED KINASES)) y se espera que sirvan como dianas efectivas para la
10 terapia y el diagnóstico del cáncer en mamíferos.

En consecuencia, la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido diana antigénico asociado a tumores o fragmento del mismo (un polipéptido "TASK").
15

En ciertos aspectos, la molécula de ácido nucleico aislada comprende una secuencia nucleotídica que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, alternativamente al menos aproximadamente un 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, con respecto a (a) una molécula de ADN codificante de un polipéptido TASK de longitud total que tiene una secuencia de aminoácidos como aquí se divulga, o cualquier otro fragmento específicamente definido de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido TASK de longitud total como aquí se divulga, o (b) la complementaria de la molécula de ADN de (a).
20

En otros aspectos, la molécula de ácido nucleico aislada comprende una secuencia nucleotídica que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, alternativamente al menos aproximadamente un 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, con respecto a (a) una molécula de ADN que comprende la secuencia codificante de un ADNc de un polipéptido TASK de longitud total como aquí se divulga, o la secuencia codificante de cualquier otro fragmento específicamente definido de la secuencia de aminoácidos del polipéptido TASK de longitud total como aquí se divulga, o (b) la complementaria de la molécula de ADN de (a).
25

En otros aspectos, la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia nucleotídica que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, alternativamente al menos aproximadamente un 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, con respecto a una molécula de ADN que codifica el mismo polipéptido maduro codificado por la secuencia codificante de longitud total de cualquiera de los ADNc de proteínas humanas aquí divulgados. En este sentido, el término "secuencia codificante de longitud total" se refiere a la secuencia de nucleótidos codificante del polipéptido TASK del ADNc (que con frecuencia de muestra entre codones de iniciación y de parada, incluyendo los mismos, en las figuras adjuntas).
30

Otro aspecto de la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia nucleotídica codificante de un polipéptido TASK que está inactivada en el dominio de cinasa o que es complementaria de dicha secuencia nucleotídica codificante. Por lo tanto, se contemplan formas catalíticamente inactivas de los polipéptidos TASK aquí descritos.
35

En otros aspectos, la presente invención se refiere a moléculas de ácido nucleico aisladas que se hibridan con (a) una secuencia nucleotídica codificante de un polipéptido TASK que tiene una secuencia de aminoácidos de longitud total como aquí se divulga, o cualquier otro fragmento específicamente definido de una secuencia de aminoácidos de polipéptido TASK de longitud total como aquí se divulga, o (b) la complementaria de la secuencia nucleotídica de (a). En este sentido, la presente invención se refiere a fragmentos de una secuencia codificante de polipéptido TASK de longitud total, o su complementaria, como aquí se divulga, que pueden encontrar un uso como, por ejemplo, sondas de hibridación útiles, como, por ejemplo, sondas diagnósticas o sondas oligonucleotídicas antisentido, o para codificar fragmentos de un polipéptido TASK de longitud total y que pueden eventualmente codificar un polipéptido que comprende un sitio de unión para un anticuerpo antipolipéptido TASK, un oligopéptido de unión a TASK u otra molécula orgánica pequeña que se una a un polipéptido TASK. Dichos fragmentos de ácidos nucleicos tienen habitualmente al menos aproximadamente 5 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990 ó 1.000 nucleótidos de longitud, donde, en este contexto, el término "aproximadamente" significa la longitud de la secuencia nucleotídica referenciada más o menos un 10 % de esa longitud referenciada. Se hace notar que se pueden determinar nuevos fragmentos de una secuencia nucleotídica codificante de un polipéptido TASK de un modo rutinario alineando la secuencia nucleotídica codificante del polipéptido TASK con otras secuencias nucleotídicas conocidas usando cualquiera de una serie de programas
40
45
50
55
60
65

de alineación de secuencia bien conocidos y determinando qué fragmento(s) de la secuencia nucleotídica codificante del polipéptido TASK es/son nuevo(s).. Todos esos nuevos fragmentos de secuencias nucleotídicas codificantes de polipéptido TASK quedan aquí contempladas. También se contemplan los fragmentos de polipéptido TASK codificados por estos fragmentos de moléculas nucleotídicas, preferiblemente aquellos fragmentos de polipéptido TASK que comprenden un sitio de unión para un anticuerpo anti-TASK, un oligopéptido de unión a TASK u otra molécula orgánica pequeña que se una a un polipéptido TASK.

La invención se refiere a un polipéptido TASK aislado codificado por cualquiera de las secuencias de ácido nucleico aisladas anteriormente identificadas.

En cierto aspecto, la invención se refiere a un polipéptido TASK aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente un 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos, con respecto a un polipéptido TASK que tiene una secuencia de aminoácidos de longitud total como aquí se divulga, o una secuencia de aminoácidos codificada por cualquiera de las secuencias de ácido nucleico aquí divulgadas o cualquier otro fragmento específicamente definido de una secuencia de aminoácidos de polipéptido TASK de longitud total como aquí se divulga.

En otro aspecto, la invención se refiere a un polipéptido TASK aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente un 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos, con respecto a una secuencia de aminoácidos codificada por cualquiera de los ADNc de proteínas humanas aquí divulgados.

Otro aspecto de la invención se refiere a un polipéptido TASK aislado. También se describen aquí procedimientos para producirlo, donde esos procedimientos consisten en cultivar una célula huésped que contiene un vector que comprende la molécula de ácido nucleico codificante apropiada en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido TASK y en recuperar el polipéptido TASK del cultivo celular.

Se describen aquí vectores que comprenden ADN codificante de cualquiera de los polipéptidos aquí descritos. También se describen células huésped que contienen cualquiera de tales vectores. A modo de ejemplo, las células huésped pueden ser células CHO, *E. coli* o levaduras. También se describe un procedimiento para producir cualquiera de los polipéptidos aquí descritos, el cual consiste en cultivar células huésped en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido deseado y en recuperar el polipéptido deseado del cultivo celular.

Se describen aquí polipéptidos quiméricos aislados que comprenden cualquiera de los polipéptidos TASK aquí descritos fusionados a un polipéptido heterólogo (no TASK). Como ejemplos de tales moléculas quiméricas, se incluyen cualquiera de los polipéptidos TASK aquí descritos fusionados a un polipéptido heterólogo, tal como, por ejemplo, una secuencia de marcador epitópico o una región Fc de una inmunoglobulina.

La invención se refiere a un anticuerpo que se une, preferiblemente de manera específica, a cualquiera de los polipéptidos descritos anteriormente o a continuación. Eventualmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo de una sola cadena o un anticuerpo que inhibe de manera competitiva la unión de un anticuerpo antipolipéptido TASK a su respectivo epitopo antigénico. Los anticuerpos pueden estar eventualmente conjugados a un agente inhibidor del crecimiento o un agente citotóxico, tal como una toxina, incluyendo, por ejemplo, un maitansinoide o una calicheamicina, un antibiótico, un isótopo radiactivo, una enzima nucleolítica o similares. Los anticuerpos pueden eventualmente ser producidos en células CHO o en células bacterianas, y preferiblemente inducen la muerte de una célula a la que se unen. Para los fines diagnósticos de la presente invención, los anticuerpos pueden llevar un marcaje detectable, unirse a un soporte sólido o similares.

Se describen aquí vectores que comprenden ADN codificante de cualquiera de los anticuerpos aquí descritos. También se describen células huésped que contienen cualquiera de tales vectores. A modo de ejemplo, las células huésped pueden ser células CHO, *E. coli* o levaduras. Se describe además un procedimiento para producir cualquiera de los anticuerpos aquí descritos, y éste consiste en cultivar células huésped en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo deseado y en recuperar el anticuerpo deseado del cultivo celular.

También se describen aquí oligopéptidos ("oligopéptidos de unión a TASK") que se unen, preferiblemente de manera específica, a cualquiera de los polipéptidos TASK descritos anteriormente o a continuación. Eventualmente, los oligopéptidos de unión a TASK pueden estar conjugados a un agente inhibidor del crecimiento o un agente citotóxico, tal como una toxina, incluyendo, por ejemplo, un maitansinoide o una calicheamicina, un antibiótico, un isótopo radiactivo, una enzima nucleolítica o similares. Los oligopéptidos de unión a TASK pueden ser eventualmente producidos en células CHO o células bacterianas y preferiblemente inducen la muerte de una célula a la que se unen. Con fines diagnósticos, los oligopéptidos de unión a TASK pueden llevar un marcaje detectable, unirse a un soporte sólido o similares.

También se describen aquí vectores que comprenden ADN codificante de cualquiera de los oligopéptidos de unión a TASK aquí descritos. También se describen células huésped que contienen cualquiera de tales vectores. A modo de ejemplo, las células huésped pueden ser células CHO, *E. coli* o levaduras. Se describe además un procedimiento para producir cualquiera de los oligopéptidos de unión a TASK aquí descritos, y éste consiste en cultivar células huésped en condiciones adecuadas para la expresión del oligopéptido deseado y en recuperar el oligopéptido deseado del cultivo celular.

También se describen aquí pequeñas moléculas orgánicas ("moléculas orgánicas de unión a TASK") que se unen, preferiblemente de manera específica, a cualquiera de los polipéptidos TASK descritos anteriormente o a continuación. Eventualmente, las moléculas orgánicas de unión a TASK pueden estar conjugadas a un agente inhibidor del crecimiento o un agente citotóxico, tal como una toxina, incluyendo, por ejemplo, un maitansinoide o una calicheamicina, un antibiótico, un isótopo radiactivo, una enzima nucleolítica o similares. Las moléculas orgánicas de unión a TASK preferiblemente inactivan, ya sea parcial o totalmente, la actividad cinasa de la TASK. Las moléculas orgánicas de unión a TASK más preferiblemente inducen la muerte de una célula a la que se unen. Con fines diagnósticos, las moléculas orgánicas de unión a TASK pueden llevar un marcaje detectable, unirse a un soporte sólido o similares.

También se describe aquí una composición de materia que incluye un polipéptido TASK como aquí se describe, un polipéptido TASK quimérico como aquí se describe, un anticuerpo anti-TASK como aquí se describe, un oligopéptido de unión a TASK como aquí se describe o una molécula orgánica de unión a TASK como aquí se describe, en combinación con un soporte. Eventualmente, el soporte es un soporte farmacéuticamente aceptable.

También se describe aquí un artículo de fabricación que comprende un recipiente y una composición de materia contenida en el recipiente, donde la composición de materia puede incluir un polipéptido TASK como aquí se describe, un polipéptido TASK quimérico como aquí se describe, un anticuerpo anti-TASK como aquí se describe, un oligopéptido de unión a TASK como aquí se describe o una molécula orgánica de unión a TASK como aquí se describe. El artículo puede además incluir eventualmente una etiqueta adherida al recipiente, o un prospecto de envase incluido con el recipiente, que haga referencia al uso de la composición de materia para el tratamiento terapéutico o la detección diagnóstica de un tumor.

También se describe aquí el uso de un polipéptido TASK como aquí se describe, de un polipéptido TASK quimérico como aquí se describe, de un anticuerpo anti-polipéptido TASK como aquí se describe, de un oligopéptido de unión a TASK como aquí se describe o de una molécula orgánica de unión a TASK como aquí se describe para la preparación de un medicamento útil en el tratamiento de una afección que responde al polipéptido TASK, al polipéptido quimérico TASK, al anticuerpo anti-polipéptido TASK, al oligopéptido de unión a TASK o a la molécula orgánica de unión a TASK.

B. Realizaciones adicionales

Se describe aquí un método para matar una célula cancerosa que expresa un polipéptido TASK, donde el método consiste en poner en contacto la célula cancerosa con un anticuerpo, un oligopéptido o una pequeña molécula orgánica que se une al polipéptido TASK, lo cual da como resultado la muerte de la célula cancerosa. Eventualmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo de una sola cadena. Los anticuerpos, los oligopéptidos de unión a TASK y las moléculas orgánicas de unión a TASK que se emplean en los métodos pueden estar eventualmente conjugados a un agente inhibidor del crecimiento o un agente citotóxico, tal como una toxina, incluyendo, por ejemplo, un maitansinoide o una calicheamicina, un antibiótico, un isótopo radiactivo, una enzima nucleolítica o similares. Los anticuerpos y los oligopéptidos de unión a TASK empleados en los métodos pueden ser eventualmente producidos en células CHO o en células bacterianas.

Se describe aquí un método para inhibir el crecimiento de una célula cancerosa, donde el crecimiento de dicha célula cancerosa es al menos en parte dependiente del/de los efecto(s) potenciador(es) del crecimiento de un polipéptido TASK, donde el método consiste en poner en contacto el polipéptido TASK con un anticuerpo, un oligopéptido o una pequeña molécula orgánica que se une al polipéptido TASK, antagonizando así la actividad potenciadora del crecimiento del polipéptido TASK y, a su vez, inhibiendo el crecimiento de la célula cancerosa. Preferiblemente, se inhibe por completo el crecimiento de la célula cancerosa. Eventualmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo de una sola cadena. Los anticuerpos, oligopéptidos de unión a TASK y moléculas orgánicas de unión a TASK empleados en los métodos pueden estar eventualmente conjugados a un agente inhibidor del crecimiento o un agente citotóxico, tal como una toxina, incluyendo, por ejemplo, un maitansinoide o una calicheamicina, un antibiótico, un isótopo radiactivo, una enzima nucleolítica o similares. Los anticuerpos y los oligopéptidos de unión a TASK empleados en los métodos pueden ser eventualmente producidos en células CHO o en células bacterianas.

Se describe aquí un método de tratamiento terapéutico de un tumor que expresa polipéptido TASK en un mamífero, donde el método consiste en administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo, un

oligopéptido o una pequeña molécula orgánica que se une al polipéptido TASK, lo que da como resultado el tratamiento terapéutico efectivo del tumor. Eventualmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo de una sola cadena. Los anticuerpos, los oligopéptidos de unión a TASK y las moléculas orgánicas de unión a TASK empleados en los métodos pueden eventualmente estar conjugados a un agente inhibidor del crecimiento o un agente citotóxico, tal como una toxina, incluyendo, por ejemplo, un maitansinoide o una calicheamicina, un antibiótico, un isótopo radiactivo, una enzima nucleolítica o similares. Los anticuerpos y oligopéptidos empleados en los métodos pueden eventualmente ser producidos en células CHO o en células bacterianas.

Se describe aquí un método de tratamiento terapéutico de un tumor en un mamífero, donde el crecimiento de dicho tumor es al menos en parte dependiente del/de los efecto(s) potenciador(es) del crecimiento de un polipéptido TASK, donde el método consiste en administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo, un oligopéptido o una pequeña molécula orgánica que se une al polipéptido TASK, para antagonizar así la actividad potenciadora del crecimiento de dicho polipéptido TASK y conseguir como resultado el tratamiento terapéutico efectivo del tumor. Eventualmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo de una sola cadena. Los anticuerpos, oligopéptidos de unión a TASK y moléculas orgánicas de unión a TASK empleados en los métodos pueden eventualmente estar conjugados a un agente inhibidor del crecimiento o un agente citotóxico, tal como una toxina, incluyendo, por ejemplo, un maitansinoide o una calicheamicina, un antibiótico, un isótopo radiactivo, una enzima nucleolítica o similares. Los anticuerpos y oligopéptidos empleados en los métodos pueden eventualmente ser producidos en células CHO o en células bacterianas.

Se describe aquí un método para tratar o prevenir un trastorno proliferativo celular asociado a una expresión o actividad alterada, preferiblemente aumentada, de un polipéptido TASK, cuyo método consiste en administrar a un sujeto que tenga necesidad de dicho tratamiento una cantidad efectiva de un antagonista de un polipéptido TASK. Preferiblemente, el trastorno proliferativo celular es el cáncer y el antagonista del polipéptido TASK es un anticuerpo anti-polipéptido TASK, un oligopéptido de unión a TASK, una molécula orgánica de unión a TASK o un oligonucleótido antisentido. El tratamiento o prevención efectivos del trastorno proliferativo celular pueden ser el resultado de matar directamente o de inhibir el crecimiento de células que expresan un polipéptido TASK o del antagonismo de la actividad proliferativa celular de un polipéptido TASK.

Se describe aquí un método de determinación de la presencia de un polipéptido TASK en una muestra sospechosa de contener el polipéptido TASK, donde el método consiste en exponer la muestra a un anticuerpo, oligopéptido o pequeña molécula orgánica que se une al polipéptido TASK y en determinar la unión del anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica al polipéptido TASK en la muestra, donde la presencia de dicha unión es indicativa de la presencia del polipéptido TASK en la muestra. Eventualmente, la muestra puede contener células (que pueden ser células cancerosas) sospechosas de expresar el polipéptido TASK. El anticuerpo, el oligopéptido de unión a TASK o la molécula orgánica de unión a TASK empleados en el método pueden eventualmente llevar un marcaje detectable, unirse a un soporte sólido o similares.

La presente invención se dirige a un método de diagnóstico de la presencia de un tumor en un mamífero, donde el método consiste en detectar el nivel de expresión de un gen codificante de un polipéptido TASK (a) en una muestra de ensayo de células de tejidos obtenidas de dicho mamífero, y (b) en una muestra de control de células normales conocidas del mismo origen tisular, donde un mayor nivel de expresión del polipéptido TASK en la muestra de ensayo, en comparación con la muestra de control, es indicativo de la presencia de tumor en el mamífero del que se obtuvo la muestra de ensayo, como se define en las reivindicaciones.

La presente invención se refiere a un método de diagnóstico de la presencia de un tumor en un mamífero, donde el método consiste en (a) poner en contacto una muestra de ensayo que contiene células de tejidos obtenidas del mamífero con un anticuerpo, oligopéptido o pequeña molécula orgánica que se une a un polipéptido TASK, y (b) detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo, oligopéptido o pequeña molécula orgánica y el polipéptido TASK en la muestra de ensayo, donde la formación de un complejo es indicativa de la presencia de un tumor en el mamífero. Eventualmente, el anticuerpo, el oligopéptido de unión a TASK o la molécula orgánica de unión a TASK empleados llevan un marcaje detectable, se unen a un soporte sólido o similares, y/o la muestra de ensayo de células de tejidos es obtenida de un individuo sospechoso de tener un tumor canceroso.

Otras realizaciones de la presente invención serán evidentes para el experto en la técnica tras una lectura de la presente memoria descriptiva.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 25 muestra una secuencia nucleotídica (SEC. N° ID.: 25) de un ADNc TASK112, donde la SEC. N° ID.: 25 es un clon designado aquí como "DNA269860".

La Figure 26 muestra la secuencia de aminoácidos (SEC. N° ID.: 26) derivada de la secuencia codificante de la SEC. N° ID.: 25 mostrada en la Figura 25.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

I. Definiciones

5 Los términos "polipéptido TASK" y "TASK", tal como se usan aquí, y cuando vayan inmediatamente seguidos de una designación numérica, se refieren a diversos polipéptidos, donde la designación completa (es decir, TASK/número) se refiere a secuencias polipeptídicas específicas como aquí se describe. Los términos "polipéptido TASK/número" y "TASK/número", donde se proporciona el término "número" como una designación numérica real, tal como se usan aquí, incluyen polipéptidos de secuencia nativa, variantes polipeptídicas y fragmentos de polipéptidos de secuencia nativa y de variantes polipeptídicas (que se definen aquí con mayor amplitud). Los polipéptidos TASK aquí descritos pueden ser aislados de varias fuentes, tal como de tipos de tejidos humanos o de otra fuente, o pueden ser preparados por métodos recombinantes o sintéticos. El término "polipéptido TASK" se refiere a cada polipéptido TASK/número individual aquí divulgado. Todas las divulgaciones en esta memoria descriptiva que hacen referencia al "polipéptido TASK" se refieren a cada uno de los polipéptidos individualmente, así como de manera conjunta. Por ejemplo, las descripciones de la preparación de, de la purificación de, de la derivación de, de la formación de anticuerpos para o contra, de la formación de oligopéptidos de unión a TASK para o contra, de la formación de moléculas orgánicas de unión a TASK para o contra, de la administración de, de composiciones que contienen, del tratamiento de una enfermedad con, etc., conciernen a cada polipéptido de la invención individualmente. El término "polipéptido TASK" también incluye variantes de los polipéptidos TASK/número aquí divulgados.

20 Un "polipéptido TASK de secuencia nativa" comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el correspondiente polipéptido TASK derivado de la naturaleza. Dichos polipéptidos TASK de secuencia nativa pueden ser aislados de la naturaleza o pueden ser producidos por medios recombinantes o sintéticos. El término "polipéptido TASK de secuencia nativa" incluye específicamente formas truncadas que aparecen en la naturaleza del polipéptido TASK específico, formas variantes que aparecen en la naturaleza (v.g., formas alternativamente ajustadas) y variantes alélicas del polipéptido que aparecen en la naturaleza. En ciertas realizaciones de la invención, los polipéptidos TASK de secuencia nativa aquí divulgados son polipéptidos de secuencia nativa madura o de longitud total que comprenden las secuencias de aminoácidos de longitud total mostradas en las figuras adjuntas. Se muestran los codones de inicio y de parada (si está indicado) en negrita y subrayados en las figuras. Los residuos de ácidos nucleicos indicados como "N" en las figuras adjuntas son cualquier residuo de ácido nucleico. Sin embargo, aunque se muestra que los polipéptidos TASK divulgados en las figuras adjuntas comienzan con residuos de metionina aquí designados como la posición de aminoácido 1 en las figuras, es concebible y posible poder emplear otros residuos de metionina localizados secuencia arriba o secuencia abajo de la posición de aminoácido 1 en las figuras como el residuo de aminoácido de inicio para los polipéptidos TASK.

35 "Variante de polipéptido TASK" significa un polipéptido TASK, preferiblemente un polipéptido TASK activo, según se define aquí, que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de polipéptido TASK de secuencia nativa de longitud total como aquí se divulga, o cualquier otro fragmento de una secuencia de polipéptido TASK de longitud total como aquí se divulga (tales como los codificados por un ácido nucleico que representa sólo una porción de la secuencia codificante completa para un polipéptido TASK de longitud total). Dichas variantes de polipéptido TASK incluyen, por ejemplo, polipéptidos TASK en los que se añaden o eliminan uno o más residuos de aminoácido en el extremo N o C de la secuencia nativa de aminoácidos de longitud total. De forma ordinaria, una variante de polipéptido TASK tendrá al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente un 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos, con respecto a una secuencia de polipéptido TASK de secuencia nativa de longitud total como aquí se divulga, o cualquier otro fragmento específicamente definido de una secuencia de polipéptido TASK de longitud total como aquí se divulga. De forma ordinaria, los polipéptidos variantes TASK tienen al menos aproximadamente 10 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590 ó 600 aminoácidos de longitud o más. Eventualmente, los polipéptidos variantes TASK tendrán no más de una sustitución conservadora de aminoácidos en comparación con la secuencia nativa del polipéptido TASK, alternativamente no más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 sustituciones conservadoras de aminoácidos en comparación con la secuencia nativa del polipéptido TASK.

60 "Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a las secuencias del polipéptido TASK aquí identificadas se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia del polipéptido TASK específica, después de alinear las secuencias y de introducir huecos, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. Se puede conseguir la alineación con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos de diversas formas que están dentro del conocimiento de la técnica, por ejemplo, usando un programa informático públicamente disponible, tal como los programas BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar los parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir la máxima alineación sobre toda la longitud de las secuencias comparadas. Para nuestros fines, sin

embargo, se generan los valores del % de identidad de secuencia de aminoácidos usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2, donde se proporciona el código fuente completo para el programa ALIGN-2 en la Tabla 1 más adelante. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue creado por Genentech, Inc., y se ha presentado el código fuente mostrado en la Tabla 1 más adelante con documentación de usuario en la Oficina de Derechos de Autor de los EE.UU., Washington D.C., 20559, donde está registrado bajo el N° de Registro de Derechos de Autor de los EE.UU. TXU₅₁₀₀₈₇. El programa ALIGN-2 está abierto al público a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o puede ser compilado a partir del código fuente proporcionado en la Tabla 1 más adelante. El programa ALIGN-2 debe ser compilado para uso en un sistema operativo UNIX, preferiblemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias están establecidos por el programa ALIGN-2 y no varían.

En situaciones en las que se emplea ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de aminoácidos, se calcula el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A con, o frente a, una secuencia de aminoácidos dada B (lo que puede ser alternativamente expresado como una secuencia de aminoácidos dada A que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencia de aminoácidos con, o frente a, una secuencia de aminoácidos dada B) como sigue:

100 veces la fracción X/Y

donde X es el número de residuos de aminoácidos puntuados como correspondencias idénticas mediante el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en la alineación de ese programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B con respecto a A. Como ejemplos de cálculos de % de identidad de secuencia de aminoácidos usando este método, las Tablas 2 y 3 demuestran cómo calcular el % de identidad de secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos designada como "Proteína de Comparación" con respecto a la secuencia de aminoácidos designada como "TASK", donde "TASK" representa la secuencia de aminoácidos de un hipotético polipéptido TASK de interés. La "Proteína de Comparación" representa la secuencia de aminoácidos de un polipéptido frente al cual se está comparando el polipéptido "TASK" de interés, y "X", "Y" y "Z" representan cada uno diferentes residuos de aminoácidos hipotéticos. A menos que se indique específicamente lo contrario, todos los valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos aquí utilizados son obtenidos como se ha descrito en el párrafo inmediatamente anterior usando el programa informático ALIGN-2.

"Polinucleótido variante TASK" o "secuencia de ácido nucleico variante TASK" significa una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido TASK, preferiblemente un polipéptido TASK activo, como se define aquí, y que tiene al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de ácido nucleico con una secuencia de ácido nucleico codificante de una secuencia de polipéptido TASK de secuencia nativa de longitud total como se divulga aquí, o cualquier otro fragmento de una secuencia de polipéptido TASK de longitud total como se divulga aquí (tales como los codificados por un ácido nucleico que representa sólo una porción de la secuencia codificante completa para un polipéptido TASK de longitud total). De forma ordinaria, un polinucleótido variante TASK tendrá al menos aproximadamente un 80 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, alternativamente al menos aproximadamente un 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, con una secuencia de ácido nucleico codificante de una secuencia de polipéptido TASK de secuencia nativa de longitud total como se divulga aquí, o cualquier otro fragmento de una secuencia de polipéptido TASK de longitud total como se divulga aquí. Las variantes no incluyen la secuencia nucleotídica nativa.

De forma ordinaria, los polinucleótidos variantes TASK tienen al menos aproximadamente 5 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990 ó 1.000 nucleótidos de longitud, donde, en este contexto, el término "aproximadamente" significa la longitud de secuencia nucleotídica referenciada más o menos un 10 % de esa longitud referenciada.

El "porcentaje (%) de identidad de secuencia de ácido nucleico" con respecto a las secuencias de ácidos nucleicos codificantes de TASK aquí identificadas se define como el porcentaje de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos a los nucleótidos en la secuencia de ácido nucleico TASK de interés, después de alinear las secuencias y de introducir huecos, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia. Se puede conseguir la alineación con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de ácido nucleico de varias formas que están dentro de los conocimientos en la técnica, por ejemplo, usando un programa informático públicamente disponible, tal como el programa BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Para nuestros fines, sin embargo, se generan los valores del % de identidad de secuencia de ácido nucleico usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2, donde se proporciona el código fuente completo para el

programa ALIGN-2 en la Tabla 1 más adelante. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue creado por Genentech, Inc., y se ha presentado el código fuente que se muestra más adelante en la Tabla 1 con documentación de usuario en la Oficina de Derechos de Autor de los EE.UU., Washington D.C., 20559, donde está registrado bajo el N° de Registro de Derechos de Autor de los EE.UU. TXU510087. El programa ALIGN-2 está abierto al público a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o puede ser compilado a partir del código fuente proporcionado en la Tabla 1 más adelante. El programa ALIGN-2 debe ser compilado para uso en un sistema operativo UNIX, preferiblemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias están establecidos por el programa ALIGN-2 y no varían.

En situaciones en las que se emplea ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de ácidos nucleicos, se calcula el % de identidad de secuencia de ácido nucleico de una secuencia de ácido nucleico dada C con, o frente a, una secuencia de ácido nucleico dada D (lo que puede ser alternativamente expresado como una secuencia de ácido nucleico dada C que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencia de ácido nucleico con, o frente a, una secuencia de ácido nucleico dada D) como sigue:

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

donde W es el número de nucleótidos puntuados como correspondencias idénticas por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en la alineación de ese programa de C y D, y donde Z es el número total de nucleótidos en D. Se apreciará que, cuando la longitud de la secuencia de ácido nucleico C no es igual a la longitud de la secuencia de ácido nucleico D, el % de identidad de secuencia de ácido nucleico de C con respecto a D no será igual al % de identidad de secuencia de ácido nucleico de D con respecto a C. Como ejemplos de cálculos del % de identidad de secuencia de ácido nucleico, las Tablas 4 y 5 demuestran cómo calcular el % de identidad de secuencia de ácido nucleico de la secuencia de ácido nucleico designada como "ADN de Comparación" con respecto a la secuencia de ácido nucleico designada como "ADN TASK", donde "ADN TASK" representa una secuencia de ácido nucleico codificante de TASK hipotética de interés, "ADN de Comparación" representa la secuencia nucleotídica de una molécula de ácido nucleico frente a la cual se está comparando la molécula de ácido nucleico "ADN TASK" de interés, y "N", "L" y "V" representan cada uno diferentes nucleótidos hipotéticos. A menos que se indique específicamente algo diferente, todos los valores de los % de identidad de secuencia de ácido nucleico usados aquí son obtenidos como se ha descrito en el párrafo inmediatamente anterior usando el programa informático ALIGN-2.

En otras realizaciones, los polinucleótidos variantes TASK son moléculas de ácidos nucleicos que codifican un polipéptido TASK y que son capaces de hibridarse, preferiblemente en condiciones estrictas de hibridación y de lavado, con secuencias nucleotídicas codificantes de un polipéptido TASK de longitud total como aquí se divulga. Los polipéptidos variantes TASK pueden ser los que están codificados por un polinucleótido variante TASK.

"Aislado", cuando se usa para describir los diversos polipéptidos TASK aquí divulgados, significa un polipéptido que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que normalmente interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos del polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, el polipéptido será purificado (1) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos N-terminales o internos mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria, o (2) hasta la homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras usando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción de plata. El polipéptido aislado incluye polipéptido *in situ* en células recombinantes, ya que al menos un componente del ambiente natural del polipéptido TASK no estará presente. De forma ordinaria, sin embargo, se preparará el polipéptido aislado mediante al menos una etapa de purificación.

Un ácido nucleico codificante de polipéptido TASK u otro ácido nucleico codificante de polipéptido "aislado" es una molécula de ácido nucleico que se identifica y separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que habitualmente se asocia en la fuente natural del ácido nucleico codificante del polipéptido. Una molécula de ácido nucleico codificante de polipéptido aislada no está en la forma o escenario en que se encuentra en la naturaleza. Las moléculas de ácidos nucleicos codificantes de polipéptidos aisladas, por lo tanto, se distinguen de la molécula de ácido nucleico codificante de polipéptido específica tal como existe en las células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico codificante de polipéptido aislada incluye moléculas de ácido nucleico codificante de polipéptido contenidas en células que de forma ordinaria expresan el polipéptido, donde, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales.

El término "secuencias de control" se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante operablemente unida en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariontes, por ejemplo, incluyen un promotor, eventualmente una secuencia operadora y un sitio de unión a ribosomas. Se sabe que las células eucarióticas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

El ácido nucleico está "operablemente unido" cuando se le pone en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o un líder secretor está operablemente unido a ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está operablemente unido a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un

sitio de unión a ribosomas está operablemente unido a una secuencia codificante si se sitúa de manera que facilita la traducción. En general, "operablemente unido" significa que las secuencias de ADN que se unen son contiguas, y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen por qué ser contiguos. Se consigue la unión por ligación en sitios de restricción convenientes. Si no existen dichos sitios, se usan los adaptadores o conectores oligonucleotídicos sintéticos según la práctica convencional.

El "rigor" de las reacciones de hibridación es fácilmente determinable por alguien con conocimientos ordinarios en la técnica, y generalmente es un cálculo empírico dependiente de la longitud de la sonda, la temperatura de lavado y la concentración salina. En general, sondas más largas requieren mayores temperaturas para una apropiada hibridación, mientras que sondas más cortas necesitan menores temperaturas. La hibridación generalmente depende de la capacidad del ADN desnaturizado para rehibridarse cuando hay presencia de hebras complementarias en el ambiente por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor sea el grado de homología deseada entre la sonda y la secuencia hibridable, mayor será la temperatura relativa que puede usarse. Como resultado, se deduce que mayores temperaturas relativas tenderían a hacer más estrictas las condiciones de reacción, mientras que temperaturas más bajas tendrían una menor tendencia. Para detalles adicionales y para una explicación del rigor de las reacciones de hibridación, véase Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers (1995).

Las "condiciones rigurosas" o "condiciones de alto rigor", según se definen aquí, pueden ser identificadas por aquellas que: (1) emplean una baja fuerza iónica y una alta temperatura para el lavado, por ejemplo cloruro de sodio 0,015 M/citrato de sodio 0,0015 M/dodecilsulfato de sodio al 0,1 % a 50 °C; (2) emplean durante la hibridación un agente desnaturizante, tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50 % (v/v) con 0,1 % de seroalbúmina bovina/0,1 % de Ficoll/0,1 % de polivinilpirrolidona/tampón fosfato de sodio 50 mM a pH 6,5, con cloruro de sodio 750 mM, citrato de sodio 75 mM a 42 °C; o (3) emplean formamida al 50 %, SSC 5 x (NaCl 0,75 M, citrato de sodio 0,075 M), fosfato de sodio 50 mM (pH 6,8), 0,1 % de pirofosfato de sodio, solución de Denhardt 5 x, ADN de esperma de salmón sonicado (50 µg/ml), 0,1 % de SDS y 10 % de sulfato de dextrano a 42 °C, con lavados a 42 °C en SSC (cloruro de sodio/citrato de sodio) 0,2 x y formamida al 50 % a 55 °C, seguido de un lavado de alto rigor consistente en SSC 0,1 x que contiene EDTA a 55 °C.

Las "condiciones moderadamente rigurosas" pueden ser identificadas como describen Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen el uso de una solución de lavado y de condiciones de hibridación (v.g., temperatura, fuerza iónica y % de SDS) menos rigurosas que las descritas anteriormente. Un ejemplo de condiciones moderadamente rigurosas es la incubación durante la noche a 37 °C en una solución consistente en: 20 % de formamida, SSC 5 x (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), solución de Denhardt 5 x, 10 % de sulfato de dextrano y 20 mg/ml de ADN de esperma de salmón cizallado desnaturizado, seguida de lavado de los filtros en SSC 1 x a aproximadamente 37-50 °C. El experto en la técnica reconocerá cómo ajustar la temperatura, la fuerza iónica, etc. según sea necesario para acomodar factores tales como la longitud de la sonda y similares.

El término "marcado con epitopo", cuando se usa aquí, se refiere a un polipéptido químico que comprende un polipéptido TASK o anticuerpo anti-TASK fusionado a un "polipéptido marcador". El polipéptido marcador tiene suficientes residuos como para proporcionar un epitopo contra el cual se puede producir un anticuerpo, y aún así es lo suficientemente corto como para no interferir con la actividad del polipéptido al que se fusiona. El polipéptido marcador preferiblemente es también bastante único, de tal forma que el anticuerpo substancialmente no presenta reacción cruzada con otros epitopos. Los polipéptidos marcadores adecuados generalmente tienen al menos seis residuos de aminoácidos y normalmente entre aproximadamente 8 y 50 residuos de aminoácidos (preferiblemente, entre aproximadamente 10 y 20 residuos de aminoácidos).

"Activo" o "actividad" para nuestros fines, se refiere a forma(s) de un polipéptido TASK que conserva(n) una actividad biológica y/o inmunológica del TASK nativo o natural, donde actividad "biológica" se refiere a una función biológica (ya sea inhibitoria o estimuladora) causada por un TASK nativo o natural distinta de la capacidad para inducir la producción de un anticuerpo contra un epitopo antigénico poseído por un TASK nativo o natural, y una actividad "inmunológica" se refiere a la capacidad para inducir la producción de un anticuerpo contra un epitopo antigénico poseído por un TASK nativo o natural.

El término "antagonista" es utilizado en su sentido más amplio e incluye cualquier molécula que bloquee, inhíba o neutralice parcial o totalmente una actividad biológica de un polipéptido TASK nativo aquí divulgado. De un modo similar, el término "agonista" es utilizado en su sentido más amplio e incluye cualquier molécula que imite una actividad biológica de un polipéptido TASK nativo aquí divulgado. Como moléculas agonistas o antagonistas adecuadas, se incluyen específicamente anticuerpos o fragmentos de anticuerpos agonistas o antagonistas, fragmentos o variantes de secuencias de aminoácidos de polipéptidos TASK nativos, péptidos, oligonucleótidos antisentido, pequeñas moléculas orgánicas, etc. Los métodos para identificar agonistas o antagonistas de un polipéptido TASK pueden consistir en poner en contacto un polipéptido TASK con una molécula agonista o antagonista candidata y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas normalmente asociadas al polipéptido TASK.

"Tratar" o "tratamiento" o "alivio" se refiere tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, donde el objeto es prevenir o ralentizar (disminuir) la afección o trastorno patológico abordado. Entre quienes necesitan tratamiento, se incluyen los que ya tienen el trastorno, así como los que son proclives a tener el trastorno o aquéllos en los que se ha de prevenir el trastorno. Un sujeto o mamífero es "tratado" con éxito para un cáncer que expresa polipéptido TASK si después de recibir una cantidad terapéutica de un anticuerpo anti-TASK, un oligopéptido de unión a TASK o una molécula orgánica de unión a TASK según los métodos de la presente invención, el paciente muestra una reducción observable y/o mensurable en, o ausencia de, uno o más de los siguientes: reducción en el número de células cancerosas o ausencia de las células cancerosas; reducción en el tamaño del tumor; inhibición (es decir, ralentización en algún grado y preferiblemente detención) de la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos, incluyendo la diseminación del cáncer hacia tejidos blandos y hueso; inhibición (es decir, ralentización en algún grado y preferiblemente detención) de la metástasis tumoral; inhibición, en algún grado, del crecimiento tumoral; y/o alivio en algún grado de uno o más de los síntomas asociados al cáncer específico; morbilidad y mortalidad reducidas, y mejora en la calidad de las cuestiones vitales. En la medida en que el anticuerpo anti-TASK o el oligopéptido de unión a TASK pueda prevenir el crecimiento y/o matar las células cancerosas existentes, éste puede ser citostático y/o citotóxico. El paciente también puede sentir la reducción de estos signos o síntomas.

Los anteriores parámetros para valorar el éxito en el tratamiento y la mejoría de la enfermedad son fácilmente medibles por procedimientos rutinarios familiares para un médico. Para la terapia del cáncer, se puede medir la eficacia, por ejemplo, valorando el tiempo para la progresión de la enfermedad (TPP) y/o determinando el índice de respuesta (IR). Se puede determinar la metástasis mediante pruebas de estadificación y mediante escáner óseo y pruebas para el nivel de calcio y otras enzimas con objeto de determinar la diseminación al hueso. También se pueden realizar escáneres de TC para buscar la diseminación a la pelvis y a los nódulos linfáticos del área. Se usan radiografías de tórax y medición de los niveles de enzimas hepáticas por métodos conocidos para buscar metástasis a los pulmones y al hígado, respectivamente. Otros métodos de rutina para la monitorización de la enfermedad incluyen la ultrasonografía transrectal (USTR) y la biopsia transrectal con aguja (BTRA).

Para el cáncer de vejiga, que es un cáncer más localizado, los métodos para determinar el progreso de la enfermedad incluyen la evaluación citológica urinaria por cistoscopia, la monitorización en cuanto a la presencia de sangre en la orina, la visualización del tracto urotelial por sonografía o un pielograma intravenoso, la tomografía computerizada (TC) y la imagen por resonancia magnética (IRM). Se puede valorar la presencia de metástasis distantes por TC del abdomen, radiografías de tórax o imagen por radionúclidos del esqueleto.

Administración "crónica" se refiere a la administración del/de los agente(s) de un modo continuo, en oposición a un modo agudo, para mantener el efecto (actividad) terapéutico inicial durante un período prolongado de tiempo. Administración "intermitente" es un tratamiento que no se realiza de manera consecutiva sin interrupción, sino que más bien es de naturaleza cíclica.

"Mamífero", para los fines del tratamiento, el alivio de los síntomas o el diagnóstico de un cáncer, se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja y animales de zoo, deportes o compañía, tales como perros, gatos, vacuno, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos, etc. Preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

La administración "en combinación con" uno o más de otros agentes terapéuticos incluye la administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

Los "soportes", tal como se utilizan aquí, incluyen soportes, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos para la célula o el mamífero que se expone a ellos a las dosificaciones y concentraciones empleadas. Con frecuencia, el soporte fisiológicamente aceptable es una solución acuosa con pH tamponado. Como ejemplos de soportes fisiológicamente aceptables, se incluyen tampones, tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparragina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; alcoholes de azúcares, tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; y/o surfactantes no iónicos, tales como TWEEN[®], polietilenglicol (PEG) y PLURONICS[®].

Por "fase sólida" o "soporte sólido" se entiende una matriz no acuosa a la que se puede adherir o unir un anticuerpo, oligopéptido de unión a TASK o molécula orgánica de unión a TASK de la presente invención. Como ejemplos de fases sólidas aquí abarcadas, se incluyen las que están parcial o totalmente formadas de vidrio (v.g., vidrio de poro controlado), polisacáridos (v.g., agarosa), poliácridamidas, poliestireno, alcohol polivinílico y siliconas. En ciertas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede consistir en el pocillo de una placa de ensayo; en otras, es una columna de purificación (v.g., una columna de cromatografía de afinidad). Este término también incluye una fase sólida discontinua de partículas discretas, tal como las descritas en la Patente EE.UU. N° 4.275.149.

Un "liposoma" es una pequeña vesícula compuesta por diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o surfactante que resulta útil para la administración de un fármaco (tal como un polipéptido TASK, un anticuerpo para el mismo o un oligopéptido de unión a TASK) a un mamífero. Los componentes del liposoma están comúnmente organizados en una formación de bicapa, similar a la organización de los lípidos de las membranas biológicas.

5 Una "pequeña" molécula o "pequeña" molécula orgánica es aquí definida como con un peso molecular inferior a aproximadamente 500 Daltons.

10 Una "cantidad efectiva" de un polipéptido, anticuerpo, oligopéptido de unión a TASK o molécula orgánica de unión a TASK o de un agonista o antagonista de los mismos, tal como aquí se divulga, es una cantidad suficiente para llevar a cabo un propósito específicamente expuesto. Se puede determinar una "cantidad efectiva" empíricamente y de un modo rutinario en relación al propósito expuesto.

15 El término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad de un anticuerpo, polipéptido, oligopéptido de unión a TASK, molécula orgánica de unión a TASK u otro fármaco efectivo para "tratar" una enfermedad o trastorno en un sujeto o mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente efectiva del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar en algún grado y preferiblemente detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar en algún grado y preferiblemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, en algún grado, el crecimiento tumoral; y/o aliviar en algún grado uno o más de los síntomas asociados al cáncer. Véase la definición que aquí se da de "tratar". En la medida en que el fármaco pueda evitar el crecimiento y/o matar las células cancerosas existentes, éste puede ser citostático y/o citotóxico.

25 Una "cantidad inhibitoria del crecimiento" de un anticuerpo anti-TASK, polipéptido TASK, oligopéptido de unión a TASK o molécula orgánica de unión a TASK es una cantidad capaz de inhibir el crecimiento de una célula, especialmente tumoral, v.g., célula cancerosa, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Una "cantidad inhibitoria del crecimiento" de un anticuerpo anti-TASK, polipéptido TASK, oligopéptido de unión a TASK o molécula orgánica de unión a TASK con fines de inhibición del crecimiento de células neoplásicas puede ser determinada empíricamente y de un modo rutinario.

30 Una "cantidad citotóxica" de un anticuerpo anti-TASK, polipéptido TASK, oligopéptido de unión a TASK o molécula orgánica de unión a TASK es una cantidad capaz de provocar la destrucción de una célula, especialmente tumoral, v.g., célula cancerosa, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Una "cantidad citotóxica" de un anticuerpo anti-TASK, polipéptido TASK, oligopéptido de unión a TASK o molécula orgánica de unión a TASK con fines de inhibición del crecimiento de células neoplásicas puede ser determinada empíricamente y de un modo rutinario.

40 El término "anticuerpo" es usado en su más amplio sentido y cubre específicamente, por ejemplo, anticuerpos monoclonales anti-TASK simples (incluyendo anticuerpos agonistas, antagonistas y neutralizantes), composiciones de anticuerpos anti-TASK con especificidad poliepitópica, anticuerpos policlonales, anticuerpos anti-TASK de una sola cadena y fragmentos de anticuerpos anti-TASK (véase más adelante), siempre que exhiban la actividad biológica o inmunológica deseada. El término "inmunoglobulina" (Ig) es usado aquí indistintamente con anticuerpo.

45 Un "anticuerpo aislado" es uno que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su ambiente natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo será purificado (1) hasta más de un 95 % en peso de anticuerpo según se determina por el método de Lowry, y más preferiblemente hasta más de un 99 % en peso; (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos N-terminales o internos mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria; o (3) hasta la homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* en células recombinantes, ya que al menos un componente del ambiente natural del anticuerpo no estará presente. De forma ordinaria, sin embargo, se preparará anticuerpo aislado mediante al menos una etapa de purificación.

55 La unidad básica de un anticuerpo de 4 cadenas es una glicoproteína heterotetramérica compuesta por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas (un anticuerpo IgM consiste en 5 de las unidades heterotetraméricas básicas junto con un polipéptido adicional denominado cadena J, y por lo tanto contiene 10 sitios de unión a antígeno, mientras que los anticuerpos IgA segregados pueden polimerizarse para formar ensamblajes polivalentes que comprenden 2-5 de las unidades básicas de 4 cadenas junto con la cadena J). En el caso las IgG, la unidad de 4 cadenas tiene generalmente aproximadamente 150.000 daltons. Cada cadena L se une a una cadena H por un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H se unen entre sí por uno o más enlaces disulfuro dependiendo del isotipo de la cadena H. Cada cadena H y L tiene también puentes disulfuro intracatenarios regularmente espaciados. Cada cadena H tiene en el extremo N un dominio variable (V_H), seguido de tres dominios constantes (C_H) para cada una de las cadenas α y γ y cuatro dominios C_H para los isotipos μ y ϵ . Cada cadena L tiene en el extremo N un dominio variable (V_L), seguido de un dominio constante (C_L) en su otro extremo. El V_L está alineado con el V_H y el C_L está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada (C_H1). Se piensa que

residuos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de las cadenas ligeras y de las cadenas pesadas. El emparejamiento de un V_H y un V_L juntos forma un único sitio de unión a antígeno. Para la estructura y las propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, véase, *v.g.*, Basic and Clinical Immunology, 8ª edición, Daniel P. Stites, Abba I. Terr y Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, página 71 y Capítulo 6.

La cadena L de cualquier especie de vertebrados puede ser asignada a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa y lambda, basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (C_H), las inmunoglobulinas pueden ser asignadas a diferentes clases o isotipos. Existen cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que tienen cadenas pesadas designadas como α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las clases γ y α se dividen a su vez en subclases basándose en diferencias relativamente menores en la secuencia y función de C_H ; *v.g.*, los humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2.

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertos segmentos de los dominios variables difieren ampliamente en cuanto a secuencia entre anticuerpos. El dominio V media en la unión a antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está uniformemente distribuida a través del tramo de 110 aminoácidos de los dominios variables. En lugar de ello, las regiones V consisten en tramos relativamente no variables denominados regiones de marco (FR) de 15-30 aminoácidos separados por regiones más cortas de extrema variabilidad denominadas "regiones hipervariables" que tienen cada una una longitud de 9-12 aminoácidos. Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro FR, que adoptan en gran parte una configuración de lámina β , conectadas por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de ella, la estructura de lámina β . Las regiones hipervariables de cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad mediante las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no están directamente implicados en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero exhiben diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

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

El término "anticuerpo monoclonal", tal como se usa aquí, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos substancialmente homogéneos, es decir, que los anticuerpos individuales que constituyen la población son idénticos, excepto por las posibles mutaciones naturales que puedan estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un solo sitio antigénico. Más aún, contrariamente a las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epitopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un solo determinante sobre el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en el sentido de que pueden ser sintetizados sin contaminación por otros anticuerpos. No se ha de considerar que el modificador "monoclonal" requiera producción del anticuerpo por cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales útiles en la presente invención pueden ser preparados por la metodología de hibridomas descrita por primera vez por Kohler *et al.*, Nature, 256: 495 (1975), o pueden ser producidos usando métodos de ADN recombinante en células bacterianas o eucarióticas animales o vegetales (véase, *v.g.*, la Patente EE.UU. N° 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" pueden ser también aislados de librerías de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, Nature, 352: 624-628 (1991), y Marks *et al.*, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales aquí incluyen anticuerpos "quiméricos" en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpos particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, en la medida en que exhiban la actividad biológica deseada (véanse la Patente EE.UU. N° 4.816.567 y Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés aquí incluyen anticuerpos "primatizados", que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (*v.g.*, Mono del Viejo Mundo, Simio, etc.) y secuencias de región constante humanas.

Un anticuerpo "intacto" es uno que comprende un sitio de unión a antígeno, así como un C_L y al menos dominios constantes de cadena pesada, C_{H1} , C_{H2} y C_{H3} . Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de

secuencia nativa (v.g., dominios constantes de secuencia nativa humana) o variantes de secuencia de aminoácidos de los mismos. Preferiblemente, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

5 Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región de unión a antígeno o variable del anticuerpo intacto. Como ejemplos de fragmentos de anticuerpos, se incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (véanse la Patente EE.UU. 5.641.870, Ejemplo 2, y Zapata *et al.*, Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpo de una sola cadena; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

10 La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", y un fragmento "Fc" residual, una designación que refleja la capacidad para cristalizar fácilmente. El fragmento Fab consiste en una cadena L entera junto con el dominio de región variable de la cadena H (V_H) y el primer dominio constante de una cadena pesada (C_{H1}). Cada fragmento Fab es monovalente con respecto a la unión a antígeno, es decir, que tiene un solo sitio de unión a antígeno. El tratamiento con pepsina de un anticuerpo da un solo fragmento F(ab')₂ grande que se corresponde aproximadamente con dos fragmentos Fab unidos mediante disulfuro que tienen actividad de unión a antígeno divalente y es aún capaz de entrecruzarse con antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por tener unos pocos residuos adicionales en el extremo carboxi del dominio C_{H1} que incluyen una o más cisteínas de la región de bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación aquí para Fab' en donde el/los residuo(s) de cisteína de los dominios constantes lleva(n) un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpos F(ab')₂ fueron originalmente producidos como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas a modo de bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

25 El fragmento Fc comprende las porciones carboxiterminales de ambas cadenas H mantenidas juntas por disulfuros. Se determinan las funciones efectoras de los anticuerpos por las secuencias en la región Fc, cuya región es también la parte reconocida por los receptores de Fc (FcR) que se encuentran en ciertos tipos de células.

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

35 Los "Fv de una sola cadena", también abreviados como "sFv" o "scFv", son fragmentos de anticuerpos que comprenden los dominios de anticuerpo V_H y V_L conectados en una sola cadena polipeptídica. Preferiblemente, el polipéptido sFv comprende además un conector polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite al sFv formar la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de sFv, véase Pluckthun, en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, *infra*.

45 El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos preparados construyendo fragmentos sFv (véase el párrafo anterior) con conectores cortos (aproximadamente 5-10 residuos) entre los dominios V_H y V_L, de tal forma que se consigue un emparejamiento intercatenario, pero no intracatenario, de los dominios V, para obtener como resultado un fragmento bivalente, es decir, un fragmento que tiene dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos biespecíficos son heterodímeros de dos fragmentos sFv de "cruzamiento", en donde los dominios V_H y V_L de los dos anticuerpos están presentes en diferentes cadenas polipeptídicas. Se describen los diacuerpos más ampliamente en, por ejemplo, EP 404.097, WO 93/11161 y Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993).

55 Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (v.g., de roedores) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada del anticuerpo no humano. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que se substituyen residuos de una región hipervariable del receptor por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano, que tiene la especificidad, afinidad y capacidad de anticuerpo deseadas. En algunos casos, se substituyen residuos de región de marco (FR) de la inmunoglobulina humana por residuos no humanos correspondientes. Más aún, los anticuerpos humanizados pueden incluir residuos que no se encuentren en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones son realizadas para refinar aún más el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá substancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en donde todos o substancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana, y todas o substancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado eventualmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véanse Jones *et al.*, Nature 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332: 323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992).

Un "anticuerpo dependiente de especie", *v.g.*, un anticuerpo anti-IgE humana de mamíferos, es un anticuerpo que tiene una mayor afinidad de unión por un antígeno de una primera especie de mamífero que la que tiene por un homólogo de ese antígeno de una segunda especie de mamífero. Normalmente, el anticuerpo dependiente de especie "se une específicamente" a un antígeno humano (es decir, que tiene un valor de afinidad de unión (Kd) de no más de aproximadamente 1×10^{-7} M, preferiblemente de no más de aproximadamente 1×10^{-8} y más preferiblemente de no más de aproximadamente 1×10^{-9} M), pero tiene una afinidad de unión por un homólogo del antígeno de una segunda especie de mamífero no humano que es al menos aproximadamente 50 veces, o al menos aproximadamente 500 veces, o al menos aproximadamente 1.000 veces, más débil que su afinidad de unión por el antígeno humano. El anticuerpo dependiente de especie puede ser cualquiera de los diversos tipos de anticuerpos definidos anteriormente, pero es preferiblemente un anticuerpo humanizado o humano.

Un "oligopéptido de unión a TASK" es un oligopéptido que se une, preferiblemente de manera específica, a un polipéptido TASK como se describe aquí. Se pueden sintetizar químicamente oligopéptidos de unión a TASK usando una metodología conocida de síntesis de oligopéptidos, o se pueden preparar y purificar usando tecnología recombinante. Los oligopéptidos de unión a TASK tienen normalmente al menos aproximadamente 5 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ó 100 aminoácidos de longitud o más, donde dichos oligopéptidos son capaces de unirse, preferiblemente de manera específica, a un polipéptido TASK como aquí se describe. Los oligopéptidos de unión a TASK pueden ser identificados sin una excesiva experimentación usando técnicas bien conocidas. En este sentido, se hace notar que las técnicas para cribar librerías de oligopéptidos para encontrar oligopéptidos que sean capaces de unirse específicamente a una diana polipeptídica son bien conocidas en este campo (véanse, *v.g.*, las Patentes EE.UU. N° 5.556.762, 5.750.373, 4.708.871, 4.833.092, 5.223.409, 5.403.484, 5.571.689 y 5.663.143; las Publicaciones PCT N° 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.*, en 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); Cwirra, 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).

Una "molécula orgánica de unión a TASK" es una molécula orgánica distinta de un oligopéptido o de un anticuerpo como aquí se define que se une, preferiblemente de manera específica, a un polipéptido TASK como aquí se describe. Las moléculas orgánicas de unión a TASK pueden ser identificadas y químicamente sintetizadas usando una metodología conocida (véanse, *v.g.*, las Publicaciones PCT N° WO00/00823 y WO00/39585). Las moléculas orgánicas de unión a TASK tienen normalmente un tamaño inferior a aproximadamente 2.000 daltons, alternativamente un tamaño inferior a aproximadamente 1.500, 750, 500, 250 ó 200 daltons, donde dichas moléculas orgánicas que son capaces de unirse, preferiblemente de manera específica, a un polipéptido TASK como aquí se describe pueden ser identificadas sin una excesiva experimentación usando técnicas bien conocidas. En este sentido, se hace notar que las técnicas de cribado de librerías de moléculas orgánicas para encontrar moléculas que sean capaces de unirse a una diana polipeptídica son bien conocidas en este campo (véanse, *v.g.*, las Publicaciones PCT N° WO00/00823 y WO00/39585).

Un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica "que se une" a un antígeno de interés, *v.g.*, una diana antigénica polipeptídica asociada a tumores, es uno que se une al antígeno con suficiente afinidad, de tal forma que el anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica es útil como agente diagnóstico y/o terapéutico para dirigirse a una célula o tejido que expresa el antígeno, y no presenta reacción cruzada significativa con otras proteínas. En tales realizaciones, el grado de unión del anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica a una proteína "no diana" será menor de aproximadamente un 10 % de la unión del anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica a su proteína diana particular, según se determina por análisis de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) o radioinmunoprecipitación (RIA). Con respecto a la unión de un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica a una molécula diana, el término "unión específica a" o "se une específicamente a" o "es específico para" un polipéptido particular o un epitopo sobre una diana polipeptídica particular significa una unión que es diferente, según se puede medir, de una interacción no específica. Se puede medir la unión específica, por ejemplo, determinando la unión de una molécula en comparación con la unión de una molécula control, que generalmente es una molécula de estructura similar que no tiene actividad de unión. Por ejemplo, se puede determinar la unión específica por competición con una molécula de control que sea similar a la diana, por ejemplo, un exceso de diana no marcada. En este caso, la unión específica queda indicada si la unión de la diana marcada a una sonda resulta competitivamente inhibida por un exceso de diana no marcada. El término "unión específica" o "se une específicamente a" o es "específico para" un polipéptido particular o un epitopo sobre una diana polipeptídica particular, tal como se usa aquí, puede ser exhibido, por ejemplo, por una molécula que tenga una Kd para la diana de al menos aproximadamente 10^{-4} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-5} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-6} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-7} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-8} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-9} M, alternativamente al menos

aproximadamente 10^{-10} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-11} M, alternativamente al menos aproximadamente 10^{-12} M, o superior. En una realización, el término "unión específica" se refiere a una unión donde una molécula se une a un polipéptido particular o un epítopo sobre un polipéptido particular sin unirse substancialmente a cualquier otro polipéptido o epítopo polipeptídico.

Un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica que "inhibe el crecimiento de células tumorales que expresan un polipéptido TASK", o un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica "inhibitoria del crecimiento", es uno que da lugar a una inhibición medible del crecimiento de células cancerosas que expresan o sobreexpresan el polipéptido TASK apropiado. Los anticuerpos, oligopéptidos o moléculas orgánicas anti-TASK inhibidores del crecimiento preferidos inhiben el crecimiento de células tumorales que expresan TASK en más de un 20 %, preferiblemente en de aproximadamente un 20 % a aproximadamente un 50 %, e incluso más preferiblemente en más de un 50 % (v.g., en de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 100 %, en comparación con el control apropiado, siendo normalmente el control células tumorales no tratadas con el anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica en estudio. En una realización, se puede medir la inhibición del crecimiento a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,1 a 30 $\mu\text{g/ml}$ o de aproximadamente 0,5 nM a 200 nM en cultivo celular, donde se determina la inhibición del crecimiento 1-10 días después de la exposición de las células tumorales al anticuerpo. Se puede determinar la inhibición del crecimiento de las células tumorales *in vivo* de diversas formas, tal como se describe más adelante en la sección de Ejemplos Experimentales. El anticuerpo es inhibidor del crecimiento *in vivo* si la administración del anticuerpo anti-TASK a una dosis de aproximadamente 1 $\mu\text{g/kg}$ a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal da lugar a una reducción del tamaño tumoral o de la proliferación de las células tumorales en un plazo de aproximadamente 5 días a 3 meses desde la primera administración del anticuerpo, preferiblemente en un plazo de aproximadamente 5 a 30 días.

Un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica que "induce apoptosis" es uno que induce la muerte celular programada, según se determina por unión de anexina V, fragmentación de DNA, retracción celular, dilatación del retículo endoplásmico, fragmentación celular y/o formación de vesículas de membrana (llamadas cuerpos apoptóticos). La célula es normalmente una que sobreexpresa un polipéptido TASK. Preferiblemente, la célula es una célula tumoral, v.g., una célula de próstata, mama, ovario, estómago, endometrio, pulmón, riñón, colon o vejiga. Se dispone de diversos métodos para evaluar los sucesos celulares asociados a apoptosis. Por ejemplo, se puede medir la translocación de fosfatidilserina (PS) por la unión de anexina; se puede evaluar la fragmentación del ADN mediante fragmentación electroforética del ADN; y se puede evaluar la condensación nuclear/cromatínica junto con la fragmentación del ADN por cualquier aumento en células hipodiploides. Preferiblemente, el anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica que induce apoptosis es uno que da lugar a una inducción aproximadamente 2 a 50 veces mayor, preferiblemente aproximadamente 5 a 50 veces mayor y más preferiblemente aproximadamente 10 a 50 veces mayor, de la unión de anexina en relación a una célula no tratada en un ensayo de unión de anexina.

"Funciones efectoras" de un anticuerpo se refiere a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o una región Fc de variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo y varían con el isotipo de anticuerpo. Como ejemplos de funciones efectoras de anticuerpos, se incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento; unión a receptores de Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación a menos de los receptores de la superficie celular (v.g., receptor de células B); y activación de células B.

"Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la que la Ig segregada unida a receptores Fc (FcR) presentes sobre ciertas células citotóxicas (v.g., células asesinas naturales ("Natural Killer" (NK)), neutrófilos y macrófagos) permite a estas células efectoras citotóxicas unirse específicamente a una célula diana portadora de antígeno y posteriormente matar a la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos "arman" a las células citotóxicas y son absolutamente necesarios para dicha muerte. Las células primarias para mediar en la ADCC, las células NK, expresan sólo Fc γ RIII, mientras que los monocitos expresan Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas está resumida en la Tabla 3, en la página 464, de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991). Para valorar la actividad ADCC de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en las Patentes EE.UU. N° 5.500.362 ó 5.821.337. Como células efectoras útiles para dichos ensayos, se incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células asesinas naturales (NK). Alternativa o adicionalmente, se puede valorar la actividad ADCC de la molécula de interés *in vivo*, v.g., en un modelo animal, tal como el divulgado en Clynes *et al.* (USA) 95: 652-656 (1998).

"Receptor Fc" o "FcR" describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Más aún, un FcR preferido es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma), e incluye receptores de las subclases Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII, incluyendo variantes alélicas y alternativamente formas ajustadas de estos receptores. Los receptores Fc γ RII incluyen Fc γ RIIA (un "receptor activador") y Fc γ RIIB (un "receptor inhibidor"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren primariamente en sus dominios citoplásmicos. El receptor activador Fc γ RIIA contiene una unidad de activación basada en tirosina inmunorreceptora (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor inhibidor Fc γ RIIB contiene una unidad de inhibición basada en tirosina inmunorreceptora (ITIM) en su dominio citoplásmico (véase la revisión M. in

Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15: 203-234 (1997)). Los FcR están revisados en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-492 (1991); Capel *et al.*, Immunomethods 4: 25-34 (1994); y de Haas *et al.*, J. Lab. Clin. Med. 126: 330-41 (1995). Otros FcR, incluyendo los que habrán de ser identificados en el futuro, quedan aquí amparados mediante el término "FcR". El término también incluye el receptor 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)).

Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. Preferiblemente, las células expresan al menos Fc γ RIII y realizan una función efectora ADCC. Como ejemplos de leucocitos humanos que median en la ADCC, se incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células asesinas naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos, prefiriéndose las PBMC y las células NK. Las células efectoras pueden ser aisladas de una fuente nativa, *v.g.*, de la sangre.

"Citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula diana en presencia de complemento. La activación de la ruta clásica del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a anticuerpos (de la subclase apropiada) que están unidos a su antígeno cognado. Para valorar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo CDC, *v.g.*, como se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, J. Immunol. Methods 202: 163 (1996).

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a, o describen, la condición fisiológica en mamíferos que normalmente se caracteriza por un crecimiento celular no regulado. Como ejemplos de cáncer, se incluyen, aunque sin limitación, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o neoplasias linfoides. Como ejemplos más particulares de tales cánceres, se incluyen el cáncer de células escamosas (*v.g.*, cáncer de células escamosas epitelial), el cáncer de pulmón, incluyendo el cáncer de pulmón de células pequeñas, el cáncer de pulmón de células no pequeñas, el adenocarcinoma del pulmón y el carcinoma escamoso del pulmón, el cáncer del peritoneo, el cáncer hepatocelular, el cáncer gástrico o de estómago, incluyendo el cáncer gastrointestinal, el cáncer pancreático, el glioblastoma, el cáncer cervical, el cáncer de ovarios, el cáncer de hígado, el cáncer de vejiga, el cáncer del tracto urinario, el hepatoma, el cáncer de mama, el cáncer de colon, el cáncer rectal, el cáncer colorrectal, el carcinoma endometrial o uterino, el carcinoma de glándulas salivares, el cáncer de riñón o renal, el cáncer de próstata, el cáncer vulvar, el cáncer de tiroides, el carcinoma hepático, el carcinoma anal, el carcinoma del pene, el melanoma, el mieloma múltiple y el linfoma de células B, el cáncer de cerebro, así como de cabeza y cuello, y las metástasis asociadas.

Los términos "trastorno proliferativo celular" y "trastorno proliferativo" se refieren a trastornos que se asocian a algún grado de proliferación celular anormal. En una realización, el trastorno proliferativo celular es el cáncer.

"Tumor", tal como se usa aquí, se refiere a todo crecimiento y proliferación de células neoplásicas, ya sean malignos o benignos, y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos.

Un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica que "induce muerte celular" es uno que hace que una célula viable se convierta en no viable. La célula es una que expresa un polipéptido TASK, preferiblemente una célula que sobreexpresa un polipéptido TASK en comparación con una célula normal del mismo tipo de tejido. Preferiblemente, la célula es una célula cancerosa, *v.g.*, una célula de mama, ovario, estómago, endometrio, glándula salivar, pulmón, riñón, colon, tiroides, páncreas o vejiga. Se puede determinar la muerte celular *in vitro* en ausencia de complemento y de células efectoras inmunes para distinguir la muerte celular inducida por citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) o por citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Así, se puede llevar a cabo el ensayo para la muerte celular usando suero inactivado por calor (es decir, en ausencia de complemento) y en ausencia de células efectoras inmunes. Para determinar si el anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica puede inducir muerte celular, se puede valorar la pérdida de integridad de las membranas, evaluada por la captación de yoduro de propidio (PI), azul tripán (véase Moore *et al.* Cytotechnology 17: 1-11 (1995)) o 7AAD, en relación a células no tratadas. Son anticuerpos, oligopéptidos u otras moléculas orgánicas inductores de muerte celular preferidos los que inducen la captación de PI en el ensayo de captación de PI en células BT474.

Una "célula que expresa TASK" es una célula que expresa un polipéptido TASK endógeno o transfectado. Un "cáncer que expresa TASK" es un cáncer que comprende células que sobreexpresan un polipéptido TASK. Un "cáncer que expresa TASK" eventualmente produce suficientes niveles de polipéptido TASK, de tal forma que un anticuerpo anti-TASK, oligopéptido u otra molécula orgánica puede unirse al mismo y tener un efecto terapéutico con respecto al cáncer. En otra realización, un "cáncer que expresa TASK" eventualmente produce suficientes niveles de polipéptido TASK, de tal forma que un anticuerpo anti-TASK, oligopéptido u otra molécula orgánica antagonista puede unirse al mismo y tener un efecto terapéutico con respecto al cáncer. En relación a esto último, el antagonista puede ser un oligonucleótido antisentido que reduzca, inhiba o prevenga la producción del polipéptido TASK por las células tumorales. Un cáncer que "sobreexpresa" un polipéptido TASK es uno que tiene niveles significativamente superiores de polipéptido TASK en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo tisular. Dicha sobreexpresión puede estar causada por amplificación génica o por una mayor transcripción o traducción. Se puede determinar la sobreexpresión del polipéptido TASK en un ensayo diagnóstico o pronóstico evaluando los niveles aumentados de la proteína TASK presente en la célula (*v.g.*, mediante un ensayo de inmunohistoquímica usando

anticuerpos anti-TASK preparados contra un polipéptido TASK aislado, que pueden ser preparados usando tecnología de ADN recombinante a partir de un ácido nucleico aislado codificante del polipéptido TASK, análisis FACS, etc.). Alternativa o adicionalmente, se pueden medir los niveles de ácido nucleico codificante del polipéptido TASK o de ARNm en la célula, *v.g.*, por hibridación fluorescente *in situ* usando una sonda basada en ácido nucleico correspondiente a un ácido nucleico codificante de TASK o su complementario (FISH; véase WO98/45479, publicada en octubre de 1998), Southern blotting, Northern blotting o técnicas de reacción en cadena de polimerasa (PCR), tales como la PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR). Aparte de los ensayos anteriores, el experto en la técnica dispone de diversos ensayos *in vivo*. Por ejemplo, se pueden exponer las células en el organismo del paciente a un anticuerpo que está eventualmente marcado con un marcaje detectable, *v.g.*, un isótopo radiactivo, y se puede evaluar la unión del anticuerpo a las células en el paciente, *v.g.*, por escáner externo de la radiactividad o analizando una biopsia tomada de un paciente previamente expuesto al anticuerpo.

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

La palabra "marcaje", cuando se usa aquí, se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente al anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica para generar un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica "marcados". El marcaje puede ser detectable por sí mismo (*v.g.*, marcajes radioisotópicos o marcajes fluorescentes) o, en el caso de un marcaje enzimático, puede catalizar una alteración química de un compuesto o composición sustrato que es detectable.

El término "agente citotóxico", tal como se utiliza aquí, se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de las células y/o causa destrucción de las células. El término pretende incluir isótopos radiactivos (*v.g.*, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, *v.g.*, metotrexato, adriamicina, alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorrubicina u otros agentes intercalantes, enzimas y sus fragmentos, tales como enzimas nucleolíticas, antibióticos y toxinas, tales como toxinas de pequeña molécula o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo sus fragmentos y/o variantes, y los diversos agentes antitumorales o anticancerosos que se divulgan más adelante. A continuación, se describen otros agentes citotóxicos. Un agente tumoricida causa destrucción de las células tumorales.

Un "agente inhibidor del crecimiento", cuando se usa aquí, se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente una célula cancerosa que expresa TASK, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Por lo tanto, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduzca significativamente el porcentaje de células que expresan TASK en la fase S. Como ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento, se incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un lugar distinto de la fase S), tales como agentes que inducen la detención de G1 y la detención de la fase M. Como bloqueadores clásicos de la fase M, se incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), los taxanos y los inhibidores de la topoisomerasa II, tales como doxorubicina, epirubicina, daunorrubicina, etopósido y bleomicina. Los agentes que detienen G1 también llegan a provocar detención de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes del ADN, tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatina, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Se puede encontrar más información en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn e Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs", de Murakami *et al.* (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente en la p. 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos anticancerosos derivados ambos 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 los microtúbulos a partir de dímeros de tubulina y estabilizan los microtúbulos evitando la despolimerización, lo que da como resultado la inhibición de la mitosis en las células.

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

El término "citoquina" es un término genérico para proteínas liberadas por una población celular que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Son ejemplos de dichas citoquinas las linfoquinas, las monoquinas y las hormonas polipeptídicas tradicionales. Se incluyen entre las citoquinas la hormona del crecimiento, tal como la hormona del crecimiento humana, la N-metionil-hormona del crecimiento humana y la hormona del crecimiento bovina; la hormona paratiroidea; la tiroxina; la insulina; la proinsulina; la relaxina; la prorrelaxina; hormonas glicoproteicas, tales como la hormona estimulante del foliculo (FSH), la hormona estimulante del tiroides (TSH) y la hormona luteinizante (LH); el factor del crecimiento hepático; el factor de crecimiento fibroblástico; la prolactina; el

5 lactógeno placentario; el factor de necrosis tumoral α y β ; la sustancia inhibidora mulleriana; el péptido asociado a gonadotropina de ratón; la inhibina; la activina; el factor de crecimiento endotelial vascular; la integrina; la trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso, tales como el NGF-p; el factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento transformante (TGF), tales como TGF- α y TGF- β ; factores I y II de crecimiento de tipo
 10 insulina; la eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores; interferones, tales como interferón α , β y γ ; factores estimulantes de colonias (CSF), tales como el CSF de macrófagos (M-CSF), el CSF de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y el CSF de granulocitos (G-CSF); interleucinas (IL), tales como la IL-1, la IL-1a, la IL-2, la IL-3, la IL-4, la IL-5, la IL-6, la IL-7, la IL-8, la IL-9, la IL-11 y la IL-12; un factor de necrosis tumoral, tal como el TNF- α o el TNF- β ; y otros factores polipeptídicos, incluyendo el LIF y el ligando kit (KL). Tal como se utiliza aquí, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa.

15 El término "prospecto" es utilizado para referirse a las instrucciones por regla general incluidas en envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, el uso, la dosificación, la administración, las contraindicaciones y/o las advertencias concernientes al uso de dichos productos terapéuticos.

Tabla 1

```

/*
*
* C-C aumentado de 12 a 15
* Z es la media de EO
* B es la media de ND
* el emparejamiento con la parada es _M; parada-parada = 0; emparejamiento J (joker) = 0
*/
# definir _M -8 /* valor de un emparejamiento con una parada */

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

Tabla 1 (cont.)

```

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

#define MAXJMP 16 /*saltos máx en un diag */
#define MAXGAP 24 /*no continuar penalizando huecos mayores que éste */
#define JMPS 1024 /*saltos máx en una ruta */
#define MX 4 /*guardar si hay al menos bases MX-1 desde el último salto */

#define DMAT 3 /*valor de bases emparejadas */
#define DMIS 0 /*penalización para bases mal emparejadas */
#define DINS0 8 /*penalización para un hueco */
#define DINS1 1 /*penalización por base */
#define PINS0 8 /*penalización para un hueco */
#define PINS1 4 /*penalización por residuo */

salto estruct {
    corto corto n[MAXJMP]; /* tamaño de salto (neg para retraso) */
    corto no firmado x[MAXJMP]; /* nº bases de salto en sec x */
}; /* limita sec a 2^16-1 */

Struct diag {
    int puntuación; /* puntuación en el último salto */
    largo offset; /* offset de bloque prev */
    corto ijmp; /* índice saltos actuales */
    struct salto jp; /* lista de saltos */
};

ruta struct {
    int spc; /* número de espacios destacados */
    corto n[JMPS]; /* tamaño de salto (hueco) */
    int x[JMPS]; /* loc de salto (último elem antes del hueco) */
};

car *archivo o; /* nombre del archivo de salida */
car *nombrex[2]; /* nombres de sec: obtener sec() */
car *prog; /* nombre prog para err msgs */
car *seqx[2]; /* sess: obtener secs() */
int dmax; /* mejor diag: nw() */
int dmax0; /*diag final */
int adn; /*establecer si adn: principal() */
int huecos finales; /* establecer si se penalizan huecos finales */
int hueox, huecoy; /* huecos totales en las sec */
int len0, len1; /*sec lens*/
int nhuecox, nhuecoy ; /* tamaño total de los huecos */
int smax; /* puntuación máxima: nw() */
int *xbm; /*bitmap para emparejamiento */
largo offset; /* offset actual en archivo de saltos */
struct diag *dx; /*mantiene diagonales */
struct ruta pp[2]; /*mantiene ruta para secs */

car *calloc(), *malloc(), *indice(), *strcpy();
car *obtener sec(), *g_calloc();

```

Tabla 1 (cont.)

```

/* Programa de alineación de Needleman-Wunsch
*
* uso: prog archivo1 archivo2
* donde el archivo1 y el archivo2 son dos secuencias de adn o dos secuencias de proteínas
* Las secuencias pueden estar en mayúscula o minúscula y pueden contener ambigüedad
* Se ignora cualquier línea que comience con ";", ">" o "<"
* La máx longitud de archivo es 65.535 (limitada por x corto no firmado en la estruct del salto
* Se asume que una secuenica con 1/3 o más de sus elementos ACGTU es ADN
* La salida está en el archivo "align.out"
*
* El programa puede crear un archivo tmp en/tmp para conservar info sobre retrorastreo
* Versión original desarrollada bajo BSD 4.3 en un vax 8650
*/
# incluir "nw.h"
# incluir "day.h"

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

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

principal (ac, av)
int      ac;
char     *av[];

{
prog = av[0];
if (ac != 3) {
fprintf(stderr, "uso: % archivo1 archivo2\n", prog);
fprintf(stderr, "donde archivo1 y archivo2 son dos secuencias de adn o dos de proteína.\b");
fprintf(stderr, "Las secuencias pueden estar en mayúscula o en minúscula\n");
fprintf(stderr, "Cualquier línea que comience con "; o "<" es ignorada\n");
fprintf(stderr, "La salida está en el archivo \"align.out\"\n");
}
salida(1);
namex[0] = av[1];
namex[1] = av[2];
seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
xbm = (dna)? _dbval : _pbval;

huecos finales = 0; /* 1 penalizar huecos finales */
archivo o = "align.out" /* archivo de salida */

nw(); /* llenar la matriz, conseguir los posibles saltos */
leer saltos(); /* conseguir los saltos reales */
imprimir(); /* imprimir stats, alineación */

limpiar(0); /*desenlazar cualquier archivo tmp */
}

```

principal

Tabla 1 (cont.)

```

/* Hacer la alineación, devolver la mejor puntuación: adn
* principal(): valores en Fitch y Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
* pro: valores PAM 250
* Cuando las puntuaciones son iguales, preferimos malos emparejamientos a cualquier hueco, preferimos
* un nuevo hueco a prolongar un hueco en curso y preferimos un hueco en seqx
* a un hueco en seq y.
*/

```

```

nw()
{
    char      *px, *py;          /* seqs and ptrs */
    int       *ndely, *dely;     /* keep track of dely */
    int       ndelx, delx;      /* keep track of delx */
    int       *tmp;             /* for swapping row0, row1 */
    int       mis;              /* score for each type */
    int       ins0, ins1; /* insertion penalties */
    registro  id;                /* diagonal index */
    registro  ij;                /* jmp index */
    registro  *col0, *col1;      /* score for curr, last row */
    registro  xx, yy;           /* index into seqs */

    dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));

    ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
    dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
    col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
    col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
    ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
    ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;

    smax = -10000;
    if (endgaps) {
        for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
            col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
            ndely[yy] = yy;
        }
        col0[0] = 0; /* Waterman Bull Math Biol 84 */
    }
    else
        for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
            dely[yy] = -ins0;

    /* rellenar matriz de emparejamiento
    */
    for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
        /* initialize first entry in col
        */
        if (endgaps) {
            if (xx == 1)
                col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
            else
                col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
            ndelx = xx;
        }
        else {
            col1[0] = 0;
            delx = -ins0;
            ndelx = 0;
        }
    }
}

```

Tabla 1 (cont.)

...nw

```

para (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
  mis = col0[yy-1];
  si (adn)
    mis += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
  si no
    mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];

  /* update penalty for del in x seq;
   * favor new del over ongong del
   * ignore MAXGAP if weighting endgaps
   */
  si (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
    si (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
      dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
      ndely[yy] = 1;
    } si no {
      dely[yy] -= ins1;
      ndely[yy]++;
    }
  } si no {
    si (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
      dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
      ndely[yy] = 1;
    } si no
      ndely[yy]++;
  }

  /* update penalty for del in y seq;
   * favor new del over ongong del
   */
  si (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
    si (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
      delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
      ndelx = 1;
    } si no {
      delx -= ins1;
      ndelx++;
    }
  } si no {
    si (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
      delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
      ndelx = 1;
    } si no
      ndelx++;
  }

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

```

Tabla 1 (cont.)

...nw

```

id = xx - yy + len1 - 1;
si (mis >= delx && mis >= dely[yy])
    coll[yy] = mis;
si no, si (delx >= dely[yy]) {
    coll[yy] = delx;
    ij = dx[id].ijmp;
    if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINSO)) {
        dx[id].ijmp++;
        si (++ij >= MAXJMP) {
            writejumps(id);
            ij = dx[id].ijmp = 0;
            dx[id].offset = offset;
            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
        }
    }
    dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
    dx[id].jp.x[ij] = xx;
    dx[id].score = delx;
}
si no, }
    coll[yy] = dely[yy];
    ij = dx[id].ijmp;
si (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
    && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINSO)) {
    dx[id].ijmp++;
    si (++ij >= MAXJMP) {
        writejumps(id);
        ij = dx[id].ijmp = 0;
        dx[id].offset = offset;
        offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
    }
}
    dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
    dx[id].jp.x[ij] = xx;
    dx[id].score = dely[yy];
}
si (xx == len0 && yy < len1) {
    /* last col
    */
    si (endgaps)
        coll[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
    si (coll[yy] > smax) {
        smax = coll[yy];
        dmax = id;
    }
}
}
si [(endgaps && xx < len0)
    coll[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
si (coll[yy-1] > smax) {
    smax = coll[yy-1];
    dmax = id;
}
}
tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;
}
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
(void) free((char *)col1);
}

```

Tabla 1 (cont.)

```

/*
 *
 * imprimir() - sólo rutina visible fuera de este módulo
 *
 * Estático:
 * getmat() - rastrear la mejor ruta, contar emparejamientos: imprimir()
 * pr_align() - imprimir la alineación descrita en la matriz p : imprimir()
 * volcado de bloque() - volcar un bloque de líneas con números, asteriscos: pr_align()
 * nums() - sacar una línea de números: volcado de bloque()
 * poner línea() - sacar una línea (nombre, [num], sec. [num]): volcado de bloque()
 * asteriscos() - poner una línea de asteriscos: volcado de bloque()
 * quitar nombre() - quitar cualquier ruta y prefijo de un nombre de sec
 */

#include "nw.h"

#define SPC 3
#define P_LINE 256 /* línea de salida máxima */
#define P_SPC 3 /* espacio entre nombre o núm y sec */

extern _day[26][26];
int olen; /* establecer longitud de línea de salida */
ARCHIVO *fx; /* archivo de salida */

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

    si ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, ofile);
        cleanup(1);
    }
    fprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
    fprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
    olen = 60;
    lx = len0;
    ly = len1;
    firstgap = lastgap = 0;
    si (dmax < len1 - 1) { /* leading gap in x */
        pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
        ly -= pp[0].spc;
    }
    si no, si (dmax > len1 - 1) { /* leading gap in y */
        pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
        lx -= pp[1].spc;
    }
    si (dmax0 < len0 - 1) { /* trailing gap in x */
        lastgap = len0 - dmax0 - 1;
        lx -= lastgap;
    }
    si no, si (dmax0 > len0 - 1) { /* trailing gap in y */
        lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= lastgap;
    }
    getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
    pr_align0;
}

```

imprimir

Tabla 1 (cont.)

```

/*
* retrorastrear la mejor ruta, contar emparejamientos
*/
estático
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)
int lx, ly; /* "core" (minus endgaps) */
int firstgap, lastgap; /* leading trailing overlap */

{
    int nm, i0, i1, siz0, siz1;
    char out[32];
    doble pct;
    registro n0, n1;
    car registro *p0, *p1;

    /* obtener emparejamientos totales, puntuar
    */
    i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
    p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
    p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
    n0 = pp[1].spc + 1;
    n1 = pp[0].spc + 1;

    nm = 0;
    while ( *p0 && *p1 ) {
        si (siz0) {
            p1++;
            n1++;
            siz0--;
        }
        si no, si (siz1) {
            p0++;
            n0++;
            siz1--;
        }
        si no {
            si ( (xbrn[*p0-'A']&xbrn[*p1-'A'])
                nm++;
            si ( (n0++ == pp[0].x[i0])
                siz0 = pp[0].n[i0++];
            si ( (n1++ == pp[1].x[i1])
                siz1 = pp[1].n[i1++];
            p0++;
            p1++;
        }
    }

    /* homología pct:
    * si se penalizan los huecos finales, la base es la sec más corta
    * si no, quitar salientes y tomar núcleo más corto
    */
    si (huecos finales)
        lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
    si no
        lx = (lx < ly)? lx : ly;
    pct = 100.*((double)nm)/((double)lx);
    fprintf(fx, "\n");
    fprintf(fx, "< %d match %s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
        nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);
}

```

getmat

Tabla 1 (cont.)

```

fprintf(fx, "< huecos en la primera secuencia: %d", gapx);
si (gapx) {
    (void) sprintf(outr, "(%d %s%s)",
        ngapx, (dna)? "base": "residue", (ngapx == 1)? "" : "s");
    fprintf(fx, "%s", outr);

fprintf(fx, ", huecos en la segunda secuencia: %d", gapy);
if (gapy) {
    (void) sprintf(outr, "(%d %s%s)",
        ngapy, (dna)? "base": "residue", (ngapy == 1)? "" : "s");
    fprintf(fx, "%s", outr);
}
si (adn)
    fprintf(fx,
        "\n< score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per base)\n",
        smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
si no
    fprintf(fx,
        "\n< score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
        smax, PINS0, PINS1);
si (huecos finales)
    fprintf(fx,
        "< endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
        firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
        lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
si no
    fprintf(fx, "< endgaps not penalized\n");
}

estático nm; /* emparejamientos en núcleo - para comprobar */
estático lmax; /* longitudes de nombres de archivos desprotegidos */
estático ij[2]; /* índice de saltos para una ruta */
estático nc[2]; /* número al inicio de la línea actual */
estático ni[2]; /* número de elem actual - para formación de huecos */
estático siz[2]; /* ptr para elemento actual */
char estático *ps[2]; /* ptr para la siguiente ranura de char de salida */
char estático *po[2]; /* línea de salida */
char estático out[2][P_LINE]; /* establecer por asteriscos() */
char estático star[P_LINE];

/*
 * imprimir alineación de lo descrito en ruta estruct pp
 */
estático
pr_align()
{
    int nn; /* recuento de car*/
    int más;
    registro i;
    para (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
        nn = stripname(name[i]);
        si (nn > lmax)
            lmax = nn;
        nc[i] = 1;
        ni[i] = 1;
        siz[i] = ij[i] = 0;
        ps[i] = seqx[i];
        po[i] = out[i];
    }
}

```

...getmat

pr_align

Tabla 1 (cont.)

```

para (nn = nm = 0, more = 1; more;) {
    para (i = more = 0; i < 2; i++) {
        /*
         * ¿tenemos más de esta secuencia?
         */
        si (!*ps[i])
            continuar;

        más ++;

        si (pp[i].spc) { /* espacio líder */
            *po[i]++ = ' ';
            pp[i].spc--;
        }
        si no, si (siz[i]) { /* in a gap */
            *po[i]++ = '-';
            siz[i]--;
        }
        si no { /* ponemos un elemento de sec
            */
            *no[i] = *ps[i];
            si (islower(*ps[i]))
                *ps[i] = toupper(*ps[i]);
            po[i]++;
            ps[i]++;
            /*
             * ¿estamos en el siguiente hueco para esta sec?
             */
            si (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
                /*
                 * necesitamos fusionar todos los huecos
                 * en esta localización
                 */
                siz[i] = pp[i].n[ij[i]++];
                mientras (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                    siz[i] += pp[i].n[ij[i]++];
            }
            ni[i]++;
        }
    }
    si (++nn == olen || !more && nn) {
        dumpblock();
        para (i = 0; i < 2; i++)
            po[i] = out[i];
        nn = 0;
    }
}

/*
 * volcar un bloque de líneas, incluyendo números, asteriscos: pr_align()
 */
estático
volcar bloques()
{
    registro i;

    para (i = 0; i < 2; i++)
        *po[i]-- = '\0';
}

```

...pr_align

volcar bloques()

Tabla 1 (cont.)

...volcar bloques()

```

(void) putc('\n', fx);
para (i = 0; i < 2; i++) {
    si (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
        si (i == 0)
            nums(i);
        si (i == 0 && *out[1])
            stars0;
        putline(i);
        si (i == 0 && *out[1])
            fprintf(fx, star);
        si (i == 1)
            nums(i);
    }
}

```

/* sacar una línea de números: dumblock()
*/
estático

```

nums(ix)
int ix; /* index in out[] holding seq line */
{
    car nline[P_LINE];
    registro i, j;
    car registro *pn, *px, *py;

    para (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
        *pn = ' ';
    para (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
        si (*py == ' ' || *py == '-')
            *pn = ' ';
        si no {
            si (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                j = (i < 0)? -i : i;
                para (px = pn; j /= 10, px--)
                    *px = j%10 + '0';
                si (i < 0)
                    *px = '-';
            }
            si no
                *pn = ' ';
            i++;
        }
    }
    *pn = '\0';
    nc[ix] = i;
    para (pn = nline; *pn; pn++)
        (void) putc(*pn, fx);
    (void) putc('\n', fx);
}

```

nums

/* sacar una línea (nombre, [núm], sec, [núm]): dumblock()
*/
estático

```

putline(ix)
int ix;
{

```

poner línea

Tabla 1 (cont.)

...poner línea

```

int          i;
car registro *px;

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

/* éstos cuentan a partir de 1:
 *ni es el elemento actual (a partir de 1)
 *nc es el número al inicio de la línea actual
 */
para (px = out[ix]; *px; px++)
    (void) putc(*px&0x7F, fx);
(void) putc('\n', fx);
}

```

```

/*
 * poner una línea de asteriscos (secs siempre en out[0], out[1]): dumpblock()
 */

```

estático
asteriscos()

asteriscos

```

{
    int          i;
    car registro *p0, *p1, cx, *px;

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

    para (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
        if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {
            si (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A']) {
                cx = '*';
                nm++;
            }
            si no, si (ldna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
                cx = '.';
            si no
                cx = ' ';
        }
        si no
            cx = ' ';
        *px++ = cx;
    }
    *px++ = '\n';
    *px = '\0';
}

```

Tabla 1 (cont.)

```

/*
 * quitar ruta o prefijo de pn, return len: pr_align()
 */
estático
stripname(pn)
    car *pn; /* nombre de archivo (puede ser ruta) */
{
    car registro *px, *py;

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

```

stripname

Tabla 1 (cont.)

```

/*
 * limpiar() - limpiar cualquier archivo tmp
 * obtener sec() - leer sec, establecer adn, long, long máx
 * g_calloc() - calloc() con registro de errores
 * leer saltos() - obtener los saltos buenos, a partir de archivo tmp si es necesario
 * escribir saltos() - escribir una matriz rellena de saltos a un archivo tmp: nw()
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

car *jname = "/tmp/homgXXXXXX"; /* archivo tmp para saltos */
ARCHIVO *fj;

int cleanup(); /* limpiar archivo tmp */
long lseek();

/*
 * eliminar cualquier archivo tmp si ampliamos
 */
limpieza(l) /* limpiar
{
    int i;
    si (fj)
        (void) unlink(jname);
        exit(i);
}

/*
 * leer, devolver ptr a sec, establecer adn, long, long máx
 * saltar líneas que comienzan con ";", "<" o ">"
 * sec en mayúsculas o minúsculas
 */
car *
obtener sec (archivo, long) /* obtener sec
{
    car *archivo; /* nombre de archivo */
    int *long; /* long sec */

    car line[1024], *pseq;
    car registro *px, *py;
    int natgc, tlen;
    ARCHIVO *fp;

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

```

Tabla 1 (cont.)

```

py = pseq + 4;
*len = tlen;
rewind(fp);

mientras (fgets(line, 1024, fp)) {
    si (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
        continuar;
    para (px = line; *px != '\n'; px++) {
        si (isupper(*px))
            *py++ = *px;
        si no si (islower(*px))
            *py++ = toupper(*px);
        si (index("ATGCU", *(py-1)))
            natgc++;
    }
    *py++ = '\0';
    *py = '\0';
    (void) fclose(fp);
    dna = natgc > (tlen/3);
    return(pseq+4);
}

car *
g_malloc(msg, nx, sz)
char *msg; /* programa, llamando a rutina */
int nx, sz; /* número y tamaño de elementos */
{
    char *px, *calloc;

    si ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
        si (*msg) {
            fprintf(stderr, "%s: g_malloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
            exit(1);
        }
    }
    return(px);
}

/*
 * obtener saltos finales de archivo dx o tmp, establecer pp , reajustar dmax: principal()
 */

leer saltos()
{
    int fd = -1;
    int siz, i0, i1;
    registro i, j, xx;

    si (f) {
        (void) fclose(f);
        si ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
            fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
            cleanup(1);
        }
    }
    para (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) {
        mientras (1) {
            para (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)

```

...obtener sec

g_malloc

leer saltos

Tabla 1 (cont.)

...leer saltos

```

si (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
    (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
    (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
    (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
    dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;
}
si no
    break;
}
si (i >= JMPS) {
    fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
    cleanup(1);
}
si (j >= 0) {
    siz = dx[dmax].jp.n[j];
    xx = dx[dmax].jp.x[j];
    dmax += siz;
    si (siz < 0) { /* hueco en la segunda sec */
        pp[1].n[i1] = -siz;
        xx += siz;
        /* id = xx - yy + len1 - 1
        */
        pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
        gapy++;
        ngapy -= siz;
        siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
        i1++;
    }
    si no, si (siz > 0) { /* gap in first seq */
        pp[0].n[i0] = siz;
        pp[0].x[i0] = xx;
        gapx++;
        ngapx += siz;
        /* ignore MAXGAP when doing endgaps */
        siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
        i0++;
    }
}
si no
    break;
}
/* revertir el orden de saltos
*/
para (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
    i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
    i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
}
para (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
    i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
    i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
}
si (fd >= 0)
    (void) close(fd);
si f (fj) {
    (void) unlink(jname);
    fj = 0;
    offset = 0;
}
}

```

Tabla 1 (cont.)

```

/*
 * escribir un offset estruct de saltos relleno del anterior (de haberlo): nw()
 */
escribir saltos (ix)
                                escribir saltos
    int ix;
    {
        car *mktemp();
        si (!fj) {
            si (mktemp(jname) < 0) {
                fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
                cleanup(1);
            }
            si ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
                fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
                exit(1);
            }
        }
        (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
        (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
    }
}

```

Tabla 2

TASK XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX (Longitud = 15 aminoácidos)
 Proteína de comparación XXXXXYYYYYYYYY (Longitud = 12 aminoácidos)
 % de identidad de secuencia de aminoácidos = (el número de residuos de aminoácidos que se corresponden de manera idéntica entre las dos secuencias polipeptídicas, según se determina por ALIGN-2) dividido por (el número total de residuos de aminoácidos del polipéptido TASK) = 5 dividido por 15 = 33,3 %

5

Tabla 3

TASK XXXXXXXXXXXX (Longitud = 10 aminoácidos)
 Proteína de comparación XXXXXYYYYYYYYZZYZ (Longitud = 15 aminoácidos)
 % de identidad de secuencia de aminoácidos = (el número de residuos de aminoácidos que se corresponden de manera idéntica entre las dos secuencias polipeptídicas, según se determina por ALIGN-2) dividido por (el número total de residuos de aminoácidos del polipéptido TASK) = 5 dividido por 10 = 50 %

10

Tabla 4

ADN TASK NNNNNNNNNNNNNN (Longitud = 14 nucleótidos)
 ADN de comparación NNNNNNLLLLLLLLLL (Longitud = 16 nucleótidos)
 % de identidad de secuencia de ácido nucleico = (el número de nucleótidos que se corresponden de manera idéntica entre las dos secuencias de ácido nucleico, según se determina por ALIGN-2) dividido por (el número total de nucleótidos de la secuencia de ácido nucleico del ADN TASK) = 6 dividido por 14 = 42,9 %

Tabla 5

ADN TASK NNNNNNNNNNNN (Longitud = 12 nucleótidos)
 ADN de comparación NNNNLLLVV (Longitud = 9 nucleótidos)
 % de identidad de secuencia de ácido nucleico = (el número de nucleótidos que se corresponden de manera idéntica entre las dos secuencias de ácido nucleico, según se determina por ALIGN-2) dividido por (el número total de nucleótidos de la secuencia de ácido nucleico del ADN TASK) = 4 dividido por 12 = 33,3 %

15 II. Composiciones y métodos de la invención

A. Anticuerpos anti-TASK

20 La presente invención se refiere a anticuerpos anti-TASK que pueden encontrar una utilización aquí como agentes terapéuticos y/o diagnósticos. Como ejemplos de anticuerpos, se incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, biespecíficos y heteroconjugados.

1. Anticuerpos policlonales

25 Los anticuerpos policlonales son preferiblemente producidos en animales por múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno relevante

(especialmente cuando se usan péptidos sintéticos) a una proteína que sea inmunogénica en la especie que se ha de inmunizar. Por ejemplo, se puede conjugar el antígeno a hemocianina de lapa californiana (KLH), seroalbúmina, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja, usando un agente bifuncional o derivatizante, *v.g.*, éster maleimidobenzoilsulfosuccinimida (conjugación a través de los residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de los residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, donde R y R^1 son grupos alquilo diferentes.

Se inmuniza a los animales contra el antígeno, conjugados inmunogénicos o derivados combinando, *v.g.*, 100 μg o 5 μg de la proteína o del conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución intradérmicamente en múltiples sitios. Un mes después, se refuerza a los animales con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o de conjugado en adyuvante completo de Freund por inyección subcutánea en múltiples sitios. De 7 a 14 días después, se sangra a los animales y se estudia el suero en cuanto al título de anticuerpos. Se refuerza a los animales hasta alcanzar las mesetas de los títulos. También se pueden preparar los conjugados en cultivo de células recombinantes como fusiones de proteínas. Además, se usan adecuadamente agentes agregantes, tales como alumbre, para aumentar la respuesta inmune.

2. Anticuerpos monoclonales

Se pueden producir anticuerpos monoclonales usando el método del hibridoma, descrito por primera vez por Kohler *et al.*, *Nature*, 256: 495 (1975), o se pueden producir por métodos de ADN recombinante (Patente EE.UU. N° 4.816.567).

En el método del hibridoma, se inmuniza a un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster, como se ha descrito anteriormente para provocar la formación de linfocitos que producen, o son capaces de producir, anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada para la inmunización. Alternativamente, se puede inmunizar a los linfocitos *in vitro*. Tras la inmunización, se aíslan los linfocitos y se fusionan luego con una línea celular de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)).

Se siembran y cultivan las células de hibridoma así preparadas en un medio de cultivo adecuado, cuyo medio preferiblemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas (a las que también se hace referencia como compañeras de fusión). Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo selectivo para los hibridomas incluirá normalmente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), cuyas sustancias previenen el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Son células de mieloma compañeras de fusión preferidas las que se fusionan de manera eficaz, soportan la producción estable a alto nivel de anticuerpo por las células productoras de anticuerpo seleccionadas y son sensibles a un medio selectivo que selecciona contra las células parentales no fusionadas. Son líneas celulares de mieloma preferidas las líneas de mieloma murinas, tales como las derivadas de tumores murinos MOPC-21 y MPC-11, disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, EE.UU., y SP-2 y derivadas, *v.g.*, células X63-Ag8-653, disponibles en la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, EE.UU. También se han descrito líneas celulares de mieloma humanas y de heteromieloma murinas-humanas para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984), y Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Se estudia el medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma en cuanto a la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, se determina la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

Se puede determinar la afinidad de unión del anticuerpo monoclonal, por ejemplo, mediante el análisis de Scatchard descrito en Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980).

Una vez identificadas las células de hibridoma que producen anticuerpos con la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, se pueden subclonar los clones por procedimientos de dilución limitante y cultivarlos por métodos estándar (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)). Como medios de cultivo adecuados para este fin, se incluyen, por ejemplo, el medio D-MEM o el RPMI-1640. Además, se pueden cultivar las células de hibridoma *in vivo* como tumores ascíticos en un animal, *v.g.*, por inyección i.p. de las células en ratones.

Los anticuerpos monoclonales segregados por los subclones son adecuadamente separados del medio de cultivo, del líquido ascítico o del suero por procedimientos convencionales de purificación de anticuerpos, tales como, por ejemplo, cromatografía de afinidad (*v.g.*, usando proteína A o proteína G-Sepharose) o cromatografía de intercambio iónico, cromatografía en hidroxipatito, electroforesis en gel, diálisis, etc.

El ADN codificante de los anticuerpos monoclonales es fácilmente aislado y secuenciado usando procedimientos convencionales (*v.g.*, empleando sondas oligonucleotídicas capaces de unirse específicamente a genes codificantes de las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, se puede poner el ADN en vectores de expresión, que son entonces transfectados en células huésped, tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de Ovario de Hámster Chino (CHO) o células de mieloma que de otro modo no producen proteína de anticuerpo, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Como artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN codificante del anticuerpo, se incluyen Skerra *et al.*, *Curr. Opin. Immunol.*, 5: 256-262 (1993), y Plücker, *Immunol. Revs.* 130: 151-188 (1992).

En otra realización, se pueden aislar anticuerpos o fragmentos de anticuerpos monoclonales de librerías de fagos de anticuerpos generadas usando las técnicas descritas en McCafferty *et al.*, *Nature*, 348: 552-554 (1990). Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991), y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, usando librerías de fagos. Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (rango nM) por mezcla de cadenas (Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992)), así como la infección combinatoria y la recombinación *in vivo* como estrategia para la construcción de librerías muy amplias de fagos (Waterhouse *et al.*, *Nuc. Acids. Res.* 21: 2265-2266 (1993)). Por lo tanto, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de hibridomas de anticuerpos monoclonales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

El ADN que codifica el anticuerpo puede ser modificado para producir polipéptidos de anticuerpos quiméricos o de fusión, por ejemplo, substituyendo con las secuencias de los dominios constantes de las cadenas pesadas y de las cadenas ligeras humanas (C_H y C_L) las secuencias murinas homólogas (Patente EE.UU. N° 4.816.567 y Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851 (1984)), o fusionando la secuencia codificante de la inmunoglobulina con toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido no inmunoglobulínico (polipéptido heterólogo). Las secuencias polipeptídicas no inmunoglobulínicas pueden substituir a los dominios constantes de un anticuerpo, o substituyen a los dominios variables de un sitio de combinación con antígeno de un anticuerpo, para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación con antígeno que tiene especificidad para un antígeno y otro sitio de combinación con antígeno que tiene especificidad para un antígeno diferente.

3. Anticuerpos humanos y humanizados

Los anticuerpos anti-TASK aquí descritos pueden además incluir anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (*v.g.*, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', $F(ab')_2$ u otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor están substituidos por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata o conejo, que tiene la especificidad, la afinidad y la capacidad deseadas. En algunos casos, residuos de marco Fv de la inmunoglobulina humana están substituidos por residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden incluir residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en la CDR o las secuencias de marco importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá substancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en donde todas o substancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o substancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado comprenderá también de manera óptima al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana [Jones *et al.*, *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332: 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992)].

Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. En general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en el mismo procedentes de una fuente que no es humana. Se hace con frecuencia referencia a estos residuos de aminoácidos no humanos como residuos "de importación", los cuales son normalmente tomados de un dominio variable "de importación". Se puede llevar a cabo esencialmente la humanización siguiendo el método de Winter y colaboradores [Jones *et al.*, *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239: 1534-1536 (1988)], substituyendo con CDR o secuencias CDR de roedores las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente EE.UU. N° 4.816.567), donde se ha substituido substancialmente menos de un dominio variable humano intacto por la correspondiente secuencia de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR están substituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para uso en la producción de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad y la respuesta HAMA (anticuerpo humano antiratón) cuando el anticuerpo está concebido para uso terapéutico humano. Según el así llamado método de

"mejor ajuste", se hace un cribado de la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor frente a toda la librería de secuencias de dominios variables humanos conocidas. Se identifica la secuencia del dominio V humano más próxima a la del roedor y se acepta la región de marco (FR) humana que se encuentra dentro de ella para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia *et al.*, J. Mol. Biol., 196: 901 (1987)). Otro método utiliza una región de marco particular derivada de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. Se puede usar el mismo marco para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4285 (1992); Presta *et al.*, J. Immunol. 151: 2623 (1993)).

Es además importante que los anticuerpos estén humanizados con retención de una alta afinidad de unión por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, según un método preferido, se preparan los anticuerpos humanizados mediante un procedimiento de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulinas tridimensionales están comúnmente disponibles y los expertos en la técnica están familiarizados con ellos. Se dispone de programas informáticos que ilustran y muestran las probables estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas exposiciones permite el análisis del papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De este modo, se pueden seleccionar y combinar residuos FR de las secuencias receptoras y de importación de forma que se consiga la característica deseada del anticuerpo, tal como una mayor afinidad por el/los antígeno(s) diana. En general, los residuos de las regiones hipervariables están directa y más substancialmente implicados en la influencia sobre la unión a antígeno.

Se contemplan diversas formas de un anticuerpo anti-TASK humanizado. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como un Fab, que se conjuga eventualmente con uno o más agentes citotóxicos con objeto de generar un inmunoconjugado. Alternativamente, el anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo IgG1 intacto.

Como alternativa a la humanización, se pueden generar anticuerpos humanos. Por ejemplo, es ahora posible producir animales transgénicos (*v.g.*, ratones) que son capaces, tras inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulinas endógenas. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de las cadenas pesadas de los anticuerpos (J_H) en ratones quiméricos y mutantes de línea germinal da lugar a la completa inhibición de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de la matriz de genes de inmunoglobulinas de la línea germinal humana a dichos ratones mutantes de línea germinal dará lugar a la producción de anticuerpos humanos tras desafío antigénico. Véanse, *v.g.*, Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, Nature, 362: 255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, Year in Immuno. 7: 33 (1993); Patentes EE.UU. Nº 5.545.806, 5.569.825, 5.591.669 (todas de GenPharm) y 5.545.807, y WO 97/17852.

Alternativamente, se puede usar la tecnología de presentación en fagos (McCafferty *et al.*, Nature 348: 552-553 [1990]) para producir anticuerpos y fragmentos de anticuerpos humanos *in vitro* a partir de repertorios de genes de dominios variables (V) de inmunoglobulinas de donantes no inmunizados. Según esta técnica, se clonan los genes de los dominios V de anticuerpos dentro de marco en un gen de proteína de la cubierta mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se exhiben como fragmentos de anticuerpos funcionales sobre la superficie de la partícula del fago. Como la partícula filamentosa contiene una copia de ADN de hélice sencilla del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo dan también como resultado la selección del gen codificante del anticuerpo que exhibe esas propiedades. Así, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. Se puede realizar la presentación en fagos en varios formatos, revisados en, *v.g.*, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3: 564-571 (1993). Se pueden usar varias fuentes de segmentos de genes V para la presentación en fagos. Clackson *et al.*, Nature, 352: 624-628 (1991), aislaron una matriz diversa de anticuerpos antioxazolona de una pequeña librería combinatoria aleatoria de genes V derivados de los bazos de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V de donantes humanos no inmunizados y se pueden aislar anticuerpos para una matriz diversa de antígenos (incluyendo autoantígenos) esencialmente siguiendo las técnicas descritas por Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991), o Griffith *et al.*, EMBO J. 12: 725-734 (1993). Véanse también las Patentes EE.UU. Nº 5.565.332 y 5.573.905.

Como se ha discutido anteriormente, también se pueden generar anticuerpos humanos por células B activadas *in vitro* (véanse las Patentes EE.UU. 5.567.610 y 5.229.275).

4. Fragmentos de anticuerpos

En determinadas circunstancias, existen ventajas en la utilización de fragmentos de anticuerpos en lugar de anticuerpos completos. El menor tamaño de los fragmentos permite un aclaramiento rápido y puede dar lugar a un mejor acceso a los tumores sólidos.

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos derivaban de la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véanse, *v.g.*, 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 pueden ser ahora producidos directamente mediante células huésped recombinantes. Los fragmentos de anticuerpos Fab, Fv y ScFv pueden todos ellos expresarse en, y ser segregados por, *E. coli*, lo que permite así la fácil producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Se pueden aislar fragmentos de anticuerpos de las librerías de fagos de anticuerpos discutidas anteriormente. Alternativamente, se pueden recuperar fragmentos Fab'-SH directamente de *E. coli* y copularlos químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10: 163-167 (1992)). Según otro enfoque, se pueden aislar fragmentos F(ab')₂ directamente de un cultivo de células huésped recombinantes. Se describen fragmentos Fab y F(ab')₂ con mayor semivida *in vivo* que comprenden un receptor salvaje que se une a residuos de epitopos en la Patente EE.UU. 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos resultarán obvias para el experto en la materia. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de una sola cadena (scFv). Véanse WO 93/16185, la Patente EE.UU. Nº 5.571.894 y la Patente EE.UU. Nº 5.587.458. Fv y scFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos que están desprovistas de regiones constantes; por lo tanto, son adecuados para una reducida unión no específica durante su uso *in vivo*. Se pueden construir proteínas de fusión scFv para obtener la fusión de una proteína efectora en el extremo amino o carboxi de un scFv. Véase Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, *supra*. El fragmento de anticuerpo puede ser también un "anticuerpo lineal", *v.g.*, como se describe en la Patente EE.UU. 5.641.870, por ejemplo. Dichos fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser mono-específicos o biespecíficos.

5. Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión para al menos dos epitopos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos ejemplares pueden unirse a dos epitopos diferentes de una proteína TASK como aquí se describe. Otros de tales anticuerpos pueden combinar un sitio de unión a TASK con un sitio de unión para otra proteína. Alternativamente, se puede combinar un brazo anti-TASK con un brazo que se une a una molécula desencadenante sobre un leucocito, tal como una molécula receptora de células T (*v.g.*, CD3), o receptores Fc para IgG (Fc γ R), tales como Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) y Fc γ RIII (CD16), para enfocar y localizar los mecanismos de defensa celulares en la célula que expresa TASK. Los anticuerpos biespecíficos pueden ser también utilizados para localizar agentes citotóxicos en células que expresan TASK. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a TASK y un brazo que se une al agente citotóxico (*v.g.*, saporina, antiinterferón- α , alcaloide vinca, cadena A de la ricina, metotrexato o hapteno de isótopos radiactivos). Se pueden preparar los anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud total o como fragmentos de anticuerpos (*v.g.*, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

WO 96/16673 describe un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/anti-Fc γ RIII, y la Patente EE.UU. Nº 5.837.234 divulga un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/anti-Fc γ RI. En WO98/02463 se muestra un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/Fc α . La Patente EE.UU. Nº 5.821.337 muestra un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/anti-CD3.

Los métodos para producir anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud total se basa en la coexpresión de dos pares de cadenas pesadas-cadenas ligeras de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Millstein *et al.*, *Nature* 305: 537-539 (1983)). Debido a la selección aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas, estos híbridos (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que normalmente se realiza mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante engorrosa y los rendimientos de producto son bajos. Se divulgan procedimientos similares en WO 93/08829 y en Traunecker *et al.* *EMBO J.* 10: 3655-3659 (1991).

Según un enfoque diferente, se fusionan dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) con secuencias de dominios constantes de inmunoglobulinas. Preferiblemente, se realiza la fusión con un dominio constante de cadena pesada de Ig, que comprende al menos parte de las regiones de bisagra, C_H2 y C_H3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (C_H1), que contiene el sitio necesario para la unión de cadenas ligeras, presente en al menos una de las fusiones. Se insertan los ADN codificantes de las fusiones de las cadenas pesadas de inmunoglobulina y, si se desea, de la cadena ligera de inmunoglobulina, en vectores de expresión independientes y se cotransfectan en una célula huésped adecuada. Esto proporciona una mayor flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos polipeptídicos en realizaciones en las que proporciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción dan el rendimiento óptimo del anticuerpo biespecífico deseado. Es, sin embargo, posible insertar las secuencias codificantes para dos o para las tres cadenas polipeptídicas en un solo vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en iguales proporciones da como resultado elevados rendimientos o cuando las proporciones no tienen un efecto significativo sobre el rendimiento de la combinación de cadenas deseada.

En una realización preferida de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos por una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo y un par de cadena pesada-

cadena ligera de inmunoglobulina híbrido (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se vio que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una forma fácil de separación. Este enfoque está divulgado 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).

Según otro enfoque descrito en la Patente EE.UU. N° 5.731.168, se puede someter a ingeniería la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfaz preferida comprende al menos una parte del dominio C_{H3}. En este método, se substituyen una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo con cadenas laterales mayores (v.g., tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) lateral(es) de gran tamaño sobre la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo substituyendo las cadenas laterales de aminoácidos de gran tamaño con otras de menor tamaño (v.g., alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero con respecto a otros productos finales no deseados, tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos entrecruzados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede estar copulado a avidina y el otro a biotina. Dichos anticuerpos han sido, por ejemplo, propuestos para dirigir células del sistema inmunitario hacia células no deseadas (Patente EE.UU. N° 4.676.980) y para el tratamiento de la infección por el VIH (WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03.089). Se pueden producir anticuerpos heteroconjugados usando cualquier método de entrecruzamiento conveniente. Los agentes entrecruzantes adecuados son bien conocidos en la técnica y se describen en la Patente EE.UU. N° 4.676.980, junto con una serie de técnicas de entrecruzamiento.

También se han descrito en la literatura técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos usando unión química. Brennan *et al.*, *Science* 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que se escinden proteolíticamente anticuerpos intactos para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos son reducidos en presencia del agente acomplejante de ditiol, arsenito de sodio, para estabilizar los ditiolos vicinales y evitar la formación de disulfuros intermoleculares. Se convierten entonces los fragmentos Fab' generados en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Se reconvierte luego uno de los derivados Fab'-TNB en el Fab'-tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden ser utilizados como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

El progreso reciente ha facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que pueden ser químicamente copulados 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 totalmente humanizada. Cada fragmento Fab' fue segregado por separado por *E. coli* y sometido a copulación química dirigida *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así formado era capaz de unirse a células que sobreexpresan el receptor ErbB2 y células T humanas normales, así como de desencadenar la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumor de mama humano.

También se han descrito diversas técnicas para producir y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente de un cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148(5): 1547-1553 (1992). Se unieron los péptidos de la cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun a las porciones Fab' de dos diferentes anticuerpos por fusión génica. Se redujeron los homodímeros de anticuerpos en la región de bisagra para formar monómeros y se reoxidaron después para formar los heterodímeros de anticuerpos. Este método puede ser también utilizado para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología de "diacuerpos" descrita por Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993), ha proporcionado un mecanismo alternativo para producir fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un V_H conectado a un V_L por un conector que es demasiado corto como para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. En consecuencia, los dominios V_H y V_L de un fragmento se ven forzados a emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando así dos sitios de unión a antígeno. Se ha descrito también otra estrategia para producir fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros Fv de una sola cadena (sFv). Véase Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152: 5368 (1994).

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

6. Anticuerpos heteroconjugados

También se describen aquí anticuerpos heteroconjugados. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos por dos anticuerpos covalentemente unidos. Dichos anticuerpos han sido propuestos, por ejemplo, para dirigir las células del sistema inmunitario hacia células no deseadas [Patente EE.UU. N° 4.676.980] y para el tratamiento de la

infección por el VIH [WO 91/00360, WO 92/200373, EP 03.089]. Se contempla que los anticuerpos puedan ser preparados *in vitro* usando métodos conocidos en la química de proteínas sintéticas, incluyendo aquéllos en los que están implicados agentes entrecruzantes. Por ejemplo, se pueden construir inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Como ejemplos de reactivos adecuados para este fin, se incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y los divulgados, por ejemplo, en la Patente EE.UU. N° 4.676.980.

7. Anticuerpos multivalentes

Un anticuerpo multivalente puede ser interiorizado (y/o catabolizado) más rápidamente 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 distintos de los de la clase IgM) con tres o más sitios de unión a antígeno (*v.g.*, anticuerpos tetravalentes), los cuales pueden ser fácilmente producidos por expresión recombinante de ácido nucleico codificante de 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 de bisagra. En este escenario, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión a antígeno aminotermiales con respecto a la región Fc. El anticuerpo multivalente preferido aquí comprende (o consiste en) de tres a aproximadamente ocho, pero preferiblemente cuatro, sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena polipeptídica (y preferiblemente dos cadenas polipeptídicas), donde la(s) cadena(s) polipeptídica(s) comprende(n) dos o más dominios variables. Por ejemplo, la(s) cadena(s) polipeptídica(s) puede(n) 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 polipéptido y n es 0 ó 1. Por ejemplo, la(s) cadena(s) polipeptídica(s) puede(n) comprender: una cadena VH-CH1-conector flexible-VH-CH1-región Fc, o una cadena VH-CH1-VH-CH1-región Fc. El anticuerpo multivalente aquí preferiblemente comprende además al menos dos (y preferiblemente cuatro) polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. El anticuerpo multivalente aquí puede, por ejemplo, comprender de aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos de dominio variable de cadena ligera aquí contemplados comprenden un dominio variable de cadena ligera y, eventualmente, comprenden además un dominio CL.

8. Ingeniería de funciones efectoras

Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, *v.g.*, para aumentar la citotoxicidad mediada por células dependiente de antígeno (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. Se puede conseguir esto introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Alternativa o adicionalmente, se puede(n) introducir residuo(s) de cisteína en la región Fc, permitiendo así la formación de enlaces disulfuro intercatenarios en esta región. El anticuerpo homodimérico así generado puede tener una mejor capacidad de interiorización y/o una mayor actividad de muerte celular mediada por el complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Véanse Caron *et al.*, J. Exp. Med. 176: 1191-1195 (1992), y Shopes, B., J. Immunol. 148: 2918-2922 (1992). También se pueden preparar anticuerpos homodiméricos con mayor actividad antitumoral usando entrecruzantes heterobifuncionales como se describe en Wolff *et al.*, Cancer Research 53: 2560-2565 (1993). Alternativamente, se puede obtener por ingeniería un anticuerpo que tenga regiones Fc dobles y que pueda así tener mayores capacidades de lisis por complemento y ADCC. Véase Stevenson *et al.*, Anti-Cancer Drug Design 3: 219-230 (1989).

Para aumentar la semivida sérica del anticuerpo, se puede incorporar un epitopo de unión a receptor salvaje en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo), como se describe en la Patente EE.UU. 5.739.277, por ejemplo. Tal como se usa aquí, el término "epitopo de unión a receptor salvaje" se refiere a un epitopo de la región Fc de una molécula de IgG (*v.g.*, IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄) que es responsable del aumento de la semivida sérica *in vivo* de la molécula de IgG.

9. Inmunconjugados

También se describen aquí inmunconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico, tal como un agente quimioterapéutico, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (*v.g.*, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal o sus fragmentos) o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

Se han descrito anteriormente agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de dichos inmunconjugados. Como toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden ser utilizadas, se incluyen la cadena A de la difteria, fragmentos activos que no se unen de la toxina de la difteria, la cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de la ricina, la cadena A de la abrina, la cadena A de la modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas diantinas, proteínas de *Phytolaca american* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Se dispone de varios radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Como ejemplos, se incluyen ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y y ¹⁸⁶Re. Se preparan conjugados del

anticuerpo y el agente citotóxico usando varios agentes copulantes de proteínas bifuncionales, tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCL), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bisazido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados bisdiazonio (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 como se describe en Vitetta *et al.*, Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentriaminopentaacético marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de un radionucleótido al anticuerpo, véase WO94/11026.

También se contemplan aquí conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de pequeña molécula, tales como una calicheamicina, maitansinoides, un tricoteno y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina.

Maitansina y maitansinoides

Se puede conjugar un anticuerpo anti-TASK (longitud total o fragmentos) con una o más moléculas de maitansinoides.

Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de la tubulina. La maitansina fue aislada por primera vez del arbusto de África Oriental *Maytenus serrata* (Patente EE.UU. N° 3.896.111). Posteriormente, se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como el maitansinol y los ésteres de maitansinol C-3 (Patente EE.UU. N° 4.151.042). Se divulgan maitansinol y derivados y análogos del mismo sintéticos, por ejemplo, en las Patentes EE.UU. N° 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, cuyas descripciones son expresamente aquí incorporadas a modo de referencia.

Conjugados maitansinoide-anticuerpo

En un intento de mejorar su índice terapéutico, se han conjugado maitansina y maitansinoides con anticuerpos que se unen específicamente a antígenos de células tumorales. Se divulgan inmunoconjugados que contienen maitansinoides y su uso terapéutico, por ejemplo, en las Patentes EE.UU. N° 5.208.020 y 5.416.064 y en la Patente Europea EP 0.425.235 B1, cuyas divulgaciones son aquí expresamente incorporadas a modo de referencia. Liu *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8618-8623 (1996), describieron inmunoconjugados que comprendían un maitansinoide designado como DM1 unido al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra el cáncer colorrectal humano. Se vio que el conjugado era altamente citotóxico hacia células de cáncer de colon cultivadas y mostraba actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento tumoral *in vivo*. Chari *et al.*, Cancer Research 52: 127-131 (1992), describen inmunoconjugados en los que se conjugó un maitansinoide a través de un conector disulfuro con el anticuerpo murino A7 que se une a un antígeno sobre líneas de células de cáncer de colon humanas, o con otro anticuerpo monoclonal murino, TA.1, que se une al oncogén HER-2/*neu*. Se estudió la citotoxicidad del conjugado TA.1-maitansinoide *in vitro* en la línea celular de cáncer de mama humana SK-BR-3, que expresa 3×10^5 antígenos de superficie HER-2 por célula. El conjugado de fármaco alcanzó un grado de citotoxicidad similar al fármaco maitansinoide libre, que se pudo aumentar incrementando el número de moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo. El conjugado A7-maitansinoide mostró una baja citotoxicidad sistémica en ratones.

Conjugado anticuerpo antipolipéptido TASK-maitansinoide (inmunoconjugados)

Se preparan conjugados anticuerpo anti-TASK-maitansinoide uniendo químicamente un anticuerpo anti-TASK a una molécula de maitansinoide sin disminuir significativamente la actividad biológica tanto del anticuerpo como de la molécula de maitansinoide. Una media de 3-4 moléculas de maitansinoide conjugadas por molécula de anticuerpo han mostrado eficacia en el aumento de la citotoxicidad de las células diana sin afectar negativamente a la función o la solubilidad del anticuerpo, aunque se esperaría que incluso una molécula de toxina/anticuerpo aumentara la citotoxicidad con respecto al uso de anticuerpo desnudo. Los maitansinoides son bien conocidos en la técnica y pueden ser sintetizados por técnicas conocidas o aislados de fuentes naturales. Se divulgan maitansinoides adecuados, por ejemplo, en la Patente EE.UU. N° 5.208.020 y en las otras patentes y publicaciones no de patente a las que se ha hecho aquí referencia con anterioridad. Son maitansinoides preferidos el maitansinol y los análogos del maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, tales como diversos ésteres de maitansinol.

Existen muchos grupos de unión conocidos en la técnica para producir conjugados anticuerpo-maitansinoide, incluyendo, por ejemplo, los divulgados en la Patente EE.UU. N° 5.208.020 o en la Patente EP 0.425.235 B1, y en Chari *et al.*, Cancer Research 52: 127-131 (1992). Los grupos de unión incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles frente a ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles frente a peptidasas o grupos lábiles frente a esterases, como se divulga en las patentes antes identificadas, siendo preferidos los grupos disulfuro y tioéter.

Se pueden producir conjugados del anticuerpo y el maitansinoide usando varios agentes copulantes de proteínas bifuncionales, tales como el N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), el succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato, el iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como el adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como el suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como el glutaraldehído), compuestos bisazido (tales como la bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados bisdiazonio (tales como la bis(p-diazoniobenzoil)etilendiamina), diisocianatos (tales como el toluen-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como el 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Como agentes copulantes particularmente preferidos, se incluyen el N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) (Carlsson *et al.*, Biochem. J. 173: 723-737 [1978]) y el N-succinimidil-4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP) para proporcionar una unión disulfuro.

El conector puede unirse a la molécula de maitansinoide en diversas posiciones, dependiendo del tipo de la unión. Por ejemplo, se puede formar una unión éster por reacción con un grupo hidroxilo usando técnicas de copulación convencionales. La reacción puede producirse en la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, en la posición C-14 modificada con hidroximetilo, en la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo y en la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo. En una realización preferida, se forma la unión en la posición C-3 del maitansinol o de un análogo del maitansinol.

Calicheamicina

Otro inmunoconjugado de interés consiste en un anticuerpo anti-TASK conjugado con una o más moléculas de calicheamicina. La familia de antibióticos de la calicheamicina son capaces de producir roturas en el ADN de doble hélice a concentraciones subpicomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de la calicheamicina, véanse las Patentes EE.UU. 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 ellas de American Cyanamid Company). Como análogos estructurales de la calicheamicina que pueden ser utilizados, se incluyen, aunque sin limitación, γ_1^1 , α_2^1 , α_3^1 , N-acetil- γ_1^1 , PSAG y θ_1^1 (Hinman *et al.*, Cancer Research 53: 3336-3342 (1993), Lode *et al.*, Cancer Research 58: 2925-2928 (1998), y las patentes EE.UU. antes mencionadas de American Cyanamid). Otro fármaco antitumoral con el que se puede conjugar el anticuerpo es QFA, que es un antifolato. Tanto la calicheamicina como el QFA tienen sitios de acción intracelulares y no cruzan fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la captación celular de estos agentes mediante interiorización mediada por anticuerpos aumenta en gran medida sus efectos citotóxicos.

Otros agentes citotóxicos

Otros agentes antitumorales que pueden ser conjugados con los anticuerpos anti-TASK aquí descritos incluyen BCNU, estreptozocina, vincristina y 5-fluorouracilo y la familia de agentes conocidos colectivamente como complejo LL-E33288 descrita en las Patentes EE.UU. 5.053.394 y 5.770.710, así como esperamicinas (Patente EE.UU. 5.877.296).

Como toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden ser utilizados, se incluyen la cadena A de la difteria, fragmentos activos que no se unen de la toxina de la difteria, cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de la ricina, cadena A de la abrina, cadena A de la modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas diantinas, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, WO 93/21232, publicada el 28 de octubre de 1993.

Se puede formar un inmunoconjugado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (v.g., una ribonucleasa o una ADN endonucleasa, tal como una deoxirribonucleasa, ADNasa).

Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede incluir un átomo altamente radiactivo. Se dispone de varios isótopos radiactivos para la producción de anticuerpos anti-TASK radioconjugados. Como ejemplos, se incluyen At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isótopos radiactivos de Lu. Cuando se usa el conjugado para diagnóstico, éste puede incluir un átomo radiactivo para estudios escintigráficos, por ejemplo Tc^{99m} o I^{123} , o un marcaje de espín para imagen de resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como imagen de resonancia magnética, IRM), tal como yodo-123, de nuevo yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Los radiomarcajes u otros marcajes pueden incorporarse al conjugado de formas conocidas. Por ejemplo, el péptido puede ser biosintetizado o puede ser sintetizado por síntesis química de aminoácidos utilizando precursores de aminoácidos adecuados, incluyendo, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Se pueden unir marcajes tales como Tc^{99m} o I^{123} , Re^{186} , Re^{188} e In^{111} mediante un residuo de cisteína del péptido. El itrio-90 puede unirse mediante un residuo de lisina. Se puede emplear el método IODOGEN (Fraker *et al.* (1978), Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57, para incorporar yodo-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros métodos con detalle.

Se pueden preparar conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico usando varios agentes copulantes 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 adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bisazido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados bisdiazonio (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-dinitrobenceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta *et al.*, Science 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietiltri Aminopentaacético marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de un radionucleótido con el anticuerpo. Véase WO94/1106. El conector puede ser un "conector escindible" que facilite la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se puede usar un conector lábil frente a ácidos, un conector sensible a peptidasas, un conector fotolábil, un conector dimetilo o un conector que contenga disulfuro (Chari *et al.*, Cancer Research 52: 127-131 (1992); Patente EE.UU. N° 5.208.020).

Alternativamente, se puede preparar una proteína de fusión que comprenda el anticuerpo anti-TASK y un agente citotóxico, *v.g.*, por técnicas recombinantes o síntesis peptídica. La longitud del ADN puede comprender regiones respectivas codificantes de las dos porciones del conjugado, ya sea adyacentes una a la otra o separadas por una región codificante de un péptido conector que no destruya las propiedades deseadas del conjugado.

Se puede conjugar el anticuerpo con un "receptor" (tal como estreptavidina) para utilización en el preabordaje de tumores, donde se administra el conjugado anticuerpo-receptor al paciente, seguido de eliminación del conjugado no unido de la circulación usando un agente aclarante y de administración después de un "ligando" (*v.g.*, avidina) que está conjugado con un agente citotóxico (*v.g.*, un radionucleótido).

10. Inmunoliposomas

Los anticuerpos anti-TASK aquí divulgados pueden ser también formulados como inmunoliposomas. Un "liposoma" es una pequeña vesícula compuesta por diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o surfactante que es útil para administración de un fármaco a un mamífero. Los componentes del liposoma están comúnmente dispuestos en una formación de bicapa, similar a la disposición de lípidos de las membranas biológicas. Los liposomas que contienen el anticuerpo son preparados por métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos en Epstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3688 (1985); Hwang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4030 (1980); Patentes EE.UU. N° 4.485.045 y 4.544.545; y WO97/38731, publicada el 23 de octubre de 1997. Se divulgan liposomas con mayor tiempo de circulación en la Patente EE.UU. N° 5.013.556.

Se pueden generar liposomas particularmente útiles mediante el método de evaporación en fase invertida con una composición de lípidos que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Se extruyen los liposomas a través de filtros de tamaño de poro definido para obtener liposomas con el diámetro deseado. Se pueden conjugar fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención con los liposomas según se describe en Martin *et al.*, J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982), mediante una reacción de intercambio de disulfuro. El liposoma contiene eventualmente un agente quimioterapéutico. Véase Gabizon *et al.*, J. National Cancer Inst. 81(19): 1484 (1989).

B. Oligopéptidos de unión a TASK

Los oligopéptidos de unión a TASK son oligopéptidos que se unen, preferiblemente de manera específica, a un polipéptido TASK como aquí se describe. Los oligopéptidos de unión a TASK pueden ser químicamente sintetizados usando la metodología conocida de síntesis de oligopéptidos, o pueden ser preparados y purificados usando tecnología recombinante. Los oligopéptidos de unión a TASK tienen normalmente al menos aproximadamente 5 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ó 100 aminoácidos de longitud o más, donde dichos oligopéptidos son capaces de unirse, preferiblemente de manera específica, a un polipéptido TASK como aquí se describe. Los oligopéptidos de unión a TASK pueden ser identificados sin una excesiva experimentación usando técnicas bien conocidas. En este sentido, se hace notar que las técnicas para cribar librerías de oligopéptidos con objeto de hallar oligopéptidos que sean capaces de unirse específicamente a un polipéptido diana son bien conocidas en este campo (véanse, *v.g.*, las Patentes EE.UU. 5.556.762, 5.750.373, 4.708.871, 4.833.092, 5.223.409, 5.403.484, 5.571.689 y 5.663.143; las Publicaciones PCT N° 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.*, en 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).

A este respecto, la presentación en bacteriófagos (fagos) es una técnica bien conocida que permite cribar grandes librerías de oligopéptidos para identificar miembro(s) de esas librerías que sea(n) capaz(es) de unirse

específicamente a un polipéptido diana. La presentación en fagos es una técnica mediante la cual se exhiben polipéptidos variantes como proteínas de fusión con la proteína de la cubierta sobre la superficie de partículas de bacteriófagos (Scott, J.K. y Smith, G. P. (1990), Science 249: 386). La utilidad de la presentación en fagos radica en el hecho de que se pueden clasificar rápida y eficazmente grandes librerías de variantes proteicas selectivamente aleatorizadas (o de ADNc aleatoriamente clonados) en cuanto a aquellas secuencias que se unen a una molécula diana con gran afinidad. Se ha utilizado la presentación de librerías de péptidos (Cwirla, S. E. *et al.* (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6378) o de 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 para cribar millones de polipéptidos u oligopéptidos en cuanto aquéllos que tengan propiedades de unión específica (Smith, G. P. (1991), Current Opin. Biotechnol., 2: 668). La clasificación de librerías de 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 los enriquecimientos de unión. Patentes EE.UU. N° 5.223.409, 5.403.484, 5.571.689 y 5.663.143.

Aunque la mayoría de los métodos de presentación en fagos han utilizado fagos filamentosos, también se conocen sistemas de presentación en fagos lambdoides (WO 95/34683; EE.UU. 5.627.024), sistemas de presentación en fagos T4 (Ren, Z-J. *et al.* (1998), Gene 215: 439; Zhu, Z. (1997), CAN 33: 534; Jiang, J. *et al.* (1997), can 128: 44380; Ren, Z-J. *et al.* (1997), CAN 127: 215644; Ren, Z-J. (1996), Protein Sci. 5: 1833; Efimov, V. P. *et al.* (1995), Virus Genes 10: 173) y sistemas de presentación en fagos T7 (Smith, G. P. y Scott, J.K. (1993), Methods in Enzymology, 217, 228-257; EE.UU. 5.766.905).

Se han desarrollado ahora muchos otros perfeccionamientos y variaciones del concepto básico de presentación en fagos. Estos perfeccionamientos aumentan la capacidad de los sistemas de presentación para cribar librerías peptídicas en cuanto a la unión a moléculas diana seleccionadas y para presentar proteínas funcionales con el potencial de cribar estas proteínas en cuanto a las propiedades deseadas. Se han desarrollado dispositivos de reacción combinatoria para reacciones de presentación en fagos (WO 98/14277) y se han usado librerías de presentación en fagos para analizar y controlar las interacciones bimoleculares (WO 98/20169; WO 98/20159) y las propiedades de los péptidos helicoidales constreñidos (WO 98/20036). WO 97/35196 describe un método de aislamiento de un ligando de afinidad en el que se pone en contacto una librería de presentación 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 ligandos de unión. WO 97/46251 describe un método de *biopanning* de una librería de presentación en fagos aleatoria con un anticuerpo purificado por afinidad y aislamiento después del fago de unión, seguido de un procedimiento de *micropanning* usando los pocillos de una microplaca para aislar fagos de unión de alta afinidad. También se ha descrito el uso de proteína A de *Staphylococcus aureus* como marcador de afinidad (Li *et al.* (1998). Mol. Biotech., 9: 187). WO 97/47314 describe el uso de librerías de substración de sustrato para distinguir especificidades enzimáticas usando una librería combinatoria, que puede ser una librería de presentación en fagos. Se describe un método para seleccionar enzimas adecuadas para uso en detergentes usando presentación en fagos en WO 97/09446. Se describen métodos adicionales de selección de proteínas de unión específica en las Patentes EE.UU. N° 5.498.538 y 5.432.018 y en WO 98/15833.

También se describen métodos de generación de librerías peptídicas y de cribado de estas librerías en las Patentes EE.UU. N° 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.

45 C. Moléculas orgánicas de unión a TASK

Las moléculas orgánicas de unión a TASK son moléculas orgánicas distintas de oligopéptidos o anticuerpos según se define aquí que se unen, preferiblemente de manera específica, a un polipéptido TASK como se describe aquí. Las moléculas orgánicas de unión a TASK pueden ser identificadas y químicamente sintetizadas usando una metodología conocida (véanse, v.g., las Publicaciones PCT N° WO00/00823 y WO00/39585). Las moléculas orgánicas de unión a TASK tienen normalmente menos de aproximadamente 2.000 daltons de tamaño, alternativamente menos de aproximadamente 1.500, 750, 500, 250 ó 200 daltons de tamaño, donde dichas moléculas orgánicas que son capaces de unirse, preferiblemente de manera específica, a un polipéptido TASK como aquí se describe pueden ser identificadas sin una excesiva experimentación utilizando técnicas bien conocidas. A este respecto, se hace notar que las técnicas para cribar librerías de moléculas orgánicas en cuanto a moléculas capaces de unirse a un polipéptido diana son bien conocidas en este campo (véanse, v.g., las Publicaciones PCT N° WO00/00823 y WO00/39585). Las moléculas orgánicas de unión a TASK 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, aminoalcoholes, oxazolidinas, oxazolininas, tiazolidinas, tiazolininas, enaminas, sulfonamidas, epóxidos, aziridinas, isocianatos, cloruros de sulfonilo, compuestos diazo, cloruros de ácido o similares.

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

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

10 Se pueden valorar los efectos inhibidores del crecimiento de un anticuerpo anti-TASK, oligopéptido u otra molécula orgánica por métodos conocidos en la técnica, *v.g.*, usando células que expresan un polipéptido TASK endógenamente o tras transfección con el gen TASK. Por ejemplo, se pueden tratar líneas celulares tumorales apropiadas y células transfectadas con TASK con un anticuerpo monoclonal anti-TASK, oligopéptido u otra molécula orgánica de la invención a diversas concentraciones durante unos cuantos días (*v.g.*, 2-7 días) y tñirlas con violeta cristal o MTT o analizarlas por medio de algún otro ensayo colorimétrico. Otro método de medición de la proliferación sería comparando la captación de ³H-timidina por las células tratadas en presencia o ausencia de un anticuerpo anti-TASK, oligopéptido de unión a TASK o molécula orgánica de unión a TASK. Después del tratamiento, se recogen las células y se cuantifica la cantidad de radiactividad incorporada al ADN en un contador de centelleo. Como controles positivos apropiados, se incluye el tratamiento de una línea celular seleccionada con un anticuerpo inhibidor del crecimiento que se sabe inhibe el crecimiento de esa línea celular. Se puede determinar la inhibición del crecimiento de las células tumorales *in vivo* de diversas formas conocidas en la técnica. Preferiblemente, la célula tumoral es una que sobreexpresa un polipéptido TASK. Preferiblemente, el anticuerpo anti-TASK, oligopéptido de unión a TASK o molécula orgánica de unión a TASK inhibirá la proliferación celular de una célula tumoral que expresa TASK *in vitro* o *in vivo* en aproximadamente un 25-100 % en comparación con la célula tumoral no tratada, más preferiblemente en aproximadamente un 30-100 % e incluso más preferiblemente en aproximadamente un 50-100 % o un 70-100 %, a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,5 a 30 µg/ml. Se puede medir la inhibición del crecimiento a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,5 a 30 µg/ml o de aproximadamente 0,5 nM a 200 nM en cultivo celular, donde se determina la inhibición del crecimiento 1-10 días después de la exposición de las células tumorales al anticuerpo. El anticuerpo es inhibidor del crecimiento *in vivo* si la administración del anticuerpo anti-TASK a una dosis de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal da como resultado la reducción del tamaño del tumor o la reducción de la proliferación de las células tumorales en un plazo de aproximadamente 5 días a 3 meses de la primera administración del anticuerpo, preferiblemente en un plazo de aproximadamente 5 a 30 días.

35 Para seleccionar un anticuerpo anti-TASK, oligopéptido de unión a TASK o molécula orgánica de unión a TASK que induce muerte celular, se puede valorar la pérdida de integridad de las membranas indicada por, *v.g.*, la captación de yoduro de propidio (PI), azul tripán o 7AAD en relación al control. Se puede realizar un ensayo de captación de PI en ausencia de complemento y de células efectoras inmunes. Se incuban células tumorales que expresan polipéptido TASK con medio solo o con medio que contiene el anticuerpo anti-TASK (*v.g.*, a aproximadamente 10 µg/ml), oligopéptido de unión a TASK o molécula orgánica de unión a TASK apropiada. Se incuban las células durante un período de tiempo de 3 días. Después de cada tratamiento, se lavan las células y se alicuotan en 12 x 75 tubos con tapón de filtro de 35 mm (1 ml por tubo, 3 tubos por grupo de tratamiento) para la eliminación de los aglomerados celulares. Los tubos reciben entonces PI (10 µg/ml). Se pueden analizar las muestras usando un citómetro de flujo FACSCAN® y el programa FACSCONVERT® CellQuest (Becton Dickinson). Aquellos anticuerpos anti-TASK, oligopéptidos de unión a TASK o moléculas orgánicas de unión a TASK que inducen niveles estadísticamente significativos de muerte celular, según se determina por la captación de PI, pueden ser seleccionados como anticuerpos anti-TASK, oligopéptidos de unión a TASK o moléculas orgánicas de unión a TASK inductores de muerte celular.

50 Para cribar anticuerpos, oligopéptidos u otras moléculas orgánicas que unen a un epítipo sobre un polipéptido TASK unido por un anticuerpo de interés, se puede llevar a cabo un ensayo rutinario de bloqueo cruzado, tal como el descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed. Harlow y David Lane (1988). Este ensayo puede ser usado para determinar si un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica de ensayo se une al mismo sitio o epítipo que un anticuerpo anti-TASK conocido. Alternativa o adicionalmente, se puede realizar un mapeo de epítipos por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede mutagenizar la secuencia del anticuerpo, tal como por barrido de alanina, para identificar residuos de contacto. El anticuerpo mutante es inicialmente estudiado en cuanto a la unión con anticuerpo policlonal para asegurar un plegamiento apropiado. En un método diferente, se pueden usar péptidos correspondientes a diferentes regiones de un polipéptido TASK en ensayos competitivos con los anticuerpos de ensayo o con un anticuerpo de ensayo y un anticuerpo con un epítipo caracterizado o conocido.

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

Los anticuerpos aquí descritos pueden ser también empleados en ADEPT conjugando el anticuerpo con una enzima activadora de profármaco que convierte un profármaco (*v.g.*, un agente quimioterapéutico peptidílico, véase WO81/01145) en un fármaco anticanceroso activo. Véanse, por ejemplo, WO 88/07378 y la Patente EE.UU. N° 4.975.278.

El componente enzimático del inmunoc conjugado útil para ADEPT incluye cualquier enzima capaz de actuar sobre un profármaco de tal forma que lo convierte en su forma más activa citotóxica.

Como enzimas útiles en el método, se incluyen, aunque sin limitación, fosfatasa alcalina, útil para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasa, útil para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina desaminasa, útil para convertir la 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco anticanceroso 5-fluorouracilo; proteasas, tales como la proteasa de Serratia, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contienen substituyentes D-aminoácidos; enzimas que escinden carbohidratos, tales como β -galactosidasa y neuraminidasa, útiles para convertir profármacos glicosilados en fármacos libres; β -lactamasa, útil para convertir profármacos derivatizados con β -lactamas en fármacos libres; y penicilina amidasa, tales como penicilina V amidasa o penicilina G amidasa, útiles para convertir fármacos derivatizados en sus nitrógenos amina con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Alternativamente, se pueden usar anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la técnica como "abzimas", para convertir los profármacos de la invención en fármacos activos libres (véase, *v.g.*, Massey, Nature 328: 457-458 (1987)). Se pueden preparar conjugados anticuerpo-abzima como se describe aquí para administración de la abzima a una población de células tumorales.

Las enzimas pueden ser covalentemente unidas a los anticuerpos anti-TASK por técnicas bien conocidas en este campo, tales como el uso de los reactivos entrecruzantes heterobifuncionales discutidos anteriormente. Alternativamente, se pueden construir proteínas de fusión que comprendan al menos la región de unión a antígeno de un anticuerpo de la invención unida a al menos una porción funcionalmente activa de una enzima de la invención usando técnicas de ADN recombinante bien conocidas en este campo (véase, *v.g.*, Neuberger *et al.*, Nature 312: 604-608 (1984)).

F. Polipéptidos TASK de longitud total

La presente invención también se refiere a secuencias nucleotídicas recién identificadas y aisladas codificantes de polipéptidos a los que se hace referencia en la presente solicitud como polipéptidos TASK. En particular, se han identificado y aislado ADNc (de longitud parcial y total) codificantes de diversos polipéptidos TASK, como se discute con mayor detalle en los Ejemplos que se darán más adelante.

Como se divulga en los Ejemplos que se darán a continuación, se han descrito diversos clones de ADNc. Se puede determinar la secuencia de aminoácidos predicha a partir de la secuencia nucleotídica usando conocimientos de rutina. Para los polipéptidos TASK y los ácidos nucleicos codificantes aquí descritos, en algunos casos, los Solicitantes han identificado lo que se piensa que es el marco de lectura mejor identificable con la información de secuencia disponible en ese momento.

G. Variantes de anticuerpos anti-TASK y polipéptidos TASK

Además de los anticuerpos anti-TASK y de los polipéptidos TASK de secuencia nativa de longitud total aquí descritos, se contempla que se pueden preparar variantes de anticuerpos anti-TASK y polipéptidos TASK. Se pueden preparar variantes de anticuerpos anti-TASK y de polipéptidos TASK introduciendo cambios nucleotídicos apropiados en el ADN codificante y/o por síntesis del anticuerpo o polipéptido deseado. Los expertos en la técnica apreciarán que los cambios de aminoácidos pueden alterar los procesos posteriores a la traducción del anticuerpo anti-TASK o del polipéptido TASK, tal como el cambio en el número o posición de los sitios de glicosilación o la alteración de las características de anclaje de la membrana.

Se pueden hacer variaciones en los anticuerpos anti-TASK y en los polipéptidos TASK aquí descritos, por ejemplo, usando cualquiera de las técnicas y directrices para mutaciones conservadoras y no conservadoras expuestas, por ejemplo, en la Patente EE.UU. N° 5.364.934. Las variaciones pueden consistir en una substitución, delección o inserción de uno o más codones codificantes del anticuerpo o polipéptido, que da lugar a un cambio en la secuencia de aminoácidos en comparación con el anticuerpo o polipéptido de secuencia nativa. Eventualmente, la variación se produce por substitución de al menos un aminoácido con cualquier otro aminoácido en uno o más de los dominios del anticuerpo anti-TASK o del polipéptido TASK. Se puede encontrar una guía para determinar qué residuo de aminoácido puede ser insertado, substituido o eliminado sin afectar de forma adversa a la actividad deseada comparando la secuencia del anticuerpo anti-TASK o del polipéptido TASK con la de moléculas proteicas conocidas homólogas y minimizando el número de cambios en la secuencia de aminoácidos realizados en regiones de alta homología. Las substituciones de aminoácidos pueden ser el resultado de la substitución de un aminoácido con otro aminoácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas similares, tal como la substitución de una leucina con una serina, es decir, substituciones de aminoácidos conservadoras. Las inserciones o delecciones pueden eventualmente estar en el rango de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida puede ser determinada realizando sistemáticamente inserciones, delecciones o substituciones de aminoácidos en la secuencia y estudiando las variantes resultantes en cuanto a la actividad exhibida por la secuencia nativa de longitud total o madura.

Se proporcionan aquí fragmentos de anticuerpos anti-TASK y de polipéptidos TASK. Dichos fragmentos pueden estar truncados en el extremo N o en el extremo C, o pueden carecer de residuos internos, por ejemplo, en comparación con un anticuerpo o proteína nativa de longitud total. Ciertos fragmentos carecen de residuos de aminoácidos que no son esenciales para una actividad biológica deseada del anticuerpo anti-TASK o del polipéptido TASK.

Se pueden preparar fragmentos de anticuerpos anti-TASK y de polipéptidos TASK por cualquiera de una serie de técnicas convencionales. Se pueden sintetizar químicamente fragmentos peptídicos deseados. Un enfoque alternativo conlleva la generación de fragmentos de anticuerpos o de polipéptidos por digestión enzimática, *v.g.*, tratando la proteína con una enzima que se sabe escinde las proteínas en sitios definidos por residuos de aminoácidos particulares, o por digestión del ADN con enzimas de restricción adecuadas y aislamiento del fragmento deseado. Aún otra técnica adecuada conlleva el aislamiento y la amplificación de un fragmento de ADN codificante de un fragmento de anticuerpo o de polipéptido deseado mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR). Se emplean oligonucleótidos que definen los extremos deseados del fragmento de ADN en los cebadores 5' y 3' en la PCR. Preferiblemente, los fragmentos de anticuerpos anti-TASK y de polipéptidos TASK comparten al menos una actividad biológica y/o inmunológica con el anticuerpo anti-TASK o polipéptido TASK nativo aquí divulgado.

En realizaciones particulares, se muestran sustituciones conservadoras de interés en la Tabla 6 bajo el encabezado de sustituciones preferidas. Si dichas sustituciones dan lugar a un cambio en la actividad biológica, se introducen entonces cambios más substanciales, denominados sustituciones ejemplares en la Tabla 6, o como se describe aún más a continuación en relación a las clases de aminoácidos, y se hace un cribado de los productos.

Tabla 6

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

Se consiguen modificaciones substanciales en la función o en la identidad inmunológica del anticuerpo anti-TASK o del polipéptido TASK seleccionando las sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto polipeptídico en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de lámina o helicoidal; (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 basándose en las propiedades de las cadenas laterales comunes:

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

Las sustituciones no conservadoras conllevarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase. Dichos residuos substituidos también pueden ser introducidos en los sitios de sustitución conservadora o, más preferiblemente, en los sitios restantes (no conservados).

5 Las variaciones pueden ser realizadas usando métodos conocidos en la técnica, tales como la mutagénesis mediada por oligonucleótidos (dirigida a sitio), el barrido de alanina y la mutagénesis por PCR. Se pueden realizar una mutagénesis dirigida a sitio [Carter *et al.*, Nucl. Acids Res., 13: 4331 (1986); Zoller *et al.*, Nucl. Acids Res., 10: 6487 (1987)], una mutagénesis por cassette [Wells *et al.*, Gene, 34: 315 (1985)], una mutagénesis por selección de restricción [Wells *et al.*, Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317: 415 (1986)] u otras técnicas conocidas sobre el ADN clonado para producir el ADN variante del anticuerpo anti-TASK o del polipéptido TASK.

También se puede emplear un análisis de aminoácidos de barrido para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua. Entre los aminoácidos de barrido preferidos se encuentran aminoácidos neutros relativamente pequeños. Dichos aminoácidos incluyen alanina, glicina, serina y cisteína. La alanina es normalmente un aminoácido de barrido preferido entre este grupo, ya que elimina la cadena lateral más allá del carbono beta y es menos probable que altere la conformación de la cadena principal de la variante [Cunningham y Wells, Science, 244: 1081-1085 (1989)]. La alanina es también normalmente preferida por ser el aminoácido más común. Además, se encuentra frecuentemente en posiciones tanto enterradas como expuestas [Creighton, The Proteins (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150: 1 (1976)]. Si la sustitución de alanina no da cantidades adecuadas de variante, se puede usar un aminoácido isotérico.

Cualquier residuo de cisteína que no esté implicado en el mantenimiento de la conformación apropiada del anticuerpo anti-TASK o del polipéptido TASK puede estar también substituido, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y prevenir un entrecruzamiento aberrante. Por el contrario, se puede(n) añadir enlace(s) de cisteína al anticuerpo anti-TASK o al polipéptido TASK para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fv).

Un tipo particularmente preferido de variante de sustitución conlleva la sustitución de uno o más residuos de región hipervariable de un anticuerpo parental (v.g., un anticuerpo humanizado o humano). En general, la(s) variante(s) resultante(s) seleccionada(s) para mayor desarrollo tendrá(n) propiedades biológicas mejoradas en relación al anticuerpo parental del que se genera(n). Una forma conveniente para generar dichas variantes de sustitución conlleva la maduración de afinidad usando presentación en fagos. Resumiendo, se mutan varios sitios de región hipervariable (v.g., 6-7 sitios) para generar todas las sustituciones amino posibles en cada sitio. Se exhiben las variantes de anticuerpo así generadas de una forma monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones con el producto del gen III de M13 empaquetado en cada partícula. Se rastrean entonces las variantes exhibidas en fagos en cuanto a su actividad biológica (v.g., afinidad de unión) como aquí se divulga. Con objeto de identificar sitios de región hipervariable candidatos para modificación, se puede llevar a cabo una mutagénesis de barrido de alanina para identificar residuos de región hipervariable que contribuyan significativamente a la unión a antígeno. Alternativa o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar la estructura de cristal del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el polipéptido TASK humano. Dichos residuos de contacto y residuos próximos son candidatos para sustitución según las técnicas aquí elaboradas. Una vez generadas dichas variantes, se somete el panel de variantes a cribado como aquí se describe y se pueden seleccionar para mayor desarrollo anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes.

Se preparan moléculas de ácidos nucleicos codificantes de variantes de secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti-TASK mediante varios métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, aunque sin limitación, el aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencias de aminoácidos naturales) o la preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida a sitio), mutagénesis por PCR y mutagénesis por cassette de una variante preparada con anterioridad o una versión no variante del anticuerpo anti-TASK.

H. Modificaciones de anticuerpos anti-TASK y polipéptidos TASK

Se incluyen modificaciones covalentes de anticuerpos anti-TASK y polipéptidos TASK. Un tipo de modificación covalente incluye la reacción de residuos de aminoácido de interés de un anticuerpo anti-TASK o polipéptido TASK con un agente derivatizante orgánico capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos N- o C-terminales del anticuerpo anti-TASK o polipéptido TASK. La derivatización con agentes bifuncionales es útil, por ejemplo, para entrecruzar anticuerpo anti-TASK o polipéptido TASK con una matriz o superficie de soporte insoluble en agua para uso en el método de purificación de anticuerpos anti-TASK, y viceversa. Como agentes entrecruzantes comúnmente utilizados, se incluyen, v.g., 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres de disuccinimidilo, tales como 3,3'-ditiobis(succinimidil)propionato), maleimidias bifuncionales, tales como bis-N-maleimido-1,8-octano, y agentes tales como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato.

Otras modificaciones incluyen la desamidación de residuos de glutaminilo y asparraginilo para obtener los correspondientes residuos de glutamilo y aspartilo, respectivamente, la hidroxilación de prolina y lisina, la

fosforilación de grupos hidroxilo de los residuos de serilo o treonilo, la metilación de los grupos α -amino de las cadenas laterales de lisina, arginina e histidina [T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)], la acetilación de la amina N-terminal y la amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

5 Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo anti-TASK o del polipéptido TASK incluido consiste en alterar el patrón de glicosilación nativo del anticuerpo o del polipéptido. "Alteración del patrón de glicosilación nativo" pretende significar para los presentes fines la delección de uno o más restos de carbohidratos encontrados en el anticuerpo anti-TASK o polipéptido TASK de secuencia nativa (ya sea por eliminación del sitio de glicosilación subyacente o por delección de la glicosilación por medios químicos y/o enzimáticos) y/o la adición de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo anti-TASK o polipéptido TASK de secuencia nativa. Además, la expresión incluye cambios cualitativos en la glicosilación de las proteínas nativas, que conllevan un cambio en la naturaleza y las proporciones de los diversos restos de carbohidratos presentes.

15 La glicosilación de anticuerpos y otros polipéptidos está normalmente ligada a N o ligada a O. Ligada a N se refiere a la unión del resto de carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparragina. Las secuencias tripeptídicas asparragina-X-serina y asparragina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto de carbohidrato a la cadena lateral de asparragina. Así, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también se pueden usar 5-hidroxi prolina o 5-hidroxisilina.

25 La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo anti-TASK o polipéptido TASK se consigue de manera conveniente alterando la secuencia de aminoácidos de tal forma que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas antes descritas (para sitios de glicosilación ligada a N). También se puede realizar la alteración por adición de, o sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina a, o en, la secuencia del anticuerpo anti-TASK o polipéptido TASK original (para sitios de glicosilación ligada a O). La secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-TASK o polipéptido TASK puede ser eventualmente alterada por cambios a nivel del ADN, particularmente mutando el ADN codificante del anticuerpo anti-TASK o polipéptido TASK en bases preseleccionadas, de tal forma que se generen codones que se traducirán en los aminoácidos deseados.

35 Otro medio para aumentar el número de restos de carbohidratos sobre el anticuerpo anti-TASK o polipéptido TASK es mediante copulación química o enzimática de glicósidos con el polipéptido. Dichos métodos están descritos en la técnica, *v.g.*, en WO 87/05330, publicada 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306 (1981).

40 Se puede conseguir la eliminación de restos de carbohidratos presentes sobre el anticuerpo anti-TASK o polipéptido TASK química o enzimáticamente o por sustitución mutacional de codones codificantes de los residuos de aminoácidos que sirven como dianas para la glicosilación. Las técnicas de desglicosilación química son conocidas en este campo y están descritas, por ejemplo, por Hakimuddin *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 259: 52 (1987), y por Edge *et al.*, *Anal. Biochem.*, 118: 131 (1981). Se puede conseguir la escisión enzimática de restos de carbohidratos sobre polipéptidos mediante el uso de varias endo- y exo-glicosidasas, como describen Thotakura *et al.*, *Meth. Enzymol.*, 138: 350 (1987).

45 Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo anti-TASK o polipéptido TASK consiste en unir el anticuerpo o polipéptido a uno de varios polímeros no proteicos, *v.g.*, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxilquilenos, en la forma expuesta en las Patentes EE.UU. N° 4.640.835, 4.496.689, 4.301.144, 4.670.417, 4.791.192 ó 4.179.337. También se puede atrapar el anticuerpo o polipéptido en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial (por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metilmelacrilato), respectivamente), en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas están divulgadas en Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 16ª edición, Oslo, A., Ed., (1980).

55 También se puede modificar el anticuerpo anti-TASK o polipéptido TASK de manera que se formen moléculas quiméricas que comprendan un anticuerpo anti-TASK o polipéptido TASK fusionado a otro polipéptido o secuencia de aminoácidos heteróloga.

60 Dicha molécula quimérica puede comprender una fusión del anticuerpo anti-TASK o polipéptido TASK con un polipéptido marcador que proporcione un epitopo al que se pueda unir selectivamente un anticuerpo antimarcador. El marcador epitópico se sitúa generalmente en el extremo amino o carboxilo del anticuerpo anti-TASK o polipéptido TASK. La presencia de dichas formas marcadas con epitopo del anticuerpo anti-TASK o polipéptido TASK puede ser detectada usando un anticuerpo contra el polipéptido marcador. Además, la provisión del marcador epitópico permite al anticuerpo anti-TASK o polipéptido TASK ser fácilmente purificado por purificación de afinidad usando un anticuerpo antimarcador u otro tipo de matriz de afinidad que se una el marcador epitópico. Se conocen en la técnica

diversos polipéptidos marcadores y sus respectivos anticuerpos. Como ejemplos, se incluyen marcadores de polihistidina (poly-his) o poli-histidina-glicina (poly-his-gly); el polipéptido marcador HA de la influenza y su anticuerpo 12CA5 [Field *et al.*, Mol. Cell. Biol., 8: 2159-2165 (1988)]; el marcador c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 para el mismo [Evan *et al.*, Molecular and Cellular Biology, 5: 3610-3616 (1985)]; y el marcador glicoproteína D (gD) del virus *Herpes simplex* y su anticuerpo [Paborsky *et al.*, Protein Engineering, 3(6): 547-553 (1990)]. Otros polipéptidos marcadores incluyen el péptido Flag [Hopp *et al.*, BioTechnology, 6: 1204-1210 (1988)]; el péptido epitópico KT3 [Martin *et al.*, Science, 255: 192-194 (1992)]; un péptido epitópico de α -tubulina [Skinner *et al.*, J. Biol. Chem., 266: 15163-15166 (1991)]; y el marcador peptídico de la proteína del gen 10 de T7 [Lutz-Freyermuth *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6393-6397 (1990)].

Alternativamente, la molécula quimérica puede comprender una fusión del anticuerpo anti-TASK o polipéptido TASK con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula quimérica (a la que también se hace referencia como una "inmunoadesina"), dicha fusión podría ser con la región Fc de una molécula de IgG. Preferiblemente, la fusión de inmunoglobulina incluye las regiones de la bisagra, CH₂ y CH₃, o de la bisagra, CH₁, CH₂ y CH₃, de una molécula de IgG1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulinas, véase también la Patente EE.UU. N° 5.428.130, concedida el 27 de junio de 1995.

I. Preparación de anticuerpos anti-TASK y polipéptidos TASK

La descripción que se da a continuación se refiere principalmente a la producción de anticuerpos anti-TASK y polipéptidos TASK por cultivo de células transformadas o transfectadas con un vector que contiene ácido nucleico codificante de anticuerpo anti-TASK y polipéptido TASK. Se contempla, por supuesto, poder emplear métodos alternativos, bien conocidos en la técnica, para preparar anticuerpos anti-TASK y polipéptidos TASK. Por ejemplo, se puede producir la secuencia de aminoácidos apropiada, o porciones de la misma, por síntesis peptídica directa usando técnicas de fase sólida [véanse, *v.g.*, Stewart *et al.*, Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2154 (1963)]. Se puede realizar la síntesis de proteínas *in vitro* usando técnicas manuales o por automatización. Se puede conseguir la síntesis automatizada, por ejemplo, usando un sintetizador de péptidos de Applied Biosystems (Foster City, CA) según las instrucciones del fabricante. Se pueden sintetizar químicamente por separado diversas porciones del anticuerpo anti-TASK o polipéptido TASK y combinarlas usando métodos químicos o enzimáticos para producir el anticuerpo anti-TASK o polipéptido TASK deseado.

1. Aislamiento de ADN codificante de anticuerpo anti-TASK o polipéptido TASK

Se puede obtener ADN codificante de anticuerpo anti-TASK o polipéptido TASK de una librería de ADNc preparada a partir de tejido que se piensa que posee el ARNm del anticuerpo anti-TASK o polipéptido TASK y que lo expresa a un nivel detectable. En consecuencia, se puede obtener de manera conveniente ADN de anticuerpo anti-TASK o polipéptido TASK humano a partir de una librería de ADNc preparada a partir de tejido humano. También se puede obtener el gen codificante del anticuerpo anti-TASK o polipéptido TASK a partir de una librería genómica o por procedimientos sintéticos conocidos (*v.g.*, síntesis automatizada de ácidos nucleicos).

Se pueden cribar las librerías con sondas (tales como oligonucleótidos de al menos aproximadamente 20-80 bases) diseñadas para identificar el gen de interés o la proteína codificada por él. El cribado de la librería de ADNc o genómica con la sonda seleccionada puede ser realizado usando procedimientos estándar, tal como se describe en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Un medio alternativo para aislar el gen codificante de anticuerpo anti-TASK o polipéptido TASK consiste en utilizar metodología PCR [Sambrook *et al.*, *supra*; Dieffenbach *et al.*, PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

Las técnicas para el cribado de una librería de ADNc son bien conocidas en este campo. Las secuencias oligonucleotídicas seleccionadas como sondas deben tener la suficiente longitud y ser lo suficientemente no ambiguas como para minimizar los falsos positivos. El oligonucleótido está preferiblemente marcado, de manera que pueda ser detectado al hibridarse con el ADN en la librería que se está rastreando. Los métodos de marcaje son bien conocidos en la técnica e incluyen el uso de radiomarcajes, como ATP marcado con ³²P, biotilación o marcaje enzimático. En Sambrook *et al.*, *supra*, se proporcionan las condiciones de hibridación, incluyendo un rigor moderado y un rigor elevado.

Se pueden comparar y alinear las secuencias identificadas en dichos métodos de cribado de librerías con otras secuencias conocidas depositadas y disponibles en bases de datos públicas, tales como GenBank u otras bases de datos de secuencias privadas. Se puede determinar la identidad de secuencia (a nivel de aminoácidos o de nucleótidos) en regiones definidas de la molécula o a través de la secuencia de longitud total usando métodos conocidos en la técnica y como aquí se describe.

Se puede obtener ácido nucleico con secuencia codificante de proteína rastreando librerías seleccionadas de ADNc o genómicas usando la secuencia de aminoácidos deducida aquí divulgada por vez primera y, si es necesario, usando procedimientos convencionales de extensión con cebadores, como se describe en Sambrook *et al.*, *supra*,

para detectar precursores y procesar intermediarios del ARNm que puedan no haber sufrido transcripción inversa a ADNc.

2. Selección y transformación de células huésped

Se transfectan o transforman células huésped con vectores de expresión o clonación aquí descritos para la producción de anticuerpo anti-TASK o polipéptido TASK y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes codificantes de las secuencias deseadas. Las condiciones de cultivo, tales como medios, temperatura, pH y similares, pueden ser seleccionadas por el experto en la técnica sin una excesiva experimentación. En general, se pueden encontrar principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de los cultivos celulares en *Mammalian Cell Biotechnology: A Practical Approach*, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991), y en Sambrook *et al.*, supra.

Los métodos de transfección en células eucarióticas y de transformación en células procarióticas son conocidos para quienes tienen conocimientos ordinarios en la técnica, por ejemplo, CaCl₂, CaPO₄, mediación por liposomas y electroporación. Dependiendo de la célula huésped utilizada, se realiza la transformación usando técnicas estándar apropiadas para dichas células. En general, se usa el tratamiento con calcio empleando cloruro de calcio, como se describe en Sambrook *et al.*, supra, o la electroporación para procariontes. Se usa la infección con *Agrobacterium tumefaciens* para la transformación de ciertas células vegetales, como describen Shaw *et al.*, *Gene*, 23: 315 (1983), y WO 89/05859, publicada el 29 de junio de 1989. Para células de mamíferos sin tales paredes celulares, se puede emplear el método de precipitación con fosfato de calcio de Graham y van der Eb, *Virology*, 52: 456-457 (1978). Se han descrito los aspectos generales de las transfecciones en sistemas de células huésped de mamíferos en la Patente EE.UU. N° 4.399.216. Las transformaciones en levadura son normalmente llevadas a cabo según el método de Van Solingen *et al.*, *J. Bact.*, 130: 946 (1977), y Hsiao *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76: 3829 (1979). Sin embargo, se pueden emplear también otros métodos para introducir ADN en células, tales como por microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplastos bacterianos con células intactas o policonaciones, *v.g.*, polibreno y poliornitina. Para diversas técnicas de transformación de células de mamíferos, véanse Keown *et al.*, *Methods in Enzymology*, 185: 527-537 (1990), y Mansour *et al.*, *Nature*, 336: 348-352 (1988).

Como células huésped adecuadas aquí para clonar o expresar el ADN en los vectores, se incluyen células de procariontes, de levaduras o de eucariontes superiores. Como procariontes adecuados, se incluyen, aunque sin limitación, eubacterias, tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, Enterobacteriaceae tales como *E. coli*. Diversas cepas de *E. coli* están públicamente disponibles, tales como la cepa de *E. coli* K12 MM294 (ATCC 31,446); *E. coli* X1776 (ATCC 31,537); la cepa de *E. coli* W3110 (ATCC 27,325) y K5 772 (ATCC 53,635). Otras células huésped procarióticas adecuadas incluyen Enterobacteriaceae tales como *Escherichia*, *v.g.*, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *v.g.*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, *v.g.*, *Serratia marcescans* y *Shigella*, así como *Bacilli*, tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (*v.g.*, *B. licheniformis* 41P, divulgado en DD 266.710, publicada el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas*, tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Estos ejemplos son ilustrativos, más que limitativos. La cepa W3110 es un huésped particularmente preferido o huésped parental, ya que es una cepa huésped común para fermentaciones de productos de ADN recombinante. Preferiblemente, la célula huésped segrega cantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la cepa W3110 puede ser modificada para efectuar una mutación genética en los genes codificantes de proteínas endógenas para el huésped, incluyéndose como ejemplos de tales huéspedes *E. coli* W3110 cepa 1A2, que tiene el genotipo completo *tonA*; *E. coli* W3110 cepa 9E4, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3*; *E. coli* W3110 cepa 27C7 (ATCC 55.244), que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan*; *E. coli* W3110 cepa 37D6, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG karl*; *E. coli* W3110 cepa 40B4, que es la cepa 37D6 con una mutación de delección *degP* no resistente a la kanamicina; y una cepa de *E. coli* que tiene proteasa periplásmica mutante divulgada en la Patente EE.UU. N° 4.946.783, concedida el 7 de agosto de 1990. Alternativamente, son adecuados métodos de clonación *in vitro*, *v.g.*, PCR u otras reacciones de polimerasas de ácidos nucleicos.

Se pueden producir anticuerpos de longitud total, fragmentos de anticuerpos y proteínas de fusión de anticuerpos en bacterias, en particular cuando no son necesarias la glicosilación y la función efectora Fc, tal como cuando se conjuga el anticuerpo terapéutico con un agente citotóxico (*v.g.*, una toxina) y el inmunocombinado por sí mismo muestra eficacia en la destrucción de las células tumorales. Los anticuerpos de longitud total tienen una mayor semivida en circulación. La producción en *E. coli* es más rápida y más eficiente en cuanto a costes. Para la expresión de fragmentos de anticuerpos y polipéptidos en bacterias, véanse, *v.g.*, EE.UU. 5.648.237 (Carter *et al.*), EE.UU. 5.789.199 (Joly *et al.*) y EE.UU. 5.840.523 (Simmons *et al.*), que describe la región de iniciación de la traducción (TIR) y las secuencias de señal para optimizar la expresión y la secreción, siendo aquí incorporadas estas patentes a modo de referencia. Tras la expresión, se aísla el anticuerpo de la pasta celular de *E. coli* en una fracción soluble y se puede purificar mediante, *v.g.*, una columna de proteína A o G dependiendo del isotipo. Se puede llevar a cabo la purificación final de forma similar al procedimiento para purificar anticuerpo expresado, *v.g.*, en células CHO.

Además de procariontes, microbios eucarióticos tales como hongos filamentosos o levaduras son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores codificantes de anticuerpo anti-TASK o polipéptido TASK. *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo huésped eucariótico inferior comúnmente utilizado. Otros incluyen *Schizosaccharomyces pombe* (Beach y Nurse, Nature, 290: 140 [1981]; EP 139.383, publicada el 2 de mayo de 1985); huéspedes *Kluyveromyces* (Patente EE.UU. N° 4.943.529; Fleer *et al.*, Bio/Technology, 9: 968-975 (1991)), tales como, *v.g.*, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt *et al.*, J. Bacteriol., 154(2): 737-742 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilae* (ATCC 36,906; Van den Berg *et al.*, Bio/Technology, 8:135 (1990)), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402.226); *Pichia pastoris* (EP 183.070; Sreekrishna *et al.*, J. Basic Microbiol., 28: 265-278 [1988]); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244.234); *Neurospora crassa* (Case *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 5259-5263 [1979]); *Schwanniomyces*, tal como *Schwanniomyces occidentalis* (EP 394.538, publicada el 31 de octubre de 1990); y hongos filamentosos, tales como, *v.g.*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (WO 91/00357, publicada el 10 de enero de 1991) y huéspedes *Aspergillus*, tales como *A. nidulans* (Ballance *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 112: 284-289 [1983]; Tilburn *et al.*, Gene, 26: 205-221 [1983]; Yelton *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1470-1474 [1984]) y *A. niger* (Kelly y Hynes, EMBO J., 4:475-479 [1985]). Las levaduras metilótropicas son aquí adecuadas e incluyen, aunque sin limitación, levaduras capaces de crecer sobre metanol seleccionadas entre los géneros consistentes en *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* y *Rhodotorula*. Se puede encontrar una lista de especies específicas que son ejemplares de esta clase de levaduras en C. Anthony, The Biochemistry of Methylotrrophs, 269 (1982).

Las células huésped adecuadas para la expresión de anticuerpo anti-TASK o polipéptido TASK glicosilado derivan de organismos multicelulares. Como ejemplos de células de invertebrados, se incluyen células de insectos, tales como *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9, así como células de plantas, tales como cultivos celulares de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco. Se han identificado numerosas cepas de baculovirus y variantes y células huésped de insectos permisivas correspondientes de huéspedes tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Se dispone públicamente de varias cepas víricas para transfección, *v.g.*, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y dichos virus pueden ser usados como virus aquí según la presente invención, particularmente para transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

Sin embargo, el mayor interés ha sido en las células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo de tejidos) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Son ejemplos de líneas de células huésped de mamíferos útiles la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (células 293 ó 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, J. Gen Virol. 36: 59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (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 CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata Búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (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).

Se transforman las células huésped con los vectores de expresión o clonación antes descritos para la producción de anticuerpo anti-TASK o polipéptido TASK y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes codificantes de las secuencias deseadas.

3. Selección y uso de un vector replicable

El ácido nucleico (*v.g.*, ADNc o ADN genómico) codificante del anticuerpo anti-TASK o polipéptido TASK puede ser insertado en un vector replicable para clonación (amplificación del ADN) o para expresión. Se dispone públicamente de diversos vectores. El vector puede, por ejemplo, estar en forma de plásmido, cósmido, partícula vírica o fago. Se puede insertar la secuencia de ácido nucleico apropiada en el vector mediante varios procedimientos. En general, el ADN es insertado en un sitio(s) de endonucleasa de restricción apropiado(s) usando técnicas conocidas en este campo. Como componentes del vector se incluyen, en general, aunque sin limitación, una o más secuencias de señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de finalización de la transcripción. La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de estos componentes emplea técnicas de ligación estándar conocidas para el experto en la materia.

Se puede producir TASK recombinantemente, no sólo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia de señal u otro polipéptido que tenga un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína o polipéptido maduro. En general, la secuencia de señal puede ser un componente del vector o puede ser una parte del anticuerpo anti-TASK. La secuencia de señal puede ser una secuencia de señal procariontica seleccionada, por ejemplo, entre el grupo de los líderes de la fosfatasa alcalina, la penicilinas, lpp o la enterotoxina II estable al calor. Para la secreción en levaduras, la secuencia de señal puede

5 ser, *v.g.*, el líder de la invertasa de levaduras, el líder del factor alfa (incluyendo los líderes de los factores α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, estos últimos descritos en la Patente EE.UU. N° 5.010.182) o el líder de la fosfatasa ácida, el líder de la glucoamilasa de *C. albicans* (EP 362.179, publicada el 4 de abril de 1990) o la señal descrita en WO 90/13646, publicada el 15 de noviembre de 1990. En la expresión en células de mamíferos, se pueden usar secuencias de señal de mamíferos para dirigir la secreción de la proteína, tales como secuencias de señal de polipéptidos segregados de la misma especie o de una especie relacionada, así como líderes secretores víricos.

10 Tanto los vectores de expresión como los de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite al vector replicarse en una o más células huésped seleccionadas. Dichas secuencias son bien conocidas para varias bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias Gram-negativas, el origen del plásmido 2 μ es adecuado para levaduras y diversos orígenes víricos (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamíferos.

15 Los vectores de expresión y de clonación contendrán normalmente un gen de selección, también llamado marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, *v.g.*, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina; (b) complementan deficiencias auxotróficas; o (c) suministran nutrientes críticos que no pueden ser adquiridos de medios complejos, *v.g.*, el gen codificante de la D-alanina racemasa para *Bacilli*.

20 Un ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamíferos son los que permiten la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico codificante del anticuerpo anti-TASK o polipéptido TASK, tales como DHFR o timidina cinasa. Una célula huésped apropiada cuando se emplea DHFR de tipo salvaje es la línea de células CHO deficiente en actividad DHFR, preparada y propagada como describen Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4216 (1980). Un gen de selección adecuado para uso en levaduras es el gen *therp1* presente en el plásmido de levaduras YRp7 [Stinchcomb *et al.*, Nature, 282: 39 (1979); Kingsman *et al.*, Gene, 7: 141 (1979); Tschemper *et al.*, Gene, 10: 157 (1980)]. El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad para crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC N° 44076 o PEP4-1 [Jones, Genetics, 85: 12 (1977)].

30 Los vectores de expresión y clonación normalmente contienen un promotor operablemente unido a la secuencia de ácido nucleico codificante del anticuerpo anti-TASK o polipéptido TASK para dirigir la síntesis del ARNm. Se conocen bien promotores reconocidos por varias células huésped potenciales. Como promotores adecuados para uso con huéspedes procarionóticos, se incluyen los sistemas promotores de β -lactamasa y de lactosa [Chang *et al.*, Nature, 275: 615 (1978); Goeddel *et al.*, Nature, 281: 544 (1979)], la fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (*trp*) [Goeddel, Nucleic Acids Res., 8: 4057 (1980); EP 36.776] y promotores híbridos, tales como el promotor *tac* [deBoer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 21-25 (1983)]. Los promotores para uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) operablemente unida al ADN codificante del anticuerpo anti-TASK o polipéptido TASK.

40 Como ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para uso con huéspedes de levaduras, se incluyen los promotores para la 3-fosfoglicerato cinasa [Hitzeman *et al.*, J. Biol. Chem., 255: 2073 (1980)] u otras enzimas glicolíticas [Hess *et al.*, J. Adv. Enzyme Reg., 7: 149 (1968); Holland, Biochemistry, 17: 4900 (1978)], tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato cinasa, triosa-fosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucocinasa.

50 Otros promotores de levaduras, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de una transcripción controlada por las condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas de degradación asociadas al metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Se describen además vectores y promotores adecuados para uso en la expresión en levaduras en EP 73.657.

55 La transcripción de anticuerpo anti-TASK o polipéptido TASK a partir de vectores en células huésped de mamíferos está controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus, tales como el virus del polioma, el virus de la viruela aviar (UK 2.211.504, publicada el 5 de julio de 1989), el adenovirus (tal como el Adenovirus 2), el virus del papiloma bovino, el virus del sarcoma aviar, el citomegalovirus, un retrovirus, el virus de la hepatitis B y el virus simiano 40 (SV40), por promotores de mamíferos heterólogos, *v.g.*, el promotor de la actina o un promotor de inmunoglobulina, y por promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de las células huésped.

60 La transcripción de un ADN codificante del anticuerpo anti-TASK o polipéptido TASK por eucariontes superiores puede ser incrementada insertando una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos de ADN de actuación *cis*, normalmente aproximadamente de 10 a 300 pb, que actúan sobre un promotor para aumentar su transcripción. Se conocen ahora muchas secuencias potenciadoras de genes de mamíferos (globina, elastasa, albumina, α -fetoproteína e insulina). Normalmente, sin embargo, se utilizará un potenciador de un virus de células

eucarióticas. Como ejemplos, se incluyen el potenciador de SV40 sobre el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor precoz de citomegalovirus, el potenciador del poliovirus sobre el lado tardío del origen de replicación y los potenciadores de adenovirus. El potenciador puede estar ajustado en el vector en una posición 5' o 3' a la secuencia codificante del anticuerpo anti-TASK o polipéptido TASK, pero se localiza preferiblemente en un sitio 5' del promotor.

Los vectores de expresión usados en células huésped eucarióticas (levaduras, hongos, insectos, plantas, animales, humanos o células nucleadas de otros organismos multicelulares) contendrán también secuencias necesarias para la finalización de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están comúnmente disponibles a partir de las regiones no traducidas 5', y ocasionalmente 3', de ADN o ADNc eucarióticos o víricos. Estas regiones contienen segmentos nucleotídicos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm codificante del anticuerpo anti-TASK o polipéptido TASK.

Se describen aún otros métodos, vectores y células huésped adecuadas para adaptación a la síntesis de anticuerpo anti-TASK o polipéptido TASK en cultivo de células de vertebrados recombinantes en Gething *et al.*, Nature, 293: 620-625 (1981); Mantei *et al.*, Nature, 281: 40-46 (1979); EP 117.060; y EP 117.058.

4. Cultivo de las células huésped

Las células huésped usadas para producir el anticuerpo anti-TASK o polipéptido TASK de esta invención pueden ser cultivadas en varios medios. Medios comercializados, tales como F10 de Ham (Sigma), Medio Esencial Mínimo ((MEM), Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y Medio de Eagle Modificado de Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar las células huésped. Además, se puede usar cualquiera de los medios descritos en Ham *et al.*, Meth. Enz. 58: 44 (1979), Barnes *et al.*, Anal. Biochem. 102: 255 (1980), Patentes EE.UU. N° 4.767.704, 4.657.866, 4.927.762, 4.560.655 ó 5.122.469, WO 90/03430, WO 87/00195 o Patente EE.UU. Re. 30.985 como medio de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios puede ser suplementado según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCIN™), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos normalmente presentes a concentraciones finales en el rango micromolar) y glucosa o una fuente equivalente de energía. Cualquier otro suplemento necesario puede ser también incluido a concentraciones apropiadas, que serían conocidas para los expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son las previamente utilizadas con la célula huésped seleccionada para la expresión, y serán evidentes para alguien con conocimientos ordinarios en la técnica.

5. Detección de la amplificación/expresión génica

Se pueden medir la amplificación y/o expresión génica en una muestra directamente, por ejemplo, por Southern blotting convencional, Northern blotting para cuantificar la transcripción del ARNm [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 5201-5205 (1980)], dot blotting (análisis de ADN) o hibridación *in situ*, usando una sonda apropiadamente marcada, basándose en las secuencias aquí provistas. Alternativamente, se pueden emplear anticuerpos que puedan reconocer dúplex específicos, incluyendo dúplex de ADN, dúplex de ARN y dúplex híbridos de ADN-ARN o dúplex de ADN-proteína. Los anticuerpos a su vez pueden ser marcados y se puede llevar a cabo el ensayo donde el dúplex se une a una superficie, de tal modo que al formarse dúplex sobre la superficie, se puede detectar la presencia de anticuerpo unido al dúplex.

Se puede medir la expresión génica, alternativamente, por métodos inmunológicos, tales como la tinción inmunohistoquímica de células o secciones de tejidos y el ensayo de cultivos celulares o de fluidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto génico. Los anticuerpos útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o el ensayo de fluidos de muestra pueden ser monoclonales o policlonales y pueden ser preparados en cualquier mamífero. De manera conveniente, los anticuerpos pueden ser preparados contra un polipéptido TASK de secuencia nativa o contra un péptido sintético basándose en las secuencias de ADN aquí provistas, o contra una secuencia exógena fusionada a ADN TASK y codificante de un epitopo de anticuerpo específico.

6. Purificación de anticuerpo anti-TASK y polipéptido TASK

Se pueden recuperar formas de anticuerpo anti-TASK y polipéptido TASK del medio de cultivo o de lisados de células huésped. Si está unido a membrana, se puede liberar de la membrana usando una solución detergente adecuada (v.g., Tritón-X 100) o por escisión enzimática. Se pueden romper las células empleadas en la expresión de anticuerpo anti-TASK y polipéptido TASK por diversos medios físicos o químicos, tales como ciclos de congelación-descongelación, sonicación, ruptura mecánica o agentes que provocan lisis celular.

Se puede desear purificar el anticuerpo anti-TASK y el polipéptido TASK de proteínas o polipéptidos de las células recombinantes. Los siguientes procedimientos son ejemplos de procedimientos de purificación adecuados: por fraccionación en una columna de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase invertida; cromatografía en sílice o en una resina de intercambio catiónico, tal como DEAE; cromatografía; SDS-PAGE; precipitación con

sulfato de amonio; filtración por gel utilizando, por ejemplo, Sephadex G- 75; columnas de proteína A Sepharose para eliminar contaminantes tales como IgG; y columnas quelantes de metales para unir formas marcadas con epitopos del anticuerpo anti-TASK y del polipéptido TASK. Se pueden emplear diversos métodos de purificación de proteínas y dichos métodos son conocidos en la técnica y están descritos, por ejemplo, en Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990); Scopes *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, New York (1982). La(s) etapa(s) de purificación seleccionada(s) dependerá(n), por ejemplo, de la naturaleza del procedimiento de producción utilizado y del anticuerpo anti-TASK o polipéptido TASK particular producido.

Al utilizar técnicas recombinantes, el anticuerpo puede ser producido intracelularmente, en el espacio periplásmico, o ser directamente segregado al medio. Si el anticuerpo es producido intracelularmente, como primera etapa, se eliminan los restos particulados, ya sean células huésped o fragmentos lisados, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Carter *et al.*, *Bio/ Technology* 10: 163-167 (1992), describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se segregan al espacio periplásmico de *E. coli*. Resumiendo, se descongela la pasta celular en presencia de acetato de sodio (pH 3,5), EDTA y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) a lo largo de aproximadamente 30 min. Se pueden eliminar los restos celulares por centrifugación. Cuando se segrega el anticuerpo al medio, se concentran primeramente, en general, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión usando un filtro de concentración de proteínas comercial, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de proteasas, tal como PMSF, en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes accidentales.

La composición de anticuerpo preparada a partir de las células puede ser purificada usando, por ejemplo, cromatografía en hidroxipatito, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y del isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. Se puede usar proteína A para purificar anticuerpos que se basan en las cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ humanas (Lindmark *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 62: 1-13 (1983)). Se recomienda la proteína G para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humano (Guss *et al.*, *EMBO J.* 5: 1567-1575 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad es más frecuentemente agarosa, pero se dispone de otras matrices. Las matrices mecánicamente estables, tales como vidrio de poro controlado o poli(estirenodivinil)benceno, permiten velocidades de flujo más rápidas y tiempos de procesamiento más cortos que lo que se puede conseguir con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio C_{H3} , la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. Se dispone también de otras técnicas para la purificación de proteínas, tales como fraccionación en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase invertida, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina-SEPHAROSE™, cromatografía en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía en SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio, dependiendo del anticuerpo que se ha de recuperar.

Después de cualquier etapa de purificación preliminar, se puede someter la mezcla que contiene el anticuerpo de interés y contaminantes a cromatografía de interacción hidrofóbica a bajo pH usando un tampón de elución a un pH de entre aproximadamente 2,5 y 4,5, preferiblemente realizada a bajas concentraciones de sal (*v.g.*, de aproximadamente 0-0,25M de sal).

J. Formulaciones farmacéuticas

Se preparan formulaciones terapéuticas de los anticuerpos anti-TASK, oligopéptidos de unión a TASK, moléculas orgánicas de unión a TASK y/o polipéptidos TASK usados según la presente descripción para su almacenamiento mezclando el anticuerpo, polipéptido, oligopéptido o molécula orgánica que tiene el grado deseado de pureza con soportes, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables eventuales (Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o de soluciones acuosas. Los soportes, excipientes o estabilizadores aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones, tales como acetato, Tris, fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, fenol, alcohol butílico o bencilico, alquilparabenes, tales como metil- o propilparabén, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparragina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; tonificantes, tales como trehalosa y cloruro de sodio; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; surfactantes, tales como polisorbato; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos metálicos (*v.g.*, complejos de Zn-proteína); y/o surfactantes no iónicos, tales como TWEEN®, PLURONICS® o polietilenglicol (PEG). El anticuerpo preferiblemente comprende el anticuerpo a una concentración de entre 5 y 200 mg/ml, preferiblemente de entre 10 y 100 mg/ml.

Las presentes formulaciones pueden contener también más de un compuesto activo, según sea necesario para la indicación particular que se esté tratando, preferiblemente los que tienen actividades complementarias que no producen efectos adversos sobre los demás. Por ejemplo, además de un anticuerpo anti-TASK, oligopéptido de unión a TASK o molécula orgánica de unión a TASK, puede ser deseable incluir en la formulación un anticuerpo

adicional, *v.g.*, un segundo anticuerpo anti-TASK que se une a un epitopo diferente sobre el polipéptido TASK, o un anticuerpo para alguna otra diana, tal como un factor de crecimiento que afecta al crecimiento del cáncer particular. Alternativa o adicionalmente, la composición puede incluir además un agente quimioterapéutico, agente citotóxico, citoquina, agente inhibidor del crecimiento, agente antihormonal y/o cardioprotector. Dichas moléculas están adecuadamente presentes en combinación en cantidades efectivas para el fin pretendido.

Los principios activos pueden estar también atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metilmecrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas están divulgadas en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

Se pueden preparar preparaciones de liberación mantenida. Como ejemplos adecuados de preparaciones de liberación mantenida, se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos con forma, *v.g.*, películas, o microcápsulas. Como ejemplos de las matrices de liberación mantenida, se incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato) o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (Patente EE.UU. N° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico, tales como el LUPRON DEPOT® (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-butírico.

Las formulaciones para uso en administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

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

Para determinar la expresión de TASK en el cáncer, se dispone de diversos ensayos de diagnóstico. En una realización, se puede analizar la sobreexpresión de polipéptido TASK por inmunohistoquímica (IHC). Se pueden someter secciones de tejidos embebidas en parafina de una biopsia de tumor al ensayo IHC y se les aplican unos criterios de intensidad de tinción de proteína TASK como sigue:

Puntuación 0 - no se observa ninguna tinción, o se observa tinción de membranas en menos de un 10 % de las células tumorales.

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

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

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

Aquellos tumores con puntuaciones de 0 ó 1+ para la expresión del polipéptido TASK pueden caracterizarse como que no sobreexpresan TASK, mientras que aquellos tumores con puntuaciones de 2+ o 3+ pueden caracterizarse como que sobreexpresan TASK.

Alternativa o adicionalmente, se pueden llevar a cabo ensayos FISH, tales como el INFORM® (vendido por Ventana, Arizona) o el PATHVISION® (Vysis, Illinois), sobre tejido tumoral fijado con formalina y embebido en parafina para determinar el grado (de haberlo) de sobreexpresión de TASK en el tumor.

Se puede evaluar la sobreexpresión o amplificación de TASK usando un ensayo de diagnóstico *in vivo*, *v.g.*, administrando una molécula (tal como un anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica) que se une a la molécula que se ha de detectar y se marca con un marcaje detectable (*v.g.*, un isótopo radiactivo o un marcaje fluorescente) y escaneando externamente al paciente para localizar el marcaje.

Como se ha descrito anteriormente, los anticuerpos anti-TASK, oligopéptidos y moléculas orgánicas tienen diversas aplicaciones no terapéuticas. Los anticuerpos anti-TASK, oligopéptidos y moléculas orgánicas pueden ser útiles para el diagnóstico y la estadificación de cánceres que expresan polipéptido TASK (*v.g.*, en radioimagen). Los anticuerpos, oligopéptidos y moléculas orgánicas son también útiles para la purificación o la inmunoprecipitación del polipéptido TASK a partir de células, para la detección y la cuantificación del polipéptido TASK *in vitro*, *v.g.*, en un ELISA o un Western blot, y para matar y eliminar células que expresan TASK de una población de células mixtas como una etapa en la purificación de otras células.

Actualmente, dependiendo del estadio del cáncer, el tratamiento del cáncer conlleva una o una combinación de las siguientes terapias: cirugía para eliminar el tejido canceroso, terapia de radiación y quimioterapia. La terapia con anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica anti-TASK puede ser especialmente deseable en pacientes de edad que no toleran bien la toxicidad y los efectos colaterales de la quimioterapia y en la enfermedad metastática, donde

la terapia de radiación tiene una utilidad limitada. Los anticuerpos anti-TASK, oligopéptidos y moléculas orgánicas que se dirigen a tumores de la invención son útiles para aliviar cánceres que expresan TASK tras el diagnóstico inicial de la enfermedad o durante las recidivas. Para aplicaciones terapéuticas, el anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica anti-TASK puede ser usado solo o en terapia de combinación con, *v.g.*, hormonas, antiangiogénos o compuestos radiomarcados, o con cirugía, crioterapia y/o radioterapia. Se puede administrar el tratamiento con anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica anti-TASK conjuntamente con otras formas de terapia convencional, ya sea consecutivamente, antes o después de la terapia convencional. Se usan fármacos quimioterapéuticos tales como TAXOTERE® (docetaxel), TAXOL® (paclitaxel), estramustina y mitoxantrona en el tratamiento del cáncer, en particular en pacientes que tienen un buen nivel de riesgo. En el presente método de la invención para tratar o aliviar el cáncer, se puede administrar al paciente con cáncer anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica anti-TASK conjuntamente con el tratamiento con uno o más de los agentes quimioterapéuticos anteriores. En particular, se contempla la terapia de combinación con paclitaxel y derivados modificados (véase, *v.g.*, EP 0.600.517). Se administrará el anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica anti-TASK con una dosis terapéuticamente efectiva del agente quimioterapéutico. En otra realización, se administra el anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica anti-TASK conjuntamente con quimioterapia para aumentar la actividad y la eficacia del agente quimioterapéutico, *v.g.*, paclitaxel. La Physicians' Desk Reference (PDR) divulga dosificaciones de estos agentes que han sido utilizadas en el tratamiento de diversos cánceres. El régimen de dosificación y las dosificaciones de estos fármacos quimioterapéuticos antes mencionados que son terapéuticamente efectivos dependerán del cáncer particular que se esté tratando, del grado de la enfermedad y de otros factores familiares para el médico experto en la técnica, y pueden ser determinados por el médico.

En particular, se administra al paciente un conjugado que comprende un anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica anti-TASK conjugado con un agente citotóxico. Preferiblemente, el inmunocombinado unido a la proteína TASK es interiorizado por la célula, con el resultado de una mayor eficacia terapéutica del inmunocombinado en la muerte de la célula cancerosa a la que se une. Preferiblemente, el agente citotóxico se dirige a, o interfiere con, el ácido nucleico en la célula cancerosa. Se han descrito anteriormente ejemplos de dichos agentes citotóxicos, y éstos incluyen maitansinoides, calicheamicinas, ribonucleasas y ADN endonucleasas.

Los anticuerpos anti-TASK, oligopéptidos, moléculas orgánicas o conjugados de toxinas de los mismos son administrados a un paciente humano según métodos conocidos, tales como administración intravenosa, *v.g.*, en forma de bolo o por infusión continua a lo largo de un período de tiempo, o por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o inhalatoria. Se prefiere la administración intravenosa o subcutánea del anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica.

Se pueden combinar otros regímenes terapéuticos con la administración del anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica anti-TASK. La administración combinada incluye la administración conjunta, usando formulaciones independientes o una única formulación farmacéutica, y la administración consecutiva en cualquier orden, donde preferiblemente existe un período de tiempo en el que ambos (o todos) principios activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas. Preferiblemente, dicha terapia combinada da como resultado un efecto terapéutico sinérgico.

Puede ser también deseable combinar la administración del anticuerpo o anticuerpos, oligopéptidos o moléculas orgánicas anti-TASK con la administración de un anticuerpo dirigido contra otro antígeno tumoral asociado al cáncer particular.

En otro ejemplo, los métodos de tratamiento terapéutico de la presente invención conllevan la administración combinada de un anticuerpo (o anticuerpos), oligopéptidos o moléculas orgánicas anti-TASK y uno o más agentes quimioterapéuticos o agentes inhibidores del crecimiento, incluyendo la administración conjunta de cócteles de diferentes agentes quimioterapéuticos. Los agentes quimioterapéuticos incluyen fosfato de estramustina, prednimustina, cisplatina, 5-fluorouracilo, melfalán, ciclofosfamida, hidroxiaurea e hidroxiaureaxanos (tales como paclitaxel y doxetaxel) y/o antibióticos antraciclina. La preparación y las pautas de dosificación para dichos agentes quimioterapéuticos pueden ser utilizadas según las instrucciones de los fabricantes o por determinación empírica por parte del profesional médico experto. La preparación y las pautas de dosificación para dicha quimioterapia están también descritas en *Chemotherapy Service Ed.*, M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992).

Se puede combinar el anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica con un compuesto antihormonal, *v.g.*, un compuesto antiestrógenos, tal como tamoxifeno; un antiprogesterona, tal como onapristona (véase, EP 616.812); o un antiandrógeno, tal como flutamida, en las dosificaciones conocidas para dichas moléculas. Cuando el cáncer que se ha de tratar es un cáncer independiente de andrógenos, el paciente puede haber sido previamente sometido a una terapia antiandrógenos y, después de que el cáncer se convierte en independiente de andrógenos, se puede administrar al paciente el anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica anti-TASK (y eventualmente otros agentes como aquí se describe).

A veces, puede ser beneficioso administrar conjuntamente también un cardioprotector (para prevenir o reducir la disfunción miocárdica asociada a la terapia) o una o más citoquinas al paciente. Además de los regímenes terapéuticos anteriores, se puede someter al paciente a extirpación quirúrgica de las células cancerosas y/o a

terapia de radiación antes, simultáneamente o después de la terapia con el anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica. Son dosificaciones adecuadas para cualquiera de los agentes anteriores administrados conjuntamente las actualmente utilizadas, y se pueden rebajar debido a la acción combinada (sinergia) del agente y del anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica anti-TASK.

5 Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, el médico escogerá la dosificación y el modo de administración según criterios conocidos. La dosificación apropiada del anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica dependerá del tipo de enfermedad que haya de ser tratada, como se ha definido anteriormente, de la gravedad y el curso de la enfermedad, de si se administra el anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica con fines preventivos o terapéuticos, de la terapia previa, de la historia clínica del paciente y su respuesta al anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica y de la discreción del médico a cargo. El anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica es adecuadamente administrado al paciente de una vez o a lo largo de una serie de tratamientos. Preferiblemente, se administra el anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica por infusión intravenosa o por inyecciones subcutáneas. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, una dosificación candidata inicial para administración al paciente puede ser de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal (v.g., aproximadamente 0,1-15 mg/kg/dosis) de anticuerpo, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o por infusión continua. Un régimen de dosificación puede consistir en administrar una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguida de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg del anticuerpo anti-TASK. Sin embargo, pueden ser útiles otros regímenes de dosificación. Una dosificación diaria típica podría oscilar entre aproximadamente 1 µg/kg y 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores antes mencionados. Para administraciones repetidas a lo largo de varios días o durante más tiempo, dependiendo de la afección, se mantiene el tratamiento hasta producirse una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. El progreso de esta terapia puede ser fácilmente monitorizado por métodos y ensayos convencionales y basándose en criterios conocidos para el médico u otras personas con conocimientos en la materia.

25 Aparte de la administración de la proteína del anticuerpo al paciente, la presente solicitud contempla la administración del anticuerpo por terapia génica. Dicha administración de ácido nucleico codificante del anticuerpo queda amparada por la expresión "administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo". Véase, por ejemplo, WO96/07321, publicada el 14 de marzo de 1996, concerniente al uso de terapia génica para generar anticuerpos intracelulares.

30 Existen dos enfoques principales para introducir el ácido nucleico (eventualmente contenido en un vector) en las células del paciente: *in vivo* y *ex vivo*. Para la administración *in vivo*, se inyecta el ácido nucleico directamente en el paciente, normalmente en el sitio en que se requiere el anticuerpo. Para el tratamiento *ex vivo*, se extraen las células del paciente, se introduce el ácido nucleico en estas células aisladas y se administran las células modificadas al paciente, ya sea directamente o, por ejemplo, encapsuladas en membranas porosas que se implantan en el paciente (véanse, v.g., las Patentes EE.UU. N° 4.892.538 y 5.283.187). Existen varias técnicas disponibles para introducir ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas varían dependiendo de si se transfiere el ácido nucleico a células cultivadas *in vitro* o *in vivo* en las células del huésped pretendido. Como técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico a células de mamíferos *in vitro*, se incluye el uso de liposomas, electroporación, microinyección, fusión celular, DBAE-dextrano, el método de precipitación con fosfato de calcio, etc. Un vector comúnmente utilizado para la administración *ex vivo* del gen es un vector retroviral.

45 Las técnicas de transferencia de ácidos nucleicos *in vivo* actualmente preferidas incluyen la transfección con vectores víricos (tales como adenovirus, virus *Herpes simplex* I o virus adenoasociado) y los sistemas basados en lípidos (son lípidos útiles para la transferencia mediada por lípidos del gen DOTMA, DOPE y DC-Chol, por ejemplo). Para una revisión de protocolos actualmente conocidos para el marcaje de genes y la terapia génica, véase Anderson *et al.*, Science 256: 808-813 (1992). Véase también WO 93/25673 y las referencias que en ella se citan.

50 Los anticuerpos anti-TASK pueden estar en las diferentes formas amparadas por la definición que aquí se da de "anticuerpo". Así, los anticuerpos incluyen anticuerpo de longitud total o intacto, fragmentos de anticuerpo, anticuerpo de secuencia nativa o variantes de aminoácidos, anticuerpos humanizados, quiméricos o de fusión, inmunoconjugados y fragmentos funcionales de los mismos. En los anticuerpos de fusión, se fusiona una secuencia de anticuerpo con una secuencia polipeptídica heteróloga. Los anticuerpos pueden ser modificados en la región Fc para conseguir funciones efectoras deseadas. Como se discute con mayor detalle en las secciones aquí incluidas, con las regiones Fc apropiadas, el anticuerpo desnudo unido a la superficie celular puede inducir citotoxicidad, v.g., por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o por reclutamiento de complemento en la citotoxicidad dependiente del complemento, o por algún otro mecanismo. Alternativamente, cuando es deseable eliminar o reducir la función efectora, para minimizar los efectos colaterales o las complicaciones terapéuticas, se pueden usar otras determinadas regiones Fc.

65 En una realización, el anticuerpo compite por la unión o se une substancialmente al mismo epitopo que los anticuerpos aquí descritos. También se contemplan anticuerpos que tengan las características biológicas de los presentes anticuerpos anti-TASK de la invención, incluyendo específicamente el abordaje de tumores *in vivo* y cualquier característica de inhibición de la proliferación celular o citotóxica.

Se describen aquí con detalle métodos de producción de los anteriores anticuerpos.

Los presentes anticuerpos, oligopéptidos y moléculas orgánicas anti-TASK son útiles para tratar un cáncer que expresa TASK o para aliviar uno o más síntomas del cáncer en un mamífero. Dicho cáncer incluye el cáncer de próstata, el cáncer del tracto urinario, el cáncer de pulmón, el cáncer de mama, el cáncer de colon y el cáncer de ovario, más específicamente el adenocarcinoma de próstata, los carcinomas de células renales, los adenocarcinomas colorrectales, los adenocarcinomas de pulmón, los carcinomas de células escamosas de pulmón y el mesotelioma pleural. Los cánceres abarcan cánceres metastáticos de cualquiera de los anteriores. El anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica es capaz de unirse a al menos una porción de las células cancerosas que expresan polipéptido TASK en el mamífero. En una realización preferida, el anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica es efectivo para destruir o matar células tumorales que expresan TASK o para inhibir el crecimiento de dichas células tumorales, *in vitro* o *in vivo*, al unirse al polipéptido TASK sobre la célula. Dicho anticuerpo incluye un anticuerpo anti-TASK desnudo (no conjugado con ningún agente). Los anticuerpos desnudos que tienen propiedades citotóxicas o de inhibición del crecimiento celular pueden ser además provistos de un agente citotóxico para hacerlos incluso más potentes en la destrucción de las células tumorales. Se pueden conferir propiedades citotóxicas a un anticuerpo anti-TASK, *v.g.*, conjugando el anticuerpo con un agente citotóxico para formar un inmunoconjugado como aquí se describe. El agente citotóxico o un agente inhibidor del crecimiento es preferiblemente una molécula pequeña. Son preferibles las toxinas, tales como la calicheamicina o un maitansinoide y análogos o derivados de los mimos.

Se describe una composición que incluye un anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica anti-TASK de la invención y un soporte. Con el fin de tratar el cáncer, se pueden administrar composiciones al paciente que necesite dicho tratamiento, donde la composición puede incluir uno o más anticuerpos anti-TASK presentes como un inmunoconjugado o como el anticuerpo desnudo. En otro ejemplo, las composiciones pueden incluir estos anticuerpos, oligopéptidos o moléculas orgánicas en combinación con otros agentes terapéuticos, tales como agentes citotóxicos o inhibidores del crecimiento, incluyendo agentes quimioterapéuticos. También se describen formulaciones que incluyen un anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica anti-TASK de la invención y un soporte. En un ejemplo, la formulación es una formulación terapéutica que incluye un soporte farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto son ácidos nucleicos aislados codificantes de los anticuerpos anti-TASK. Se incluyen ácidos nucleicos codificantes de las cadenas tanto H como L, y especialmente los residuos de las regiones hipervariables, y cadenas que codifican el anticuerpo de secuencia nativa, así como variantes, modificaciones y versiones humanizadas del anticuerpo.

También se describen métodos útiles para tratar un cáncer que expresa polipéptido TASK o para aliviar uno o más síntomas del cáncer en un mamífero, consistentes en administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica anti-TASK al mamífero. Se pueden administrar las composiciones terapéuticas del anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica a corto plazo (agudo) o de forma crónica o intermitente, según lo estipule el médico. También se proporcionan métodos de inhibición del crecimiento y de muerte de una célula que expresa polipéptido TASK.

También se describen kits y artículos de fabricación que incluyen al menos un anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica anti-TASK. Los kits que contienen anticuerpos, oligopéptidos o moléculas orgánicas anti-TASK encuentran una utilización, *v.g.*, para ensayos de muerte celular TASK y para la purificación o inmunoprecipitación del polipéptido TASK a partir de células. Por ejemplo, para el aislamiento y la purificación de TASK, el kit puede contener un anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica anti-TASK copulado con perlas (*v.g.*, perlas de Sepharose). Se pueden proporcionar kits que contengan los anticuerpos, oligopéptidos o moléculas orgánicas para la detección y cuantificación de TASK *in vitro*, *v.g.*, en un ELISA o un Western blot. Se puede dotar a dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica útil para la detección de un marcaje, tal como un marcaje fluorescente o un radiomarcaje.

L. Artículos de fabricación y kits

También se describe aquí un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de un cáncer que expresa TASK. El artículo de fabricación consiste en un envase y una etiqueta o prospecto sobre, o asociado a, el envase. Como envases adecuados, se incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, etc. Los envases pueden estar formados por varios materiales, tales como vidrio o plástico. El envase contiene una composición que es efectiva para el tratamiento de la afección cancerosa y puede tener una abertura de acceso estéril (por ejemplo, el envase puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial con un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un principio activo de la composición es un anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica anti-TASK de la invención. La etiqueta o prospecto indica que la composición es utilizada para el tratamiento del cáncer. La etiqueta o el prospecto incluirá además instrucciones para administrar la composición de anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica al paciente con cáncer. Adicionalmente, el artículo de fabricación puede incluir además un segundo envase con un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWF), solución salina tamponada con fosfatos, solución de Ringer y solución de

dextrosa. También puede incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

También se proporcionan kits útiles para diversos fines, *v.g.*, para ensayos de muerte de células que expresan TASK y para la purificación o inmunoprecipitación de polipéptido TASK a partir de células. Para el aislamiento y la purificación del polipéptido TASK, el kit puede contener un anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica anti-TASK copulado con perlas (*v.g.*, perlas de Sepharose). Se pueden proporcionar kits que contengan los anticuerpos, oligopéptidos o moléculas orgánicas para la detección y cuantificación del polipéptido TASK *in vitro*, *v.g.*, en un ELISA o un Western blot. Como con el artículo de fabricación, el kit incluye un envase y una etiqueta o prospecto sobre, o asociado a, el envase. El envase contiene una composición que incluye al menos un anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica anti-TASK de la invención. Se pueden incluir envases adicionales que contengan, *v.g.*, diluyentes y tampones y anticuerpos de control. La etiqueta o prospecto puede proporcionar una descripción de la composición, así como instrucciones para el uso *in vitro* o diagnóstico pretendido.

15 M. Usos para los polipéptidos TASK y los ácidos nucleicos codificantes de los polipéptidos TASK

Las secuencias nucleotídicas (o sus complementarias) codificantes de polipéptidos TASK tienen diversas aplicaciones en la técnica de la biología molecular, incluyendo usos como sondas de hibridación, en el mapeo de cromosomas y genes y en la generación de sondas de ARN y ADN antisentido. El ácido nucleico codificante de TASK será también útil para la preparación de polipéptidos TASK por las técnicas recombinantes aquí descritas, donde esos polipéptidos TASK pueden encontrar un uso, por ejemplo, en la preparación de anticuerpos anti-TASK como aquí se describe.

Se puede usar el gen TASK de secuencia nativa de longitud total, o porciones del mismo, como sondas de hibridación para una librería de ADNc para aislar el ADNc TASK de longitud total o para aislar aún otros ADNc (por ejemplo, los codificantes de variantes naturales de TASK o TASK de otras especies) que tienen una identidad de secuencia deseada con la secuencia TASK nativa aquí divulgada. Eventualmente, la longitud de las sondas será de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 bases. Las sondas de hibridación pueden derivar de regiones al menos parcialmente nuevas de la secuencia nucleotídica nativa de longitud total, donde esas regiones pueden ser determinadas sin excesiva experimentación, o de secuencias genómicas que incluyen promotores, elementos potenciadores e intrones del TASK de secuencia nativa. A modo de ejemplo, un método de cribado consistirá en aislar la región codificante del gen TASK usando la secuencia de ADN conocida para sintetizar una sonda seleccionada de aproximadamente 40 bases. Las sondas de hibridación pueden ser marcadas mediante varios marcajes, incluyendo radionucleótidos, tales como ^{32}P o ^{35}S , o marcajes enzimáticos, tales como fosfatasa alcalina copulada a la sonda mediante sistemas de copulación de avidina/biotina. Se pueden usar sondas marcadas que tengan una secuencia complementaria a la del gen TASK de la presente invención para cribar librerías de ADNc, ADN genómico o ARNm humanos con objeto de determinar con qué miembros de dichas librerías se hibrida la sonda. Se describen técnicas de hibridación con más detalle en los Ejemplos que se darán a continuación. Se pueden emplear de forma similar cualesquiera secuencias EST divulgadas en la presente solicitud como sondas, usando los métodos aquí divulgados.

Otros fragmentos útiles de los ácidos nucleicos codificantes de TASK incluyen oligonucleótidos antisentido o sentido que comprenden una secuencia de ácido nucleico de una sola hélice (ARN o ADN) capaz de unirse a secuencias diana de ARNm TASK (sentido) o de ADN TASK (antisentido). Los oligonucleótidos antisentido o sentido según la presente invención comprenden un fragmento de la región codificante de ADN TASK. Dicho fragmento comprende generalmente al menos aproximadamente 14 nucleótidos, preferiblemente de aproximadamente 14 a 30 nucleótidos. Se describe la capacidad para derivar un oligonucleótido antisentido o sentido, basándose en una secuencia de ADNc codificante de una proteína dada en, por ejemplo, Stein y Cohen (Cancer Res. 48: 2659, 1988), y van der Krol *et al.* (BioTechniques 6: 958, 1988).

La unión de oligonucleótidos antisentido o sentido a secuencias de ácido nucleico diana da lugar a la formación de dúplex que bloquean la transcripción o la traducción de la secuencia diana por uno de varios medios, incluyendo una mayor degradación de los dúplex, una finalización prematura de la transcripción o de la traducción u otros medios. Dichos métodos quedan amparados por la presente invención. Los oligonucleótidos antisentido pueden ser utilizados, por lo tanto, para bloquear la expresión de proteínas TASK, donde esas proteínas TASK pueden tener un papel en la inducción de cáncer en mamíferos. Los oligonucleótidos antisentido o sentido comprenden además oligonucleótidos que tienen esqueletos de azúcar-fosfodiéster modificados (u otras uniones de azúcar, tales como las descritas en WO 91/06629) y donde dichas uniones de azúcar son resistentes a las nucleasas endógenas. Dichos oligonucleótidos con uniones de azúcar resistentes son estables *in vivo* (es decir, que son capaces de resistir a la degradación enzimática), pero conservan especificidad de secuencia para poder unirse a secuencias nucleotídicas diana.

Otros ejemplos de oligonucleótidos sentido o antisentido incluyen aquellos oligonucleótidos que están covalentemente unidos a restos orgánicos, tales como los descritos en WO 90/10048, y otros restos que aumentan la afinidad del oligonucleótido por una secuencia de ácido nucleico diana, tal como poli-(L-lisina). Aún más, se pueden unir agentes intercalantes, tales como elipticina, y agentes alquilantes o complejos metálicos a

oligonucleótidos sentido o antisentido para modificar las especificidades de unión del oligonucleótido antisentido o sentido para la secuencia nucleotídica diana.

Se pueden introducir oligonucleótidos antisentido o sentido en una célula que contiene la secuencia de ácido nucleico diana por cualquier método de transferencia génica, incluyendo, por ejemplo, la transfección de ADN mediada por CaPO_4 o la electroporación, o utilizando vectores de transferencia génica, tales como el virus Epstein-Barr. En un procedimiento preferido, se inserta un oligonucleótido antisentido o sentido en un vector retroviral adecuado. Se pone en contacto una célula que contiene la secuencia de ácido nucleico diana con el vector retroviral recombinante, ya sea *in vivo* o *ex vivo*. Como vectores retrovirales adecuados, se incluyen, aunque sin limitación, los derivados del retrovirus murino M-MuLV, N2 (un retrovirus derivado de M-MuLV) o los vectores de doble copia designados como DCT5A, DCT5B y DCT5C (véase WO 90/13641).

También se pueden introducir oligonucleótidos sentido o antisentido en una célula que contiene la secuencia nucleotídica diana mediante la formación de un conjugado con una molécula de unión a ligando, como se describe en WO 91/04753. Como moléculas de unión a ligando adecuadas, se incluyen, aunque 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 substancialmente con la capacidad de la molécula de unión a ligando para unirse a su correspondiente molécula o receptor, o para bloquear la entrada del oligonucleótido sentido o antisentido o su versión conjugada en la célula.

Alternativamente, se puede introducir un oligonucleótido sentido o antisentido en una célula que contiene la secuencia de ácido nucleico diana por formación de un complejo oligonucleótido-lípido, como se describe en WO 90/10448. El complejo oligonucleótido sentido o antisentido-lípido se disocia preferiblemente en la célula mediante una lipasa endógena.

Las moléculas de ARN o ADN antisentido o sentido tienen generalmente al menos aproximadamente 5 nucleótidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 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 1.000 nucleótidos de longitud, donde, en este contexto, el término "aproximadamente" significa la longitud de la secuencia nucleotídica referenciada más o menos un 10 % de esa longitud referenciada.

Las sondas también pueden ser empleadas en técnicas de PCR para generar un pool de secuencias para la identificación de secuencias codificantes de TASK estrechamente relacionadas.

También se pueden usar secuencias nucleotídicas codificantes de un TASK para construir sondas de hibridación para mapear el gen que codifica ese TASK y para el análisis genético de individuos con trastornos genéticos. Se pueden mapear las secuencias nucleotídicas aquí provistas en un cromosoma y regiones específicas de un cromosoma usando técnicas conocidas, tales como la hibridación *in situ*, el análisis de unión frente a marcadores cromosómicos conocidos y el cribado de hibridación con librerías.

Cuando las secuencias codificantes para TASK codifican una proteína que se une a otra proteína (por ejemplo, cuando el TASK es un receptor), se puede usar el TASK en ensayos para identificar las otras proteínas o moléculas implicadas en la interacción de unión. Mediante dichos métodos, se pueden identificar inhibidores de la interacción de unión receptor/ligando. También se pueden usar proteínas implicadas en dichas interacciones de unión para cribar inhibidores o agonistas peptídicos o de pequeña molécula de la interacción de unión. Además, se puede usar el TASK receptor para aislar ligando(s) correlativo(s). Se pueden diseñar ensayos de cribado para encontrar compuestos importantes que imiten la actividad biológica de un TASK nativo o un receptor para TASK. Dichos ensayos de cribado incluirán ensayos que puedan ser llevados al cribado de alto rendimiento de librerías químicas, lo que los hace particularmente adecuados para identificar candidatos a fármaco de pequeña molécula. Las moléculas pequeñas contempladas incluyen compuestos orgánicos o inorgánicos sintéticos. Los ensayos pueden ser realizados en varios formatos, incluyendo ensayos de unión proteína-proteína, ensayos de cribado bioquímico, inmunoensayos y ensayos basados en células, que están bien caracterizados en la técnica.

También se pueden usar ácidos nucleicos que codifican TASK o sus formas modificadas para generar animales transgénicos o animales "knock out", los cuales a su vez son útiles en el desarrollo y cribado de reactivos terapéuticamente útiles. Un animal transgénico (v.g., un ratón o una rata) es un animal que tiene células que contienen un transgén, cuyo transgén fue introducido en el animal o en un ancestro del animal en una fase prenatal, v.g., embrionaria. Un transgén es un ADN que se integra en el genoma de una célula a partir de la cual se desarrolla un animal transgénico. En una realización, se puede usar ADNc codificante de TASK para clonar ADN genómico codificante de TASK según técnicas establecidas, y se pueden usar las secuencias genómicas para generar animales transgénicos que contienen células que expresan ADN codificante de TASK. Los métodos para generar animales transgénicos, particularmente animales tales como ratones o ratas, se han vuelto convencionales en la

técnica y se describen, por ejemplo, en las Patentes EE.UU. Nº 4.736.866 y 4.870.009. Normalmente, se buscarían células particulares para incorporación del transgén TASK con potenciadores específicos de tejidos. Los animales transgénicos que incluyen una copia de un transgén codificante de TASK introducido en la línea germinal del animal en una fase embrionaria pueden ser usados para examinar el efecto de la mayor expresión de ADN codificante de TASK. Dichos animales pueden ser utilizados como animales de ensayo para reactivos que se piensa confieren protección frente a, por ejemplo, afecciones patológicas asociadas a su sobreexpresión. Según esta faceta de la invención, se trata a un animal con el reactivo y una reducida incidencia de la afección patológica en comparación con los animales no tratados portadores del transgén indicaría una intervención terapéutica potencial para la afección patológica.

Alternativamente, se pueden usar homólogos no humanos de TASK para construir un animal "knock out" para TASK que tiene un gen defectuoso o alterado codificante de TASK como resultado de una recombinación homóloga entre el gen endógeno codificante de TASK y el ADN genómico alterado codificante de TASK introducido en una célula madre embrionaria del animal. Por ejemplo, se puede usar ADNc codificante de TASK para clonar ADN genómico codificante de TASK según técnicas establecidas. Se puede eliminar una porción del ADN genómico codificante de TASK o reemplazarla con otro gen, tal como un gen codificante de un marcador seleccionable que puede ser usado para monitorizar la integración. Normalmente, se incluyen varias kilobases de ADN flanqueante inalterado (en los extremos tanto 5' como 3') en el vector [véase, *v.g.*, Thomas y Capecchi, *Cell*, 51: 503 (1987) para una descripción de vectores de recombinación homóloga]. Se introduce el vector en una línea de células madre embrionarias (*v.g.*, por electroporación) y se seleccionan las células en las que se ha recombinado el ADN introducido de manera homóloga con el ADN endógeno [véase, *v.g.*, Li *et al.*, *Cell*, 69: 915 (1992)]. Se inyectan entonces las células seleccionadas en un blastocisto de un animal (*v.g.*, un ratón o una rata) para formar quimeras de agregación [véase, *v.g.*, Bradley, en *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152]. Se puede implantar luego un embrión quimérico en una hembra adoptiva pseudogestante adecuada y llevar el embrión a término para crear un animal "knock out". Se puede identificar la progenie que alberga el ADN homológamente recombinado en sus células germinales por técnicas estándar y utilizarla para engendrar animales en los que todas las células del animal contienen el ADN homológamente recombinado. Los animales knockout pueden caracterizarse, por ejemplo, por su capacidad para defenderse frente a ciertas afecciones patológicas y por su desarrollo de afecciones patológicas debido a la ausencia del polipéptido TASK.

También se puede usar ácido nucleico codificante de los polipéptidos TASK en terapia génica. En las aplicaciones de terapia génica, se introducen genes en células para conseguir la síntesis *in vivo* de un producto genético terapéuticamente efectivo, por ejemplo para el reemplazo de un gen defectuoso. "Terapia génica" incluye tanto la terapia génica convencional, donde se consigue un efecto duradero mediante un solo tratamiento, como la administración de agentes terapéuticos génicos, que conlleva la administración de una vez o repetida de un ADN o ARNm terapéuticamente efectivo. Se pueden usar ARN y ADN antisentido como agentes terapéuticos para bloquear la expresión de ciertos genes *in vivo*. Se ha mostrado ya que se pueden importar oligonucleótidos antisentido cortos a células en las que actúan como inhibidores, a pesar de sus bajas concentraciones intracelulares causadas por su restringida captación por la membrana celular. (Zamecnik *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 4143-4146 [1986]). Los oligonucleótidos pueden ser modificados para aumentar su captación, *v.g.*, substituyendo sus grupos fosfodiéster negativamente cargados por grupos no cargados.

Existen varias técnicas disponibles para introducir ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas varían dependiendo de si se transfiere el ácido nucleico a células cultivadas *in vitro* o *in vivo* en las células del huésped pretendido. Como técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico a células de mamífero *in vitro* incluyen el uso de liposomas, electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano, el método de precipitación con fosfato de calcio, etc. Las técnicas de transferencia de genes *in vivo* actualmente preferidas incluyen la transfección con vectores víricos (normalmente retrovíricos) y la transfección mediada por liposomas de la proteína de la cubierta vírica (Dzau *et al.*, *Trends in Biotechnology* 11, 205-210 [1993]). En algunas situaciones, es deseable proporcionar a la fuente de ácido nucleico un agente que se dirija a las células diana, tal como un anticuerpo específico para una proteína de la membrana de la superficie celular de la célula diana, un ligando para un receptor sobre la célula diana, etc. Cuando se emplean liposomas, se pueden usar proteínas que se unen a una proteína de membrana de la superficie celular asociada a endocitosis para dirigirse a la captación y/o facilitarla, *v.g.*, proteínas de la cápside o fragmentos de las mismas que son trópicos para un tipo de célula particular, anticuerpos para proteínas que sufren interiorización en ciclos, proteínas que se dirigen a la localización intracelular y aumentan la semivida intracelular. La técnica de endocitosis mediada por receptores está 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 protocolos de marcaje de genes y terapia génica, véase Anderson *et al.*, *Science* 256, 808-813 (1992).

Las moléculas de ácido nucleico codificantes de los polipéptidos TASK o sus fragmentos aquí descritas son útiles para la identificación cromosómica. En este sentido, existe una necesidad continua de identificar nuevos marcadores cromosómicos, ya que actualmente se dispone de relativamente pocos reactivos de marcaje cromosómico basándose en los datos de secuencia reales. Cada molécula de ácido nucleico TASK de la presente invención puede ser usada como marcador cromosómico.

Los polipéptidos y las moléculas de ácidos nucleicos TASK de la presente invención pueden ser también usados en diagnóstico para la tipificación de tejidos, donde los polipéptidos TASK de la presente invención pueden expresarse diferencialmente en un tejido en comparación con otro, preferiblemente en un tejido enfermo en comparación con un tejido normal del mismo tipo de tejido. Las moléculas de ácido nucleico TASK encontrarán un uso para generar sondas para PCR, análisis Northern, análisis Southern y análisis Western.

Se describen aquí métodos de cribado de compuestos para identificar aquéllos que imiten al polipéptido TASK (agonistas) o que prevengan el efecto del polipéptido TASK (antagonistas). Los ensayos de cribado para candidatos de fármacos antagonistas están diseñados para identificar compuestos que se unen o acomplejan con los polipéptidos TASK codificados por los genes aquí identificados, o que de algún otro modo interfieren con la interacción de los polipéptidos codificados con otras proteínas celulares, incluyendo, *v.g.*, la inhibición de la expresión del polipéptido TASK por las células. Dichos ensayos de cribado incluirán ensayos que puedan ser llevados al cribado de alto rendimiento de librerías químicas, lo que los hace particularmente adecuados para identificar candidatos de fármacos de pequeña molécula.

Los ensayos pueden ser llevados a cabo en varios formatos, incluyendo ensayos de unión proteína-proteína, ensayos de cribado bioquímico, inmunoensayos y ensayos basados en células, que están bien caracterizados en la técnica.

Todos los ensayos para antagonistas tienen en común que requieren el contacto del candidato de fármaco con un polipéptido TASK codificado por un ácido nucleico aquí identificado en condiciones y durante un tiempo suficientes para permitir que estos dos componentes interaccionen.

En los ensayos de unión, la interacción es la unión y el complejo formado puede ser aislado o detectado en la mezcla de reacción. En una realización particular, se inmoviliza el polipéptido TASK codificado por el gen identificado aquí o el candidato de fármaco sobre una fase sólida, *v.g.*, sobre una placa de microtitulación, por uniones covalentes o no covalentes. Se consigue generalmente la unión no covalente revistiendo la superficie sólida con una solución del polipéptido TASK y secando. Alternativamente, se puede usar un anticuerpo inmovilizado, *v.g.*, un anticuerpo monoclonal, específico para el polipéptido TASK que se ha de inmovilizar, para anclarlo a una superficie sólida. Se realiza el ensayo añadiendo el componente no inmovilizado, que puede estar marcado con un marcaje detectable, al componente inmovilizado, *v.g.*, la superficie revestida que contiene el componente anclado. Cuando la reacción se ha completado, se retiran los componentes que no han reaccionado, *v.g.*, por lavado, y se detectan los complejos anclados sobre la superficie sólida. Cuando el componente originalmente no inmovilizado lleva un marcaje detectable, la detección de marcaje inmovilizado sobre la superficie indica que se ha producido acomplejación. Cuando el componente originalmente no inmovilizado no lleva un marcaje, se puede detectar la acomplejación, por ejemplo, usando un anticuerpo marcado que se une específicamente al complejo inmovilizado.

Si el compuesto candidato interacciona con, pero no se une a, un polipéptido TASK particular codificado por un gen aquí identificado, su interacción con ese polipéptido puede ser estudiada por métodos bien conocidos para la detección de interacciones proteína-proteína. Dichos ensayos incluyen enfoques tradicionales, tales como, *v.g.*, entrecruzamiento, coimmunoprecipitación y copurificación a través de gradientes o columnas cromatográficas. Además, se pueden monitorizar las interacciones proteína-proteína utilizando un sistema genético basado en levaduras descrito por Fields y colaboradores (Fields y Song, *Nature* (London), 340: 245-246 (1989); Chien *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 9578-9582 (1991)) y como divulgan Chevray y Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 5789-5793 (1991). Muchos activadores transcripcionales, tales como GAL4 de levaduras, consisten en dos dominios modulares físicamente discretos, uno que actúa como el dominio de unión a ADN y el otro que funciona como el dominio de activación de la transcripción. El sistema de expresión de levaduras descrito en las publicaciones anteriores (al que en general se hace referencia como el "sistema de dos híbridos") se aprovecha de esta propiedad y emplea 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 indicador GAL1-*lacZ* bajo el control de un promotor activado por GAL4 depende de la reconstitución de la actividad GAL4 mediante interacción proteína-proteína. Se detectan las colonias que contienen polipéptidos interaccionantes con un substrato cromogénico para β -galactosidasa. Se dispone de un kit comercial completo (MATCHMAKER™) para identificar interacciones proteína-proteína entre dos proteínas específicas usando la técnica de dos híbridos gracias a Clontech. Este sistema puede también extenderse al mapeo de dominios de proteínas implicados en interacciones de proteínas específicas, así como a la ubicación de residuos de aminoácidos que son cruciales para estas interacciones.

Se pueden estudiar los compuestos que interfieren con la interacción de un gen codificante de un polipéptido TASK aquí identificado y otros componentes intra- o extracelulares como sigue: normalmente, se prepara una mezcla de reacción que contiene el producto del gen y el componente intra- o extracelular en condiciones y durante un tiempo que permiten la interacción y la unión de los dos productos. Para estudiar la capacidad de un compuesto candidato para inhibir la unión, se lleva a cabo la reacción en ausencia y en presencia del compuesto de ensayo. Además, se puede añadir un placebo a una tercera mezcla de reacción para que sirva como control positivo. Se monitoriza la unión (formación de complejo) entre el compuesto de ensayo y el componente intra- o extracelular presente en la mezcla como se ha descrito aquí con anterioridad. La formación de un complejo en la(s) reacción(es) de control,

pero no en la mezcla de reacción que contiene el compuesto de ensayo, indica que el compuesto de ensayo interfiere con la interacción del compuesto de ensayo y su compañero de reacción.

5 Para estudiar antagonistas, se puede añadir el polipéptido TASK a una célula junto con el compuesto que se ha de
cribar para una actividad particular y la capacidad del compuesto para inhibir la actividad de interés en presencia del
polipéptido TASK indica que el compuesto es un antagonista para el polipéptido TASK. Alternativamente, se puede
detectar antagonistas combinando el polipéptido TASK y un antagonista potencial con receptores de polipéptido
10 TASK o receptores recombinantes unidos a membrana en condiciones apropiadas para un ensayo de inhibición
competitiva. Se puede marcar el polipéptido TASK, tal como por radiactividad, de tal forma que el número de
moléculas de polipéptido TASK unidas puede ser usado para determinar la eficacia del antagonista potencial.
Preferiblemente, se emplea la clonación de expresión, donde se prepara ARN poliadenilado a partir de una célula
que responde al polipéptido TASK y se divide una librería de ADNc creada a partir de este ARN en pools y se utiliza
15 para transfectar células COS u otras células que no responden al polipéptido TASK. Se exponen las células
transfectadas, que se cultivan en portaobjetos de vidrio, a polipéptido TASK marcado. El polipéptido TASK puede ser
marcado por varios medios, incluyendo la yodación o la inclusión de un sitio de reconocimiento para una proteína
cinasa específica de sitio. Después de la fijación y de la incubación, se someten los portaobjetos a análisis
autorradiográfico. Se identifican los pools positivos y se preparan subpools y se retransfectan usando un
20 procedimiento de formación de subpools y de recribado interactivo, para obtener eventualmente un solo clon que
codifica el receptor putativo.

Como enfoque alternativo para la identificación de la unión, se puede unir por fotoafinidad polipéptido TASK
25 marcado con preparaciones de membranas o extractos celulares que expresan la molécula receptora. Se resuelve el
material entrecruzado por PAGE y se expone a una película de rayos X. El complejo marcado que contiene las
proteínas unidas puede ser cortado, resuelto en fragmentos peptídicos y sometido a microsecuenciación proteica.
Se utilizaría la secuencia de aminoácidos obtenida de la microsecuenciación para diseñar un conjunto de sondas
oligonucleotídicas degeneradas para cribar una librería de ADNc e identificar el gen codificante del compañero de
unión putativo.

30 En otro ensayo de antagonistas, se incubarían células de mamífero o una preparación de membranas que expresan
el receptor con polipéptido TASK marcado en presencia del compuesto candidato. Se podría medir entonces la
capacidad del compuesto para aumentar o bloquear esta interacción.

Como ejemplos más específicos de antagonistas potenciales, se incluye un oligonucleótido que se une a las
35 fusiones de inmunoglobulinas con polipéptido TASK, y, en particular, anticuerpos, incluyendo, sin limitación,
anticuerpos y fragmentos de anticuerpos poli- y monoclonales, anticuerpos de una sola cadena, anticuerpos
antiidiotípicos y versiones químicas o humanizadas de dichos anticuerpos o fragmentos, así como anticuerpos y
fragmentos de anticuerpos humanos. Alternativamente, un antagonista potencial puede ser una proteína
estrechamente relacionada, por ejemplo, una forma mutada del polipéptido TASK que reconoce el receptor, pero no
40 imparte ningún efecto, inhibiendo así competitivamente la acción del polipéptido TASK.

Otro antagonista potencial del polipéptido TASK es una construcción de ARN o ADN antisentido preparada usando
tecnología antisentido, donde, *v.g.*, una molécula de ARN o ADN antisentido actúa bloqueando directamente la
45 traducción del ARNm hibridándose con ARNm diana y evitando la traducción de proteínas. Se puede usar tecnología
antisentido para controlar la expresión génica a través de la formación de una triple hélice o de ADN o ARN
antisentido, estando ambos métodos basados en la unión de un polinucleótido a ADN o ARN. Por ejemplo, se usa la
porción codificante 5' de la secuencia polinucleotídica, que codifica aquí los polipéptidos TASK maduros, para
diseñar un oligonucleótido de ARN antisentido de aproximadamente 10 a 40 pares de bases de longitud. Se diseña
un oligonucleótido de ADN para que sea complementario de una región del gen implicado en la transcripción (triple
50 hélice - véanse 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 TASK. El oligonucleótido de
ARN antisentido se hibrida con el ARNm *in vivo* y bloquea la traducción de la molécula de ARNm en el polipéptido
TASK (antisense - Okano, Neurochem., 56: 560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene
Expression (CRC Press: Boca Raton, FL, 1988)). Los oligonucleótidos antes descritos pueden ser también
55 suministrados a células, de tal modo que el ARN o ADN antisentido puede expresarse *in vivo* para inhibir la
producción del polipéptido TASK. Cuando se usa ADN antisentido, se prefieren los oligodesoxirribonucleótidos
derivados del sitio de iniciación de la traducción, *v.g.*, entre aproximadamente las posiciones -10 y +10 de la
secuencia nucleotídica del gen diana.

60 Como antagonistas potenciales, se incluyen pequeñas moléculas que se unen al sitio activo o a otro sitio de unión
relevante del polipéptido TASK, bloqueando así la actividad biológica normal del polipéptido TASK. Como ejemplos
de pequeñas moléculas, se incluyen, aunque sin limitación, pequeños péptidos o moléculas de tipo péptido,
preferiblemente péptidos solubles, y compuestos orgánicos o inorgánicos no peptídicos sintéticos.

65 Las ribozimas son moléculas de ARN enzimáticas capaces de catalizar la escisión específica del ARN. Las
ribozimas actúan por hibridación específica de secuencia con el ARN diana complementario, seguida de escisión
endonucleolítica. Se pueden identificar sitios de escisión de ribozimas específicos en un ARN diana potencial por

técnicas conocidas. Para más detalles, véanse, *v.g.*, Rossi, *Current Biology*, 4: 469-471 (1994), y la Publicación PCT N° WO 97/33551 (publicada el 18 de septiembre de 1997).

5 Las moléculas de ácido nucleico en la formación de triple hélice usadas para inhibir la transcripción deben ser de hélice sencilla y estar compuestas por desoxinucleótidos. La composición de bases de estos oligonucleótidos está diseñada de tal forma que promueve la formación de la triple hélice mediante las reglas de emparejamiento de bases de Hoogsteen, que generalmente requieren tramos considerables de purinas o pirimidinas en una hélice de un dúplex. Para más detalles, véase, *v.g.*, la Publicación PCT N° WO 97/33551, *supra*.

10 Estas pequeñas moléculas pueden ser identificadas por cualquiera de los ensayos de cribado aquí discutidos con anterioridad y/o por cualquier otra técnica de cribado bien conocida para los expertos en la materia.

15 Se puede usar aquí ácido nucleico codificante de polipéptido TASK aislado para producir recombinantemente polipéptido TASK utilizando técnicas bien conocidas en este campo y como aquí se describe. A su vez, se pueden emplear los polipéptidos TASK producidos para generar anticuerpos anti-TASK utilizando técnicas bien conocidas en este campo y como aquí se describe.

20 Se pueden administrar anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido TASK aquí identificado, así como otras moléculas identificadas por los ensayos de cribado aquí divulgados con anterioridad, para el tratamiento de diversos trastornos, incluyendo el cáncer, en forma de composiciones farmacéuticas.

25 Si el polipéptido TASK es intracelular y se usan anticuerpos completos como inhibidores, se prefieren los anticuerpos de interiorización. Sin embargo, también se pueden usar lipofecciones o liposomas para suministrar el anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo, a las células. Cuando se usan fragmentos de anticuerpos, se prefiere el fragmento inhibidor de menor tamaño que se une específicamente al dominio de unión de la proteína diana. Por ejemplo, basándose en las secuencias de región variable de un anticuerpo, se pueden diseñar moléculas peptídicas que conserven la capacidad de unirse a la secuencia proteica diana. Dichos péptidos pueden ser sintetizados químicamente y/o producidos por tecnología del ADN recombinante. Véase, *v.g.*, Marasco *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7889-7893 (1993).

30 La presente formulación puede contener también más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se esté tratando, preferiblemente aquéllos que tienen actividades complementarias que no se afectan entre sí de manera adversa. Alternativamente, o además, la composición puede incluir un agente que potencie su función, tal como, por ejemplo, un agente citotóxico, una citoquina, un agente quimioterapéutico o un agente inhibidor del crecimiento. Dichas moléculas están adecuadamente presentes en combinación en cantidades efectivas para el fin pretendido.

35 Se ofrecen los siguientes ejemplos únicamente con fines ilustrativos, y éstos no pretenden limitar el alcance de la presente invención en modo alguno.

40 **Ejemplos**

45 Se utilizaron los reactivos comerciales a los que se hace referencia en los ejemplos según las instrucciones del fabricante, a menos que se indique algo diferente. La fuente de las células identificadas en los siguientes ejemplos, y a través de toda la memoria descriptiva, por los números de acceso ATCC es la American Type Culture Collection, Manassas, VA.

Ejemplo 1: Determinación del perfil de expresión en tejidos usando GeneExpress®

50 Se analizó una base de datos patentada que contenía información sobre expresión génica (GeneExpress®, Gene Logic Inc., Gaithersburg, MD) en un intento de identificar polipéptidos (y sus ácidos nucleicos codificantes) cuya expresión estuviera significativamente regulada a más en un tejido(s) tumoral(es) particular(es) de interés en comparación con otro(s) tumor(es) y/o tejidos normales. Específicamente, se realizó el análisis de la base de datos GeneExpress® usando, o bien un programa disponible a través de Gene Logic Inc., Gaithersburg, MD, para uso con la base de datos GeneExpress®, o bien un programa patentado transcrito y desarrollado en Genentech, Inc. para uso con la base de datos GeneExpress®. La valoración de los resultados positivos en el análisis se basa en varios criterios, incluyendo, por ejemplo, la especificidad de tejido, la especificidad de tumor y el nivel de expresión en tejidos esenciales normales y/o proliferativos normales. La siguiente es una lista de moléculas cuyo perfil de expresión en tejidos determinado a partir de un análisis de la base de datos GeneExpress® evidencia una alta expresión en tejidos y una significativa regulación a más de la expresión en un tumor o tumores específicos en comparación con otro(s) tumor(es) y/o tejidos normales, y eventualmente una relativamente baja expresión en tejidos esenciales normales y/o proliferativos normales. Como tales, las moléculas enumeradas a continuación son excelentes dianas polipeptídicas para el diagnóstico y la terapia del cáncer en mamíferos.

Molécula	regulación a más de la expresión en:	en comparación con:
DNA269860 (TASK112)	tumor linfoide	tejido linfoide normal

DNA269860 (TASK112)	tumor testicular	tejido testicular normal
DNA269860 (TASK112)	tumor uterino	tejido uterino normal
DNA269860 (TASK112)	tumor de vejiga	tejido de vejiga normal

5 **Ejemplo 2:** Verificación de la expresión diferencial de polipéptido TASK por GEPIS

Se analizaron y verificaron los polipéptidos TASK que pudieron ser identificados como antígeno tumoral según se describe en uno o más de los Ejemplos anteriores como sigue. Se buscó en una base de datos de ADN de marcador de secuencia expresada (EST) (LIFESEQ[®], Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA) y se identificaron las secuencias EST interesantes por GEPIS. Gene expression profiling *silico* (GEPIS) es una herramienta bioinformática desarrollada en Genentech, Inc. que caracteriza genes de interés en cuanto a nuevas dianas terapéuticas para el cáncer. GEPIS saca provecho de grandes cantidades de secuencia EST e información de librerías para determinar los perfiles de expresión génica. GEPIS es capaz de determinar el perfil de expresión de un gen basándose en su correlación proporcional con el número de sus apariciones en bases de datos EST, y funciona integrando la base de datos relacional LIFESEQ[®] EST y la información patentada Genentech de una forma rigurosa y estadísticamente significativa. En este ejemplo, se usa GEPIS para identificar y hacer una validación cruzada de nuevos antígenos tumorales, aunque GEPIS puede configurarse para realizar análisis muy específicos o tareas de amplios cribados. Para el cribado inicial, se usa GEPIS para identificar secuencias EST a partir de la base de datos LIFESEQ[®] que se correlacionan con la expresión en un tejido o tejidos particulares de interés (frecuentemente un tejido tumoral de interés). Se sometieron entonces las secuencias EST identificadas en este cribado inicial (o secuencias de consenso obtenidas de la alineación de múltiples secuencias EST relacionadas y solapantes obtenidas del cribado inicial) a un cribado destinado a identificar el marco abierto de lectura en la proteína codificada. Finalmente, se empleó GEPIS para generar un perfil completo de expresión en tejidos para las diversas secuencias de interés. Utilizando este tipo de bioinformática de cribado, se identificaron diversos polipéptidos TASK (y sus moléculas de ácido nucleico codificantes) como significativamente sobreexpresados en un tipo particular de cáncer o en ciertos cánceres en comparación con otros cánceres y/o tejidos no cancerosos normales. La valoración de los resultados de GEPIS se basa en varios criterios, incluyendo, por ejemplo, la especificidad de tejido, la especificidad de tumor y el nivel de expresión en tejidos esenciales normales y/o proliferativos normales. La siguiente es una lista de moléculas cuyo perfil de expresión en tejidos determinado por GEPIS evidencia una alta expresión en tejidos y una significativa regulación a más de la expresión en un tumor o tumores específicos en comparación con otro(s) tumor(es) y/o tejidos normales, y eventualmente una relativamente baja expresión en tejidos esenciales normales y/o proliferativos normales. Como tales, las moléculas enumeradas a continuación son excelentes dianas polipeptídicas para el diagnóstico y la terapia del cáncer en mamíferos.

Molécula	regulación a más de la expresión en:	en comparación con:
DNA274277 (TASK115)	tumor mielóide	tejido mielóide normal

40 **Ejemplo 3:** Uso de TASK como sonda de hibridación

El siguiente método describe el uso de una secuencia nucleotídica codificante de TASK como sonda de hibridación para, a saber, el diagnóstico de la presencia de un tumor en un mamífero.

45 También se puede emplear ADN que comprenda la secuencia codificante del TASK de longitud total o maduro como aquí se divulga como sonda para cribar ADN homólogos (tales como los codificantes de variantes naturales de TASK) en librerías de ADNc de tejidos humanos o librerías genómicas de tejidos humanos.

50 Se realiza la hibridación y el lavado de filtros que contienen ADN de cualquiera de las librerías en las siguientes condiciones altamente rigurosas. Se realiza la hibridación de una sonda derivada de TASK radiomarcada con los filtros en una solución de formamida al 50 %, SSC 5x, SDS al 0,1 %, pirofosfato de sodio al 0,1 %, fosfato de sodio 50 mM, pH 6,8, solución de Denhardt 2x y sulfato de dextrano al 10 % a 42 °C durante 20 horas. Se realiza el lavado de los filtros en una solución acuosa de SSC 0,1x y SDS al 0,1 % a 42 °C.

55 Se pueden identificar entonces los ADN que tienen una identidad de secuencia deseada con el ADN codificante del TASK de secuencia nativa de longitud total usando técnicas estándar conocidas en este campo.

Ejemplo 4: Expresión de TASK en *E. coli*

60 Este ejemplo ilustra la preparación de una forma no glicosilada de TASK por expresión recombinante en *E. coli*.

65 Se amplifica inicialmente la secuencia de ADN codificante de TASK usando cebadores de PCR seleccionados. Los cebadores deben contener sitios de enzimas de restricción que se correspondan con los sitios de enzimas de restricción sobre el vector de expresión seleccionado. Se puede emplear varios vectores de expresión. Un ejemplo de un vector adecuado es pBR322 (derivado de *E. coli*; véase Bolivar *et al.*, Gene, 2: 95 (1977)), que contiene genes para la resistencia a ampicilina y a tetraciclina. Se digiere el vector con enzima de restricción y se desfosforila. Se ligan entonces las secuencias amplificadas por PCR en el vector. El vector incluirá preferiblemente secuencias que

codifiquen para un gen de resistencia a antibiótico, un promotor *trp*, un líder de polihis (incluyendo los primeros seis codones de STII, secuencia polihis y sitio de escisión de enterocinasa), la región codificante de TASK, finalizador de la transcripción lambda y un gen *argU*.

- 5 Se usa entonces la mezcla de ligación para transformar una cepa seleccionada de *E. coli* usando los métodos descritos en Sambrook *et al.*, supra. Se identifican los transformantes por su capacidad para crecer sobre placas de LB y se seleccionan después las colonias resistentes al antibiótico. El ADN plasmídico puede ser aislado y confirmado por análisis de restricción y secuenciación de ADN.
- 10 Se pueden cultivar los clones seleccionados durante la noche en medio de cultivo líquido, tal como caldo LB suplementado con antibióticos. Se puede usar a continuación el cultivo de una noche para inocular un cultivo a mayor escala. Se cultivan entonces las células hasta alcanzar una densidad óptica deseada, durante lo cual se activa el promotor de expresión.
- 15 Después de cultivar las células durante varias horas más, se pueden recoger las células por centrifugación. Se puede solubilizar la pella celular obtenida por la centrifugación usando diversos agentes conocidos en la técnica, y se puede purificar entonces la proteína TASK solubilizada usando una columna quelante de metales en condiciones que permitan una estrecha unión de la proteína.
- 20 Se puede expresar TASK en *E. coli* en una forma marcada con poli-His usando el siguiente procedimiento. Se amplifica inicialmente el ADN codificante de TASK usando cebadores de PCR seleccionados. Los cebadores contendrán sitios de enzimas de restricción que se correspondan con los sitios de enzimas de restricción sobre el vector de expresión seleccionado y otras secuencias útiles que proporcionen una iniciación de la traducción eficaz y fiable, una rápida purificación sobre una columna de quelación de metales y eliminación proteolítica con enterocinasa. Se ligan entonces las secuencias marcadas con poli-His amplificadas por PCR en un vector de expresión, que se usa para transformar un huésped *E. coli* basado en la cepa 52 (W3110 *fuhA(tonA) lon galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq)*). Los transformantes son primeramente cultivados en LB que contiene 50 mg/ml de carbenicilina a 30 °C con agitación hasta alcanzar una D.O. 600 de 3-5. Se diluyen luego los cultivos 50-100 veces en medio CRAP (preparado mezclando 3,57 g de (NH₄)₂SO₄, 0,71 g de citrato de sodio[®] 2H₂O, 1,07 g de KCl, 5,36 g de extracto de levadura Difco y 5,36 g de Sheffield Hy-Case SF en 500 ml de agua, así como MPOS 110 mM, pH 7,3, glucosa al 0,55 % (p/v) y MgSO₄ 7 mM) y se cultivan durante aproximadamente 20-30 horas a 30 °C con agitación. Se retiran muestras para verificar la expresión por análisis de SDS-PAGE y se centrifuga la masa de cultivo para precipitar las células. Se congelan las pellas celulares hasta la purificación y el replegamiento.
- 25
- 30
- 35 Se resuspende la pasta de *E. coli* de fermentaciones de 0,5 a 1 l (pellas de 6-10 g) en 10 volúmenes (p/v) en guanidina 7 M, Tris 20 mM, tampón a pH 8. Se añaden sulfato de sodio y tetratiónato de sodio sólidos para obtener concentraciones finales 0,1M y 0,02 M, respectivamente, y se agita la solución durante la noche a 4 °C. Esta etapa da lugar a una proteína desnaturalizada con todos los residuos de cisteína bloqueados por sulfitolización. Se centrifuga la solución a 40.000 rpm en una Ultracentrifuga Beckman durante 30 min. Se diluye el sobrenadante con 3-5 volúmenes de tampón para columna de quelación de metales (guanidina 6 M, Tris 20 mM, pH 7,4) y se filtra a través de filtros de 0,22 micras para aclararlo. Se carga el extracto aclarado en una columna de quelación de metales Qiagen Ni-NTA de 5 ml equilibrada con el tampón para columna de quelación de metales. Se lava la columna con tampón adicional que contiene imidazol 50 mM (Calbiochem, Utrol grade), pH 7,4. Se eluye la proteína con tampón que contiene imidazol 250 mM. Se reúnen las fracciones que contienen la proteína deseada y se guardan a 4 °C. Se estima la concentración de proteína por su absorbancia a 280 nm usando el coeficiente de extinción calculado basándose en su secuencia de aminoácidos.
- 40
- 45
- Se vuelven a plegar las proteínas diluyendo la muestra lentamente en tampón de replegamiento recién preparado consistente en: Tris 20 mM, pH 8,6, NaCl 0,3 M, urea 2,5 M, cisteína 5 mM, glicina 20 mM y EDTA 1 mM. Se eligen los volúmenes de replegamiento de tal forma que la concentración final de proteína sea de entre 50 y 100 microgramos/ml. Se agita suavemente la solución de replegamiento a 4 °C durante 12-36 horas. Se detiene la reacción de replegamiento por adición de TFA hasta una concentración final del 0,4 % (pH de aproximadamente 3). Antes de una mayor purificación de la proteína, se filtra la solución a través de un filtro de 0,22 micras y se añade acetonitrilo hasta una concentración final del 2-10 %. Se cromatografía la proteína replegada en una columna de fase invertida Poros R1/H usando un tampón móvil de TFA al 0,1 % con elución mediante un gradiente de acetonitrilo del 10 al 80 %. Se analizan alícuotas de las fracciones con una absorbancia A280 sobre geles de SDS poliacrilamida y se reúnen las fracciones que contienen proteína replegada homogénea. En general, las especies apropiadamente replegadas de la mayoría de las proteínas eluyen a las concentraciones más bajas de acetonitrilo, ya que esas especies son las más compactas, con sus interiores hidrofóbicos protegidos de la interacción con la resina de fase invertida. Las especies agregadas normalmente eluyen a concentraciones más altas de acetonitrilo. Además de resolver las formas erróneamente plegadas de proteínas con respecto a la forma deseada, la etapa de fase invertida también elimina endotoxina de las muestras.
- 50
- 55
- 60
- 65 Se reúnen las fracciones que contienen el polipéptido TASK plegado deseado y se elimina el acetonitrilo usando una corriente suave de nitrógeno dirigida a la solución. Se formulan las proteínas en Hepes 20 mM, pH 6,8, con cloruro

de sodio 0,14 M y manitol al 4 % por diálisis o por filtración por gel utilizando resinas G25 Superfine (Pharmacia) equilibradas en el tampón de formulación y se esterilizan por filtración.

5 Algunos de los polipéptidos TASK aquí divulgados han sido eficazmente expresados y purificados usando esta(s) técnica(s).

Ejemplo 5: Expresión de TASK en células de mamíferos

10 Este ejemplo ilustra la preparación de una forma potencialmente glicosilada de TASK por expresión recombinante en células de mamíferos.

Se emplea el vector pRK5 (véase EP 307.247, publicada el 15 de marzo de 1989) como vector de expresión. Eventualmente, se liga el ADN TASK en pRK5 con enzimas de restricción seleccionadas para permitir la inserción del ADN TASK usando métodos de ligación tales como los descritos en Sambrook *et al.*, supra. El vector resultante se denomina pRK5-TASK.

15 En una realización, las células huésped seleccionadas pueden ser células 293. Se cultivan células 293 humanas (ATCC CCL 1573) hasta la confluencia en placas de cultivo de tejidos en un medio tal como DMEM suplementado con suero de ternera fetal y eventualmente componentes nutrientes y/o antibióticos. Se mezclan aproximadamente 20 10 μg de pRK5-ADN TASK con aproximadamente 1 μg de ADN codificante del gen de ARN VA [Thimmapaya *et al.*, Cell, 31: 543 (1982)] y se disuelven en 500 μl de Tris-HCl 1 mM, EDTA 0,1 mM, CaCl_2 0,227 M. Se añaden a esta mezcla gota a gota 500 μl de HEPES 50 mM (pH 7,35), NaCl 280 mM, NaPO_4 1,5 mM, y se deja que se forme un precipitado durante 10 minutos a 25 °C. Se suspende el precipitado y se añade a las células 293 y se deja sedimentar durante aproximadamente cuatro horas a 37 °C. Se aspira el medio de cultivo y se añaden 2 ml de 25 glicerol al 20 % en PBS durante 30 segundos. Se lavan entonces las células 293 con medio libre de suero, se añade medio fresco y se incuban las células durante aproximadamente 5 días.

Aproximadamente 24 horas después de las transfecciones, se retira el medio de cultivo y se reemplaza con medio de cultivo (solo) o con medio de cultivo que contiene 200 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^{35}S -cisteína y 200 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^{35}S -metionina. 30 Después de 12 horas de incubación, se recoge el medio acondicionado, se concentra sobre un filtro giratorio y se carga en un gel de SDS al 15 %. Se puede secar el gel procesado y exponerlo a película durante un período de tiempo seleccionado para revelar la presencia de polipéptido TASK. Los cultivos que contienen células transfectadas pueden sufrir otra incubación (en medio libre de suero) y se estudia el medio en bioensayos seleccionados.

35 En una técnica alternativa, se puede introducir TASK en células 293 de forma transitoria usando el método del sulfato de dextrano descrito por Somparyrac *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 12: 7575 (1981). Se cultivan células 293 hasta la densidad máxima en un matraz giratorio y se añaden 700 μg de pRK5-ADN TASK. Se concentran primeramente las células del matraz giratorio por centrifugación y se lavan con PBS. Se incuban el precipitado de ADN-dextrano sobre la pella de células durante cuatro horas. Se tratan las células con glicerol al 20 % durante 40 segundos, se lavan con medio de cultivo de tejidos y se reintroducen en el matraz giratorio que contiene medio de cultivo de tejidos, 5 $\mu\text{g/ml}$ de insulina bovina y 0,1 $\mu\text{g/ml}$ de transferrina bovina. Después de aproximadamente cuatro días, se centrifuga el medio acondicionado y se filtra para eliminar células y restos. Se puede concentrar entonces la muestra que contiene TASK expresado y purificarla por cualquier método seleccionado, tal como diálisis y/o 45 cromatografía en columna.

En otra realización, se puede expresar TASK en células CHO. Se puede transfectar el pRK5-TASK en células CHO usando reactivos conocidos, tales como CaPO_4 o DEAE-dextrano. Como se ha descrito anteriormente, se pueden 50 incubar los cultivos celulares y reemplazar el medio con medio de cultivo (solo) o medio que contiene un radiomarcaje, tal como ^{35}S -metionina. Después de determinar la presencia de polipéptido TASK, se puede reemplazar el medio de cultivo con medio libre de suero. Preferiblemente, se incuban los cultivos durante aproximadamente 6 días y se recoge luego el medio acondicionado. Se puede concentrar después el medio que contiene el TASK expresado y purificarlo por cualquier método seleccionado.

También se puede expresar TASK marcado con epitopo en células huésped CHO. Se puede subclonar el TASK 55 fuera del vector pRK5. El inserto del subclón puede sufrir PCR para fusionarse en marco con un marcador epitópico seleccionado, tal como un marcador de poli-his, en un vector de expresión de Baculovirus. Se puede subclonar entonces la inserción de TASK marcado con poli-his en un vector dirigido por SV40 que contiene un marcador de selección, tal como DHFR, para la selección de clones estables. Finalmente, se pueden transfectar las células CHO (como se ha descrito anteriormente) con el vector dirigido por SV40. Se puede realizar un marcaje, como se ha 60 descrito anteriormente, para verificar la expresión. Se puede concentrar después el medio de cultivo que contiene el TASK marcado con poli-His expresado y purificarlo por cualquier método seleccionado, tal como cromatografía de afinidad con quelato de Ni^{2+} .

También se puede expresar TASK en células CHO y/o COS mediante un procedimiento de expresión transitoria, o 65 en células CHO por otro procedimiento de expresión estable.

Se realiza la expresión estable en células CHO usando el siguiente procedimiento. Se expresan las proteínas como una construcción de IgG (inmuno adhesina), en donde se fusionan las secuencias codificantes para las formas solubles (v.g., dominios extracelulares) de las respectivas proteínas con una secuencia de región constante de IgG1 que contiene la bisagra y dominios CH2 y CH2 y/o es una forma marcada con poli-His.

Después de la amplificación por PCR, se subclonan los respectivos ADN en un vector de expresión en CHO usando técnicas estándar, como se describe en Ausubel *et al.*, *Current Protocols of Molecular Biology*, Unidad 3.16, John Wiley and Sons (1997). Se construyen vectores de expresión en CHO para que tengan sitios de restricción compatibles 5' y 3' del ADN de interés, con objeto de permitir el conveniente traslado de los ADNc. El vector usado en la expresión en células CHO es como se describe en Lucas *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 24: 9 (1774-1779 (1996), y utiliza el promotor temprano/potenciador de SV40 para dirigir la expresión del ADNc de interés y dihidrofolato reductasa (DHFR). La expresión de DHFR permite la selección para el mantenimiento estable del plásmido después de la transfección.

Se introducen 12 microgramos del ADN plasmídico deseado en aproximadamente 10 millones de células CHO usando los reactivos de transfección comerciales Superfect® (Quiagen), Dosper® o Fugene® (Boehringer Mannheim). Se cultivan las células como se describe en Lucas *et al.*, *supra*. Se congelan aproximadamente 3×10^7 células en una ampolla para posterior cultivo y producción como se describe a continuación.

Se descongelan las ampollas que contienen el ADN plasmídico poniéndolas en un baño de agua y se mezclan mediante agitación en vórtice. Se pipetea los contenidos en un tubo de centrifuga que contiene 10 ml de medio y se centrifugan a 1.000 rpm durante 5 minutos. Se aspira el sobrenadante y se resuspenden las células en 10 ml de medio selectivo (PS20 filtrado por $0,2 \mu\text{m}$ con un 5 % de suero bovino fetal diafiltrado por $0,2 \mu\text{m}$). Se alicuotan entonces las células en un centrifugador de 100 ml que contiene 90 ml de medio selectivo. Después de 1-2 días, se transfieren las células a un centrifugador de 250 ml llenado con 150 ml de medio de crecimiento selectivo y se incuban a 37°C . Después de otros 2-3 días, se siembran centrifugadores de 250 ml, 500 ml y 2.000 ml con 3×10^5 células/ml. Se cambia el medio celular por medio fresco por centrifugación y resuspensión en medio de producción. Aunque se puede emplear cualquier medio adecuado para CHO, se puede usar, de hecho, un medio de producción descrito en la Patente EE.UU. N° 5.122.469, concedida el 16 de junio de 1992. Se siembra un centrifugador de producción de 3 l a razón de $1,2 \times 10^6$ células/ml. El día 0, se determina el pH del número de células. El día 1, se toman muestras del centrifugador y se inicia el burbujeo con aire filtrado. El día 2, se toman muestras del centrifugador, se cambia la temperatura a 33°C y se toman 30 ml de glucosa a 500 g/l y 0,6 ml de antiespumante al 10 % (v.g., emulsión de polidimetilsiloxano al 35 %, Dow Corning 365 Medical Grade Emulsion). A lo largo de la producción, se ajusta el pH según sea necesario para mantenerlo a alrededor de 7,2. Después de 10 días, o hasta que la viabilidad cae por debajo del 70 %, se recoge el cultivo celular por centrifugación y filtración a través de un filtro de $0,22 \mu\text{m}$. Se guarda el filtrado a 4°C o se carga inmediatamente en columnas para su purificación.

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

Se purifican las construcciones de inmuno adhesinas (que contienen Fc) a partir del medio acondicionado como sigue. Se bombea el medio acondicionado sobre una columna de Proteína A de 5 ml (Pharmacia) que había sido equilibrada en tampón fosfato de Na 20 mM, pH 6,8. Después de cargarla, se lava la columna ampliamente con tampón de equilibración antes de la elución con ácido cítrico 100 mM, pH 3,5. Se neutraliza inmediatamente la proteína eluida recogiendo fracciones 1 ml en tubos que contienen 275 μl de tampón Tris 1 M, pH 9. Se desala a continuación la proteína altamente purificada en tampón de almacenamiento como se ha descrito anteriormente para las proteínas marcadas con poli-His. Se valora la homogeneidad mediante geles de SDS poliacrilamida y por secuenciación de aminoácidos N-terminales mediante degradación Edman.

Algunos de los polipéptidos TASK aquí divulgados han sido expresados y purificados con éxito usando esta(s) técnica(s).

60 **Ejemplo 6:** Expresión de TASK en levaduras

El siguiente método describe la expresión recombinante de TASK en levaduras.

En primer lugar, se construyen vectores de expresión en levaduras para la producción intracelular o la secreción de TASK a partir del promotor ADH2/GAPDH. Se inserta ADN codificante de TASK y el promotor en sitios de enzimas de restricción adecuados en el plásmido seleccionado para dirigir la expresión intracelular de TASK. Para la

secreción, se puede clonar ADN codificante de TASK en el plásmido seleccionado, junto con ADN codificante del promotor ADH2/GAPDH, un péptido de señal de mamífero, o, por ejemplo, un factor alfa o secuencia de señal secretora de invertasa/líder de levadura, y secuencias conectoras (de ser necesarias) para la expresión de TASK.

5 Se pueden transformar entonces células de levadura, tal como la cepa de levadura AB110, con los plásmidos de expresión antes descritos y cultivarlas en medios de fermentación seleccionados. Se pueden analizar los sobrenadantes de las levaduras transformadas por precipitación con ácido tricloroacético al 10 % y separación por SDS-PAGE, seguido de tinción de los geles con Azul Coomassie.

10 El TASK recombinante puede ser a continuación aislado y purificado eliminando las células de levadura del medio de fermentación por centrifugación y concentrando luego el medio usando filtros de cartucho seleccionados. El concentrado que contiene TASK puede ser además purificado usando resinas de cromatografía en columna seleccionadas.

15 Algunos de los polipéptidos TASK aquí divulgados han sido expresados y purificados con éxito usando esta(s) técnica(s).

Ejemplo 7: Expresión de TASK en células de insectos infectadas con Baculovirus

20 El siguiente método describe la expresión recombinante de TASK en células de insectos infectadas con Baculovirus.

Se fusiona la secuencia codificante de TASK secuencia arriba de un marcador epitópico contenido en un vector de expresión de baculovirus. Dichos marcadores epitópicos incluyen marcadores de poli-his y marcadores de inmunoglobulinas (como las regiones Fc de IgG). Se pueden emplear varios plásmidos, incluyendo plásmidos derivados de plásmidos comerciales, tales como pVL1393 (Novagen). Resumiendo, se amplifica la secuencia codificante de TASK, la porción deseada de la secuencia codificante de TASK o la secuencia codificante de la proteína madura por PCR con cebadores complementarios a las regiones 5' y 3'. El cebador 5' puede incorporar sitios de enzimas de restricción (seleccionadas) flanqueantes. Se digiere entonces el producto con esas enzimas de restricción seleccionadas y se subclona en el vector de expresión.

30 Se genera baculovirus recombinante cotransfectando el plásmido anterior y ADN vírico BaculoGold™ (Pharmingen) en células de *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") (ATCC CRL 1711) usando lipofectina (comercializada por GIBCO-BRL). Después de 4-5 días de incubación a 28 °C, se recogen los virus liberados y se usan para posteriores amplificaciones. La infección vírica y la expresión proteica son llevadas a cabo como describen O'Reilly *et al.*, Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994).

Se puede purificar entonces el TASK marcado con poli-his expresado, por ejemplo, por cromatografía de afinidad con quelato de Ni²⁺ como sigue. Se preparan extractos a partir de células Sf9 infectadas con virus recombinantes como describen Rupert *et al.*, Nature, 362: 175-179 (1993). Resumiendo, se lavan las células Sf9, se resuspenden en tampón de sonicación (25 ml de Hepes, pH 7,9, MgCl₂ 12,5 mM, EDTA 0,1 mM, glicerol al 10 %, NP-40 al 0,1 %, KCl 0,4 M) y se sonican dos veces durante 20 segundos sobre hielo. Se aclaran los sonicados por centrifugación y se diluye el sobrenadante 50 veces en tampón de carga (fosfato 50 mM, NaCl 300 mM, glicerol al 10 %, pH 7,8) y se filtra a través de un filtro de 0,45 µm. Se prepara una columna de Ni²⁺-NTA agarosa (comercializada por Qiagen) con un volumen de lecho de 5 ml, se lava con 25 ml de agua y se equilibra con 25 ml de tampón de carga. Se carga el extracto celular filtrado en la columna a 0,5 ml por minuto. Se lava la columna hasta la A₂₈₀ basal con tampón de carga, en cuyo punto se inicia la recogida de fracciones. A continuación, se lava la columna con un tampón de lavado secundario (fosfato 50 mM, NaCl 300 mM, glicerol al 10 %, pH 6,0), que eluye la proteína no específicamente unida. Después de alcanzar la línea basal de A₂₈₀ de nuevo, se desarrolla la columna con un gradiente de imidazol de 0 a 500 mM en el tampón de lavado secundario. Se recogen fracciones de 1 ml y se analizan por SDS-PAGE y tinción de plata o Western blot con Ni²⁺-NTA conjugado a fosfatasa alcalina (Qiagen). Se reúnen las fracciones que contienen el TASK macado con His₁₀ eluido y se dializan frente a tampón de carga.

Alternativamente, se puede realizar la purificación del TASK marcado con IgG (o marcado con Fc) usando técnicas cromatográficas conocidas, incluyendo, por ejemplo, la cromatografía en columna de Proteína A o Proteína G.

55 Algunos de los polipéptidos TASK aquí divulgados han sido expresados y purificados con éxito usando esta(s) técnica(s).

Ejemplo 8: Preparación de anticuerpos que se unen a TASK

60 Este ejemplo ilustra la preparación de anticuerpos monoclonales que se pueden unir específicamente a TASK.

Las técnicas para producir los anticuerpos monoclonales son conocidas en este campo y se describen, por ejemplo, en Goding, *supra*. Como inmunógenos que pueden emplearse, se incluyen TASK purificado, proteínas de fusión que contienen TASK y células que expresan TASK recombinante sobre la superficie celular. El experto en la materia puede hacer la selección del inmunógeno sin una excesiva experimentación.

Se inmuniza a ratones, tales como Balb/c, con el inmunógeno TASK emulsionado en adyuvante completo de Freund e inyectado subcutánea o intraperitonealmente en una cantidad de 1-100 microgramos. Alternativamente, se emulsiona el inmunógeno en adyuvante MPL-TDM (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) y se inyecta en las almohadillas de los pies del animal. Se refuerza luego a los ratones inmunizados 10 a 12 días después con inmunógeno adicional emulsionado en el adyuvante seleccionado. A continuación, durante varias semanas, los ratones pueden ser también reforzados con inyecciones de inmunización adicionales. Se pueden obtener periódicamente muestras de suero de los ratones por sangrado retroorbitario para estudio en ensayos ELISA con objeto de detectar anticuerpos anti-TASK.

Después de haber detectado un título adecuado de anticuerpos, se puede administrar a los animales "positivos" para anticuerpos una inyección intravenosa final de TASK. De tres a cuatro días después, se sacrifica a los ratones y se recogen las células esplénicas. Se fusionan entonces las células esplénicas (usando polietilenglicol al 35 con una línea de células de mieloma murino seleccionada, tal como P3X63AgU.1, disponible en la ATCC, N° CRL 1597. Las fusiones generan células de hibridoma que pueden ser luego plaqueadas en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos que contienen medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) para inhibir la proliferación de las células no fusionadas, de los híbridos de mieloma y de los híbridos de células esplénicas.

Las células de hibridoma serán rastreadas en un ELISA en cuanto a reactividad contra TASK. La determinación de células de hibridoma "positivas" que segregan los anticuerpos monoclonales deseados contra TASK está dentro de los conocimientos en la técnica.

Las células de hibridoma positivas pueden ser inyectadas intraperitonealmente a ratones Balb/c singéneos para producir una ascitis que contenga los anticuerpos monoclonales anti-TASK. Alternativamente, las células de hibridoma pueden ser cultivadas en matraces de cultivo de tejidos o botellas rodantes. Se puede conseguir la purificación de los anticuerpos monoclonales producidos en la ascitis usando precipitación con sulfato de amonio, seguida de cromatografía de exclusión en gel. Alternativamente, se puede emplear la cromatografía de afinidad basada en la unión de anticuerpo a proteína A o proteína G.

Se han producido con éxito anticuerpos dirigidos contra algunos de los polipéptidos TASK aquí divulgados usando esta(s) técnica(s).

Ejemplo 9: Purificación de polipéptidos TASK usando anticuerpos específicos

Los polipéptidos TASK nativos o recombinantes pueden ser purificados mediante varias técnicas estándar en el campo de la purificación de proteínas. Por ejemplo, se purifica el propolipéptido TASK, el polipéptido TASK maduro o el prepolipéptido TASK por cromatografía de inmunoafinidad usando anticuerpos específicos para el polipéptido TASK de interés. En general, se construye una columna de inmunoafinidad copulando covalentemente el anticuerpo anti-polipéptido TASK con una resina cromatográfica activada.

Se preparan inmunoglobulinas policlonales a partir de sueros inmunes por precipitación con sulfato de amonio o por purificación sobre Proteína A inmovilizada (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J.). De igual modo, se preparan anticuerpos monoclonales a partir de líquido ascítico de ratones por precipitación con sulfato de amonio o cromatografía sobre Proteína A inmovilizada. Se une covalentemente inmunoglobulina parcialmente purificada a una resina cromatográfica, tal como SEPHAROSE™ activada con CnBr (Pharmacia LKB Biotechnology). Se copula el anticuerpo a la resina, se bloquea la resina y se lava la resina derivada según las instrucciones del fabricante.

Dicha columna de inmunoafinidad es utilizada en la purificación del polipéptido TASK preparando una fracción a partir de células que contienen polipéptido TASK en forma soluble. Se obtiene esta preparación por solubilización de la célula entera o de una fracción subcelular obtenida por centrifugación diferencial mediante la adición de detergente o por otros métodos bien conocidos en la técnica. Alternativamente, se puede segregar polipéptido TASK soluble que contiene una secuencia de señal en una cantidad útil al medio en el que se cultivan las células.

Se pasa una preparación que contiene polipéptido TASK soluble sobre la columna de inmunoafinidad y se lava la columna en condiciones que permiten la absorción preferente del polipéptido TASK (v.g., tampones de alta fuerza iónica en presencia de detergente). Se eluye luego la columna en condiciones que alteran la unión anticuerpo/polipéptido TASK (v.g., un tampón de bajo pH, tal como de aproximadamente pH 2-3, o una concentración elevada de un caótropro, tal como urea o ion tiocianato), y se recoge el polipéptido TASK.

Ejemplo 10: Cribado de fármacos

Esta invención es particularmente útil para cribar compuestos usando polipéptidos TASK o un fragmento de unión del mismo en cualquiera de varias técnicas de cribado de fármacos. El polipéptido TASK o su fragmento empleado en dicha prueba puede estar libre en solución, estar fijado a un soporte sólido, ser llevado sobre la superficie de una célula o localizarse intracelularmente. Un método de cribado de fármacos utiliza células huésped eucarióticas o procarionóticas que se transforman de manera estable con ácidos nucleicos recombinantes que expresan el polipéptido TASK o su fragmento. Los fármacos son rastreados frente a dichas células transformadas en ensayos de unión competitiva. Dichas células, ya sea en forma viable o fijada, pueden ser usadas para ensayos de unión estándar. Se puede medir, por ejemplo, la formación de complejos entre el polipéptido TASK o un fragmento y el agente que se está estudiando. Alternativamente, se puede examinar la disminución en la formación de complejos entre el polipéptido TASK y su célula diana o sus receptores diana causada por el agente que se está estudiando.

Por lo tanto, la presente invención proporciona métodos de cribado para fármacos o cualquier otro agente que pueda afectar a una enfermedad o trastorno asociado al polipéptido TASK. Estos métodos consisten en poner en contacto dicho agente con un polipéptido TASK o fragmento del mismo y estudiar (i) la presencia de un complejo entre el agente y el polipéptido TASK o fragmento, o (ii) la presencia de un complejo entre el polipéptido TASK o fragmento y la célula, por métodos bien conocidos en la técnica. En dichos ensayos de unión competitiva, el polipéptido TASK o fragmento está normalmente marcado. Tras una adecuada incubación, se separa polipéptido TASK o fragmento libre del que está presente en forma unida y la cantidad de marcaje libre o no acomplejado es una medida de la capacidad del agente particular para unirse al polipéptido TASK o para interferir con el complejo polipéptido TASK/célula.

Otra técnica para el cribado de fármacos proporciona un cribado de alto rendimiento para compuestos que tienen una adecuada afinidad de unión por un polipéptido, y se describe con detalle en WO 84/03564, publicada el 13 de septiembre de 1984. Para explicarlo brevemente, se sintetizan grandes números de compuestos de ensayo peptídicos de pequeño tamaño diferentes sobre un sustrato sólido, tal como varillas de plástico o alguna otra superficie. Según se aplica a un polipéptido TASK, los compuestos de ensayo peptídicos reaccionan con polipéptido TASK y se lavan. Se detecta el polipéptido TASK unido por métodos bien conocidos en la técnica. También se pueden revestir directamente placas con polipéptido TASK purificado para uso en las técnicas de cribado de fármacos antes mencionadas. Además, se pueden usar anticuerpos no neutralizantes para capturar el péptido e inmovilizarlo sobre el soporte sólido.

Esta invención también contempla el uso de ensayos de cribado de fármacos competitivos en los que anticuerpos neutralizantes capaces de unirse al polipéptido TASK compiten específicamente con un compuesto de ensayo por la unión al polipéptido TASK o fragmentos del mismo. De este modo, los anticuerpos pueden ser usados para detectar la presencia de cualquier péptido que comparta uno o más determinantes antigénicos con el polipéptido TASK.

Ejemplo 11: Cribado de tumores

Se pueden determinar antagonistas para los polipéptidos TASK *in vivo* por medio de un modelo en ratón desnudo. Se pueden transfectar células de mamífero con cantidades suficientes de plásmido que expresa polipéptido TASK para generar altos niveles de polipéptido TASK en la línea celular. Se puede inyectar por vía subcutánea un número conocido de células con sobreexpresión en el flanco de ratones desnudos. Después de dejar un tiempo suficiente para que un tumor crezca y se haga visible y mensurable (normalmente 2-3 mm de diámetro), los ratones pueden tratarse con el antagonista potencial de TASK. Para determinar si se ha producido un efecto beneficioso, se mide el tumor en milímetros con un calibre Vernier y se calcula la carga tumoral, $\text{Peso del tumor} = (\text{longitud} \times \text{anchura}^2)/2$ (Geran, *et al.*, (1972), *Cancer Chemotherapy Rep.*, 3 1-104). El modelo tumoral en ratones desnudos es un ensayo reproducible para valorar las velocidades de crecimiento tumoral y la reducción de la velocidad de crecimiento tumoral por un posible agente antitumoral de un modo dependiente de dosis. Como ejemplo, se vio que el compuesto 317615-HCL, un inhibidor de la proteína cinasa C β candidato, tenía un efecto antitumoral usando este modelo (Teicher *et al.*, (2002) *Can Chemo Pharm* 49: 69-77).

Se considera que la memoria descriptiva escrita que antecede es suficiente para permitir a un experto en la técnica llevar la invención a la práctica. La presente invención no ha de quedar limitada en su alcance por la construcción depositada, ya que la realización depositada está concebida como una simple ilustración de ciertos aspectos de la invención y cualquier construcción que sea funcionalmente equivalente queda dentro del alcance de esta invención. El depósito de material aquí no constituye una admisión de que la descripción escrita aquí contenida sea inadecuada para permitir la práctica de cualquier aspecto de la invención, incluyendo el mejor modo de la misma, ni se ha de considerar como limitante del alcance de las reivindicaciones a las ilustraciones específicas que representa. De hecho, diversas modificaciones de la invención, además de las aquí mostradas y descritas, resultarán evidentes para los expertos en la técnica gracias a la descripción que antecede.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de diagnóstico de la presencia de un tumor en un mamífero, comprendiendo dicho método detectar el nivel de expresión de un gen codificante de un polipéptido que tiene:
- 10 (a) la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 26 (SEC. N° ID.: 26); o
(b) una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia nucleotídica que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada en la Figura 25 (SEC. N° ID.: 25), en una muestra de ensayo de células de tejidos obtenida de dicho mamífero y en una muestra de control de células normales conocidas del mismo origen tisular, donde un mayor nivel de expresión de dicho gen codificante de un polipéptido en la muestra de ensayo, en comparación con la muestra de control, es indicativo de la presencia de tumor en el mamífero del que se obtuvo la muestra de ensayo, donde dicha muestra de ensayo de células de tejidos procede de tejido linfóide, testicular, uterino o vesical.
- 15 2. El método de la reivindicación 1, donde la etapa que detecta el nivel de expresión de un gen codificante de dicho polipéptido comprende el empleo de un oligonucleótido en un análisis de hibridación *in situ* o de RT-PCR.
- 20 3. El método de la reivindicación 1, donde la etapa que detecta el nivel de expresión de un gen codificante de dicho polipéptido comprende el empleo de un anticuerpo en un análisis de inmunohistoquímica.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el mamífero es un ser humano.

FIGURA 25

GAATTCGGCACGAAGGAGAGTAGCAGTGCCTTGGACCCCAGCTCTCCTCCCCCTTTCTCT
CTAAGGATGGCCAGAGGAGAACTCCTACCCCTGGCCCTACGGCCGACAGACGGCTCCA
TCTGGCCTGAGCACCTGCCCCAGCGAGTCTCCGGAAAGAGCCTGTCACCCCATCTGCA
CTTGTCTCATGAGCCGCTCCAATGTCCAGCCACAGCTGCCCTGGCCAGAAGGTGATG
GAGAATAGCAGTGGGACACCCGACATCTTAACGCGGCACCTCACAAATTGATGACTTGAG
ATTGGGCGTCTCTGGGCAAAGGCAAGTTTGAAACGTGTAATTGGCTCGGGAGAAGAAA
AGCCATTTTCATCGTGGCGCTCAAGGTCTCTTCAAGTCCCAGATAGAGAAGGAGGGCGTG
GAGCATCAGCTGCGCAGAGAGATCGAAATCCAGGCCACCTGCACCATCCCAACATCCCTG
CGTCTTACAACATTTTTATGACCGGAGGAGGATCTACTTGATTCTAGAGTATGCCCC
CGCGGGGAGCTCTACAAGGAGTGCAGAAGAGCTGCACATTTGACGAGCAGCGAACAGCC
ACGATCATGGAGGAGTTGGCAGATGCTCTAATGTACTGCCATGGGAAGAAGGTGATTCAC
AGAGACATAAAGCCAGAAAACTGCTCTTAGGGCTCAAGGGAGAGCTGAAGATTGCTGAC
TTCGGCTGGTCTGTCCATGCCACCTCCCTGAGGAGGAAGACAATGTGTGGCACCCTGGAC
TACCTGCCCCCAGAGATGATGAGGGGCGCATCGACAATGAGAAGGTGGATCTGTGGTGC
ATTGGAGTGTCTTGTATGAGCTGCTGGTGGGGAACCCATTTGAGAGTGCATCACACAAC
GAGACCTATCGCCGCATCGTCAAGGTGGACCTAAAGTTCCTCCGCTTCTGTGCCACGGGA
GCCAGGACCTCATCTCCAACTGCTCAGGCATAACCCCTCGGAACGGCTGCCCTTGCC
CAGTCTCAGCCACCCCTTGGGTCCGGGCCAACTCTCGAGGGTGTGCTCCTCCCTTGCC
CTTCAATCTGTGCGCTGATGGTCCCTGTCAATCACTCGGGTGGTGTGTTTGTATGCTG
TGTATGTATAGGGAAAGAAGGGATCC

FIGURA 26

MAQKENSYPWPYGRQTAPSGLSTLPQRVLRKEPVTPSALVLMRSRNVQPTAAPGQKVMEN
SSGTPDILTRHFTIDDFEIGRPLGKGFVYLVAREKKSHFIVALKVLFKSQIEKEGVEH
QLRREIEIQAHLHHPNILLRNYFYDRRIYLLILEYAPRGELYKELQKSCFFDEQRTATI
MEELADALMYCHGKKVIHRDIKPENLLLGLKGELKIADFGWSVHATSLRRKTMCGTLDYL
PPEMIEGRIDNEKVDLWCIGVLCYELLVGNPFESASHNETYRRIVKVDLKFASVPTGAQ
DLISKLLRHNPSERLPLAQVSAHPWVRANSRRVLPSPALQSV

Sitio de N-glicosilación

60-63
278-281

Sitio de fosforilación de proteína cinasa dependiente de AMPc y de GMP-c

229-232

Sitio de amidación

192-195

Firma de sitio activo de serina/treonina proteína cinasas

196-208

Dominio de proteína cinasa

77-326