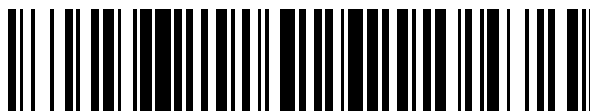


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 493 016**

51 Int. Cl.:

C07K 16/30

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2004** **E 09004091 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.06.2014** **EP 2161283**

54 Título: **Composiciones que comprenden anticuerpos contra CD79b conjugados a un agente inhibidor del crecimiento o un agente citotóxico y procedimientos para el tratamiento de tumores de origen hematopoyético**

30 Prioridad:

17.11.2003 US 520842 P
24.12.2003 US 532426 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.09.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

CROWLEY, CRAIG;
DESAUVAGE, FREDERIC J.;
EATON, DAN L.;
EBENS, ALLEN JR.;
POLSON, ANDREW y
SMITH, VICTORIA

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 493 016 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 que comprenden anticuerpos contra CD79b conjugados a un agente inhibidor del crecimiento o un agente citotóxico y procedimientos para el tratamiento de tumores de origen hematopoyético

CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001] La presente invención se refiere a composiciones de materia para su uso en el tratamiento de linfoma folicular, linfoma de células de manto o linfoma difuso de células grandes.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

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

[0003] Los cánceres que implican células generadas durante la hematopoyesis, un proceso mediante el cual se generan elementos celulares de la sangre, tales como linfocitos, leucocitos, plaquetas, eritrocitos y células asesinas ("killers") naturales, se refieren como cánceres hematopoyéticos. Los linfocitos que se pueden encontrar en la sangre y el tejido linfático y que son críticos para la respuesta inmune se clasifican en dos clases principales de linfocitos: linfocitos B (células B) y linfocitos T (células T), que median en la inmunidad humoral y medida por células, respectivamente.

[0004] Las células B maduran en la médula ósea y dejan que la médula exprese un anticuerpo de unión a antígeno en su superficie celular. Cuando una célula B intacta encuentra primero el antígeno para el que su anticuerpo unido a membrana es específico, la célula empieza a dividirse rápidamente y su progenie a diferenciarse en células B de memoria y células efectoras denominadas "células plasmáticas". Las células B de memoria tienen una esperanza de vida más larga y continúan expresando el anticuerpo unido a membrana con la misma especificidad que la célula parenteral original. Las células plasmáticas no producen el anticuerpo unido a membrana, pero en cambio producen el anticuerpo en una forma que se puede secretar. Los anticuerpos secretados son la molécula efectora principal de la inmunidad humoral.

[0005] Las células T maduran en el timo que proporciona un ambiente para la proliferación y diferenciación de células T inmaduras. Durante la maduración de células T, las células T realizan el reajuste de genes que producen el receptor de células T y la selección positiva y negativa que ayuda a determinar el fenotipo de la superficie celular de la célula T madura. Los marcadores característicos de la superficie celular de células T maduras son el complejo CD3:receptor de célula T y uno de sus correceptores, CD4 o CD8.

[0006] En los intentos por descubrir dianas celulares eficaces para la terapia contra el cáncer, los investigadores han buscado identificar polipéptidos transmembrana u otros polipéptidos asociados a membranas que se expresan específicamente en la superficie de uno o más tipos particulares de células cancerosas en comparación con una o más células no cancerosas normales. A menudo, dichos polipéptidos asociados a membrana se expresan de manera más abundante en la superficie de las células cancerosas en comparación con la superficie de las células no cancerosas. La identificación de polipéptidos antígenos de la superficie celular asociados a tumores ha proporcionado la capacidad de reconocer específicamente células cancerosas para la destrucción a través de terapias basadas en anticuerpos. En este aspecto, cabe indicar que la terapia basada en anticuerpos se ha demostrado muy eficaz en el tratamiento de ciertos tumores. Por ejemplo, HERCEPTIN® y RITUXAN® (ambas de Genentech Inc, South San Francisco, California) son anticuerpos que se han utilizado satisfactoriamente para tratar el cáncer de mama y el linfoma de no Hodgkin, respectivamente. Más específicamente, HERCEPTIN® es un anticuerpo monoclonal humanizado derivado de ADN recombinante que se une selectivamente al dominio extracelular del protooncogén del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2). Se observa la sobreexpresión de la proteína HER2 en el 25-30% de cánceres de mama primarios. RITUXAN® es un anticuerpo monoclonal murino/humano quimérico modificado genéticamente dirigido contra el antígeno CD20 hallado en la superficie de linfocitos B normales u malignos. Estos anticuerpos se producen recombinantemente en células CHO.

[0007] En otros intentos por descubrir dianas celulares eficaces para la terapia contra el cáncer, los investigadores han buscado identificar (1) polipéptidos no asociados a membrana que son producidos específicamente por uno o más tipos particulares de células cancerosas en comparación a por uno o más tipos particulares de células normales no cancerosas, (2) polipéptidos que son producidos por células cancerosas en un nivel de expresión que es significativamente más elevado que el de una o más células normales no cancerosas, o (3) polipéptidos cuya expresión está limitada específicamente a sólo un tipo de tejido (o a un número muy limitado de diferentes tejidos)

tanto en estado canceroso como no canceroso (por ejemplo, tejido de próstata normal y de tumor de próstata). Dichos polipéptidos pueden permanecer localizadas intracelularmente o se puede secretar por la célula cancerosa. Además, dichos polipéptidos pueden expresarse no por la propia célula cancerosa, sino por células que producen y/o secretan polipéptidos que tienen un efecto potenciador o un efecto de aumento del crecimiento en células cancerosas. Dichos polipéptidos secretados son a menudo proteínas que proporcionan células cancerosas con una ventaja de crecimiento sobre las células normales e incluyen cosas, tales como factores angiogénicos, factores de adhesión celular, factores de crecimiento, y similares. Se esperaría que la identificación de antagonistas de dichos polipéptidos no asociados a membrana sirviera como agentes terapéuticos eficaces para el tratamiento de dichos cánceres. Además, la identificación del patrón de expresión de dichos polipéptidos sería útil para el diagnóstico de cánceres particulares en mamíferos.

[0008] A pesar de los avances identificados anteriormente en la terapia contra el cáncer en mamíferos, existe una gran necesidad de agentes terapéuticos adicionales capaces de detectar la presencia de tumores en un mamífero y para inhibir de manera eficaz el crecimiento de células neoplásicas, respectivamente. Por consiguiente, un objetivo de la presente solicitud es identificar polipéptidos, polipéptidos asociados a membrana, secretados o intracelulares, cuya expresión está limitada específicamente a un único tipo de tejido (o un número muy limitado de diferentes tipos de tejido), tejidos hematopoyéticos, tanto en estado canceroso o no canceroso, y utilizar estos polipéptidos, y sus ácidos nucleicos codificantes, para producir composiciones de materia útiles en el tratamiento terapéutico para la detección de cáncer hematopoyético en mamíferos.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

A. Realizaciones

[0009] En la presente memoria, los solicitantes describen por primera vez la identificación de varios polipéptidos celulares (y sus ácidos codificantes o fragmentos de los mismos) que son expresados específicamente tanto por células tumorales como normales de un tipo de célula específico, por ejemplo, células generadas durante la hematopoyesis, es decir, linfocitos, leucocitos, eritrocitos y plaquetas. Todos los polipéptidos anteriores se refieren aquí como polipéptidos Antígenos tumorales de Origen Hematopoyético (polipéptidos "TAHO") y se espera que sirvan como dianas eficaces para la terapia contra el cáncer en mamíferos.

[0010] Por consiguiente, la solicitud describe una molécula de ácido nucleico aislada que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido antígeno tumoral de origen hematopoyético (un polipéptido "TAHO") o un fragmento del mismo.

[0011] En ciertos aspectos, la molécula de ácido nucleico aislada comprende una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ó 100% de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos con (a) una molécula de ADN que codifica un polipéptido TAHO de longitud completa que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se describe aquí, una secuencia de aminoácidos del polipéptido TAHO que carece del péptido señal tal como se ha descrito aquí, un dominio extracelular de un polipéptido TAHO transmembrana, con o sin el péptido señal, tal como se ha descrito aquí o cualquier otro fragmento específicamente definido de una secuencia de aminoácidos de polipéptido TAHO de longitud completa tal como se describe aquí, o (b) el complemento de la molécula de ADN de (a).

[0012] En otros aspectos, la molécula de ácido nucleico aislada comprende una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ó 100% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, con (a) una molécula de ADN que comprende la secuencia codificante de un ADNc del polipéptido TAHO de longitud completa tal como se describe aquí, la secuencia codificante de un polipéptido TAHO que carece del péptido señal tal como se describe aquí, la secuencia codificante de un dominio extracelular de un polipéptido TAHO transmembrana, con o sin el péptido señal, tal como se describe aquí o la secuencia codificante de cualquier otro fragmento específicamente definido de la secuencia de aminoácidos del polipéptido TAHO de longitud completa tal como se describe aquí o (b) el complemento de la molécula de ADN de (a).

[0013] En aspectos adicionales, la solicitud describe una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ó 100% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos con (a) una molécula de ADN que codifica el mismo polipéptido maduro codificado por la región codificante de longitud completa de cualquiera de los ADNcs de proteína humana depositados con la ATCC tal como se describe aquí, o (b) el complemento de la molécula de ADN de (a).

[0014] La solicitud también describe una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de

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

5

[0015] La presente solicitud también describe moléculas de ácido nucleico aisladas que se hibridan a (a) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido TAHO que tiene una secuencia de aminoácidos de longitud completa tal como se describe aquí, una secuencia de aminoácidos del polipéptido TAHO que carece del péptido señal tal como se describe aquí, un dominio extracelular de un polipéptido TAHO transmembrana, con o sin el péptido señal, tal como se describe aquí, o cualquier otro fragmento específicamente definido de una secuencia de aminoácidos del polipéptido TAHO de longitud completa tal como se describe aquí, o (b) el complemento de la secuencia de nucleótidos de (a). En este aspecto, los fragmentos de una secuencia codificante del polipéptido TAHO de longitud completa, o el complemento de la misma, tal como se describe aquí, pueden ser útiles como, por ejemplo, sondas de hibridación útiles como, por ejemplo, sondas de detección, sondas de oligonucleótidos no codificante, o para codificar fragmentos de un polipéptido TAHO de longitud completa que pueden codificar opcionalmente un polipéptido que comprende un sitio de unión para un anticuerpo anti-polipéptido TAHO, un oligopéptido de unión TAHO u otra molécula orgánica pequeña que se une a un polipéptido TAHO. Dichos fragmentos de ácidos nucleicos tienen normalmente por lo menos aproximadamente 5 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 83, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, ó 1000 nucleótidos de longitud, donde en este contexto el término "aproximadamente" significa la longitud de la secuencia de nucleótidos referenciada más o menos un 10% de la longitud referenciada. Cabe indicar que se pueden determinar fragmentos novedosos de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido TAHO de manera rutinaria mediante la alineación de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido TAHO con otras secuencias de nucleótidos conocidas utilizando cualquiera de un conjunto de programas de alineación de secuencias bien conocidos y determinando qué fragmento o fragmentos de la secuencia de nucleótidos que codifican el polipéptido TAHO son nuevos. Se contemplan en la presente invención todos estos fragmentos nuevos de secuencias de nucleótidos que codifican el polipéptido TAHO. También se contemplan los fragmentos de polipéptido TAHO codificados por estos fragmentos de moléculas nucleótidos, preferiblemente aquellos fragmentos de polipéptido TAHO que comprenden un sitio de unión por un anticuerpo anti-TAHO, un oligopéptido de unión a TAHO u otra molécula orgánica pequeña que se une a un polipéptido TAHO.

[0016] La solicitud también describe polipéptidos TAHO aislados codificados por cualquier de las secuencias de ácidos nucleicos aisladas identificadas anteriormente aquí.

[0017] La solicitud también describe un polipéptido TAHO aislado, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ó 100% de identidad en la secuencia de aminoácidos, con un polipéptido TAHO que tiene una secuencia de aminoácidos de longitud completa tal como se describe aquí, una secuencia de aminoácidos del polipéptido TAHO que carece del péptido señal tal como se describe aquí, un dominio extracelular de una proteína polipéptido TAHO transmembrana, con o sin el péptido señal, tal como se describe aquí, una secuencia de aminoácidos codificada por cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos descritas aquí o cualquier otro fragmento de específicamente definido de una secuencia de aminoácidos del polipéptido TAHO de longitud completa tal como se describe aquí.

50

[0018] La solicitud también describe un polipéptido TAHO aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ó 99% de identidad en la secuencia de aminoácidos, con una secuencia de aminoácidos codificada por cualquiera de los ADNcs de proteína humana depositados con la ATCC tal como se describe aquí.

55

[0019] La solicitud describe más específicamente un polipéptido TAHO aislado sin la secuencia señal N-terminal y/o sin la metionina de iniciación y está codificado por una secuencia de nucleótidos que codifica dicha secuencia de aminoácidos descrita anteriormente en la presente invención. Los procesos para producir el mismo también se describen en la presente invención, donde estos procesos comprenden cultivar una célula huésped que comprende un vector que comprende la molécula de ácido nucleico codificante apropiada en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido TAHO y recuperar el polipéptido TAHO del cultivo celular.

60

[0020] También se describe un polipéptido TAHO aislado que presenta el dominio transmembrana eliminado o inactivado. Los procesos para producir el mismo también se describen aquí, donde estos procesos comprenden cultivar una célula huésped que comprende un vector que comprende la molécula de ácido nucleico codificante

65

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

[0021] La solicitud describe además vectores que comprenden ADN que codifica cualquiera de los polipéptidos descritos aquí. También se proporcionan las células huésped que comprenden cualquiera de dichos vectores. A modo de ejemplo, las células huésped pueden ser células CHO, células E. coli, o células de levadura. Se proporciona también un proceso para producir cualquiera de los polipéptidos descritos aquí y comprende cultivar las células huésped en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido deseado y recuperar el polipéptido deseado del cultivo celular.

[0022] También se describen polipéptidos quiméricos aislados que comprende cualquiera de los polipéptidos TAHO descritos aquí fusionados a un polipéptido heterólogo (no TAHO). Ejemplos de dichas moléculas quiméricas comprenden cualquiera de los polipéptidos TAHO descritos aquí fusionados a un polipéptido heterólogo, tal como, por ejemplo, una secuencia epítipo etiqueta o una región Fc de una inmunoglobulina.

[0023] La presente invención proporciona un anticuerpo que se une, preferiblemente específicamente, a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la figura 10, con o sin su péptido señal asociado, para su uso según las reivindicaciones. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo de cadena única o un anticuerpo que inhibe competitivamente la unión de un anticuerpo anti-polipéptido TAHO a su epítipo antigénico respectivo. Los anticuerpos para utilizar en la presente invención se conjugan a un agente inhibidor del crecimiento o un agente citotóxico, tal como una toxina, incluyendo, por ejemplo, un maitansinoide o caliqueamicina, un anticuerpo, un isótopo radioactivo, una enzima nucleolítica o similar. Los anticuerpos útiles en la presente invención se pueden producir opcionalmente en células CHO o células bacterianas y preferiblemente inducen la muerte de una célula a la que se unen. Para el objetivo de la detección, los anticuerpos de la presente invención se pueden marcar para su detección, unirse a un soporte sólido o similar. Los anticuerpos son internalizados por una célula que expresa el polipéptido.

[0024] También se describen vectores que comprenden ADN que codifica cualquiera de los anticuerpos descritos aquí. También se comprende la célula huésped que comprende cualquiera de dichos vectores. A modo de ejemplo, las células huésped pueden ser células CHO, células E. coli, o células de levadura. También se proporciona un proceso para producir cualquiera de los anticuerpos descritos aquí y comprende cultivar células huésped en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo deseado y recuperar el anticuerpo deseado del cultivo celular.

[0025] También se describen oligopéptidos ("oligopéptidos de unión a TAHO") que se unen, preferiblemente específicamente, a cualquiera de los polipéptidos TAHO descritos anterior o posteriormente. Opcionalmente, los oligopéptidos de unión a TAHO de la presente invención se pueden conjugar a un agente inhibidor del crecimiento o un agente citotóxico, tal como una toxina, incluyendo, por ejemplo, un maitansinoide o una caliqueamicina, un antibiótico, un isótopo radioactivo, una enzima nucleolítica, o similar. Los oligopéptidos de unión a TAHO de la presente invención se pueden producir opcionalmente en células CHO o células bacterianas e inducen preferiblemente la muerte de una célula a la que se unen. Para el objetivo de la detección, los oligopéptidos de unión a TAHO de la presente invención se pueden marcar para su detección, unirse a un soporte sólido, o similar.

[0026] También se describen vectores que comprenden ADN que codifica cualquiera de los oligopéptidos de unión a TAHO descritos aquí. También se comprende la célula huésped que comprende cualquiera de dichos vectores. A modo de ejemplo, las células huésped pueden ser células CHO, células E. coli, o células de levadura. También se proporciona un proceso para producir cualquiera de los oligopéptidos de unión a TAHO descritos aquí y comprende cultivar células huésped en condiciones adecuadas para la expresión del oligopéptido deseado y recuperar el oligopéptido deseado del cultivo celular.

[0027] También se describen moléculas orgánicas pequeñas ("moléculas orgánicas de unión a TAHO") que se unen, preferiblemente específicamente, a cualquiera de los polipéptidos TAHO descritos anterior o posteriormente. Opcionalmente, las moléculas orgánicas de unión a TAHO se pueden conjugar a un agente inhibidor del crecimiento o un agente citotóxico, tal como una toxina, incluyendo, por ejemplo, un maitansinoide o una caliqueamicina, un antibiótico, un isótopo radioactivo, una enzima nucleolítica, o similar. Las moléculas orgánicas de unión a TAHO inducen preferiblemente la muerte de una célula a la que se unen. Para el objetivo de la detección, las moléculas orgánicas de unión a TAHO se pueden marcar para su detección, unirse a un soporte sólido, o similar.

[0028] También se describe una composición de material que comprende un polipéptido TAHO tal como se describe aquí, un polipéptido TAHO quimérico tal como se describe aquí, un anticuerpo anti-TAHO tal como se describe aquí, un oligopéptido de unión a TAHO tal como se describe aquí, o una molécula orgánica de unión a TAHO tal como se describe aquí, en combinación con un portador. Opcionalmente, el portador es un portador farmacéuticamente aceptable.

[0029] También se describe un artículo de fabricación que comprende un recipiente y una composición de materia contenida en el recipiente, donde la composición de materia puede comprender un polipéptido TAHO quimérico tal

como se describe aquí, un anticuerpo anti-TAHO tal como se describe aquí, un oligopéptido de unión a TAHO tal como se describe aquí, o una molécula orgánica de unión a TAHO tal como se describe aquí. El artículo puede comprender opcionalmente un marcador fijado al recipiente, o un prospecto incluido en el recipiente, que se refiere al uso de la composición de materia para el tratamiento terapéutico.

5

[0030] Una realización de la presente invención se dirige al uso de un anticuerpo anti-polipéptido TAHO tal como se describe en las reivindicaciones para la preparación de un medicamento para tratar el linfoma folicular, linfoma de células de manto o linfoma difuso de células grandes, en el que dicho anticuerpo está conjugado a un agente inhibidor del crecimiento o un agente citotóxico y está internalizado por una célula del linfoma folicular, una célula del linfoma de células de manto o una célula del linfoma difuso de células grandes que expresan dicho polipéptido e inhibe el crecimiento de las mismas.

10

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

15 **[0031]**

La figura 9 muestra una secuencia de nucleótidos (SEC ID NO: 9) de un ADNc de TAHO5 (PRO36249), donde la SEC ID NO: 9 es un clon designado en la presente invención como "DNA225786" (también referido aquí como "CD79B").

La figura 10 muestra la secuencia de aminoácidos (SEC ID NO: 10) derivada de la secuencia codificante de SEC ID no. 9 mostrada en la figura 9.

20

Las figuras 77A-77D muestran datos de microarrays que muestran la expresión de TAHO5 en muestras normales y en muestras enfermas, tales como la expresión significativa en muestras de Linfoma no de Hodgkin (NHL) y células B normales (NB). Las abreviaturas utilizadas en las figuras se designan de la siguiente manera: Linfoma no de Hodgkin (NHL), linfoma folicular (FL), nódulo de linfoma normal (NLN), células B normales (NB), células de mieloma múltiples (MM), intestino delgado (intestino d.), hígado fetal (hígado f.), músculo liso (músculo l.), cerebro fetal (cerebro f.), células asesinas ("killer") naturales (NK), neutrófilos (N'phil), dendrocitos (DC), células B de memoria (mem B), células plasmáticas (PC), células plasmática de médula ósea (BM PC).

25

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

30

I. Definiciones

[0032] Los términos "polipéptido TAHO" y "TAHO" tal como se utilizan aquí y cuando va seguida inmediatamente por una designación numérica, se refieren a varios polipéptidos, en los que la designación completa (es decir, TAHO/número) se refiere a secuencias de polipéptidos específicas tal como se describen aquí. Los términos "polipéptido TAHO/número" y "TAHO/número" donde el término "número" se proporciona como una designación numérica real tal como se utiliza aquí, comprenden polipéptidos de secuencia nativa, variantes de polipéptidos y fragmentos de polipéptidos de secuencia nativa y variantes de polipéptidos (que se definen posteriormente aquí). Los polipéptidos TAHO descritos en la presente invención se pueden aislar de un conjunto de fuentes, tales como de tipos de tejido humano y de otras fuentes, o se pueden preparar mediante métodos recombinantes o sintéticos. El término "polipéptido TAHO" se refiere a cada polipéptido TAHO/número individual descrito aquí. Todas las descripciones en esta memoria que se refieren al "polipéptido TAHO" se refieren a cada uno de los polipéptidos individualmente, así como de manera conjunta. Por ejemplo, las descripciones de la preparación, purificación, derivación, formación de anticuerpos a o contra, la formación de oligopéptidos de unión a TAHO a o contra, la formación de moléculas orgánicas de unión a TAHO a o contra, la administración de composiciones que contienen, el tratamiento de una enfermedad con, etc., se refieren a cada polipéptido de la invención individualmente. El término "polipéptido TAHO" también incluye variantes de polipéptidos TAHO/número descritos aquí.

35

40

45

[0033] "TAHO1" también se refiere aquí como "RP105", "CD180" o "LY64". "TAHO2" también se refiere aquí como "CD20" o "MS4A1". "TAHO3" también se refiere aquí como "FcRH2" o "SPAP1". "TAHO4" también se refiere aquí como "CD79A". "TAHO5" también se refiere aquí como "CD79B". "TAHO6" también se refiere aquí como "CR2" o "CD21". "TAHO7" también se refiere aquí como "CCR6". "TAHO8" también se refiere aquí como "CD72". "TAHO9" también se refiere aquí como "P2RX5" o "UNQ2170". "TAHO10" también se refiere aquí como "HLA-DOB". "TAHO11" también se refiere aquí como "CXCR5" o "BLR1". "TAHO12" también se refiere aquí como "FCER2" o "CD23". "TAHO13" también se refiere como "GPR2" o "UNQ12100". "TAHO14" también se refiere como "BTig". "TAHO15" también se refiere como "NAG14" o "LRRC4". "TAHO16" también se refiere como "SLGC16270". "TAHO17" también se refiere como "FcRH1" o "IRTA5". "TAHO18" también se refiere como "IRTA2" o "FcRH5". "TAHO19" también se refiere como "ATWD578". "TAHO20" también se refiere como "FcRH3" o "IRTA3". "TAHO21" también se refiere como "IRTA1" o "FcRH4". "TAHO22" también se refiere como "FcRH6" o "FAIL". "TAHO23" también se refiere como "BCMA". "TAHO24" también se refiere como "239287_at". "TAHO25" también se refiere como "CD19". "TAHO26" también se refiere como "CD22". "TAHO27" también se refiere como "CXCR3" o "UNQ8371". "TAHO28" también se refiere como "SILV" o "UNQ1747". "TAHO29" también se refiere como "KCNK4" o "UNQ11492". "TAHO30" también se refiere como "CXorf1" o "UNQ9197". "TAHO31" también se refiere como "LRRN5" o "UNQ256". "TAHO32" también se refiere como "UNQ9308".¹ "TAHO33" también se refiere como "IGSF4B" o "UNQ225". "TAHO34" también se refiere como "BC021 178" o "UNQ13267". "TAHO35" también se refiere como "FLJ12681" o "UNQ6034". "TAHO36" también se refiere como "I_928646" o "UNQ12376".

60

65

[0034] Un "polipéptido TAHO de secuencia nativa" comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el correspondiente polipéptido TAHO derivado de la naturaleza. Dichos polipéptidos TAHO de secuencia nativa pueden aislarse de la naturaleza o pueden producirse mediante medios recombinantes o sintéticos.

5 El término "polipéptido TAHO de secuencia nativa" abarca específicamente las formas truncadas o secretadas naturales del polipéptido TAHO específico (por ejemplo, una secuencia del dominio extracelular), formas variantes naturales (por ejemplo, formas cortadas y empalmadas ("spliced") alternativamente) y variantes alélicas naturales del polipéptido. En varias realizaciones descritas en este documento, los polipéptidos TAHO de secuencia nativa descritos aquí son polipéptidos de secuencia nativa madura o de longitud completa que comprenden las secuencias
10 de aminoácidos de longitud completa que se muestran en las figuras acompañantes. Los codones de inicio y parada (si se indican) se muestran en negrita y subrayados en las figuras. Los residuos de ácidos nucleicos indicados como una "N" en las figuras acompañantes son cualquier residuo de ácido nucleico. Sin embargo, mientras que el polipéptido TAHO descrito en las figuras acompañantes se inicia con los residuos de metionina denominados aquí como aminoácido en la posición 1 en las figuras, es concebible y posible que otros residuos de metionina localizados
15 cadena arriba o cadena abajo de la posición 1 de aminoácidos en las figuras puedan utilizarse como el residuo de aminoácido de partida de los polipéptidos TAHO.

[0035] El "dominio extracelular" o "ECD" del polipéptido TAHO se refiere a una forma del polipéptido TAHO que está libre esencialmente de los dominios transmembrana y citoplasmático. Generalmente, un ECD del polipéptido TAHO
20 tendrá menos del 1% de dichos dominios transmembrana y/o citoplasmático y preferiblemente, tendrá menos del 0,5% de dichos dominios. Se entenderá que cualquier dominio transmembrana identificado para los polipéptidos TAHO de la presente invención se identifican siguiendo los criterios utilizados habitualmente en la técnica para la identificación de ese tipo de dominio hidrofóbico. Los límites exactos de un dominio transmembrana pueden variar, pero más probablemente, en no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquier extremo del dominio tal como
25 inicialmente se identificó aquí. Opcionalmente, por tanto, un dominio extracelular de un polipéptido TAHO puede contener desde aproximadamente 5 o menos aminoácidos en cualquier extremo de los límites del dominio transmembrana/dominio extracelular tal como se identifica en los Ejemplos o la memoria y dichos polipéptidos, con o sin el péptido señal asociado, y el ácido nucleico que los codifica, están contemplados por la presente invención.

[0036] La localización aproximada de los "péptidos señal" de los diversos polipéptidos TAHO descritos aquí se puede mostrar en la presente memoria y/o las figuras acompañantes. Se ha de remarcar, sin embargo, que el límite C-terminal de un péptido señal puede variar, pero más probablemente, en no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquiera de los extremos del límite C-terminal del péptido señal tal como se identificó inicialmente
30 aquí, donde el límite C-terminal del péptido señal puede identificarse según el criterio utilizado de forma rutinaria en la técnica para identificar ese tipo de elemento de secuencia de aminoácidos (por ejemplo, Nielsen y et al., Prot Eng, 10:1-6 (1997) y von Heinje y et al., Nucl Acids Res, 14:4683-4690 (1986)). Además, también se ha reconocido, que, en algunos casos, la división de una secuencia señal de un polipéptido secretado no es totalmente uniforme, dando como resultado más de una especie secretada. Estos polipéptidos maduros, cuando su péptido señal se corta en no más de aproximadamente 5 aminoácidos por cualquier extremo del límite C-terminal del péptido señal identificado
35 aquí, y los polinucleótidos que los codifican, están contemplados por la presente invención.

[0037] "Variante de polipéptido TAHO" significa un polipéptido TAHO, preferiblemente un polipéptido TAHO activo, tal como se define aquí que tiene por lo menos aproximadamente el 80% de identidad en la secuencia con una secuencia de polipéptido TAHO de secuencia nativa de longitud completa tal como se describe aquí, una secuencia
40 de polipéptido TAHO que carece del péptido señal tal como se describe aquí, un dominio extracelular de un polipéptido TAHO, con o sin el péptido señal, tal como se describe aquí, o cualquier otro fragmento de una secuencia de polipéptido TAHO de longitud completa tal como se describe aquí (tales como las codificadas por un ácido nucleico que representa sólo una parte de la secuencia codificante completa para un polipéptido TAHO de longitud completa). Dichas variantes de polipéptido TAHO incluyen, por ejemplo, los polipéptidos TAHO en donde
50 uno o más residuos de aminoácido se añaden, o eliminan, en el extremo N- o C-terminal de la secuencia de aminoácidos nativa de longitud completa. Generalmente, una variante de polipéptido TAHO tendrá por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de aminoácidos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, ó 99% de identidad en la secuencia de aminoácidos con una secuencia de un polipéptido TAHO de
55 secuencia nativa de longitud completa tal como se describe aquí, una secuencia de polipéptido TAHO que carece del péptido señal tal como se describe aquí, un dominio extracelular de un polipéptido TAHO, con o sin el péptido señal, tal como se describe aquí o cualquier otro fragmento definido específicamente de una secuencia de polipéptido TAHO de longitud completa tal como se describe aquí. Generalmente, los polipéptidos variantes de TAHO tienen una longitud de por lo menos aproximadamente 10 aminoácidos, alternativamente de por lo menos
60 aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600 aminoácidos de longitud, o más. Opcionalmente, los polipéptidos variantes de TAHO tendrá no más de una sustitución de aminoácido conservativo en comparación con la secuencia de polipéptido TAHO nativa, alternativamente no más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, ó 10
65 sustituciones de aminoácido conservativo en comparación con la secuencia de polipéptido TAHO nativa.

[0038] El “porcentaje (%) de identidad en la secuencia de aminoácidos” con respecto a las secuencias del polipéptido TAHO identificadas en la presente invención se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos con los residuos de aminoácidos en la secuencia de polipéptido TAHO específica, después de la alineación de las secuencias y la introducción de espacios, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad en la secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de identidad en la secuencia. La alineación con el objetivo de determinar el porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos se puede conseguir de varias maneras que están dentro de la técnica, por ejemplo, utilizando software informático disponible públicamente, tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir el máximo de alineación sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Para los objetivos de la presente invención, sin embargo, los valores en % de la identidad en la secuencia de aminoácidos se generan utilizando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2, en el que el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se proporciona en la Tabla 1. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 era propiedad de Genentech, Inc. y el código fuente mostrado en la Tabla 1 se ha presentado con la documentación del usuario en la U.S. Copyright Office, Washington D.C. 20559, donde está registrado bajo el U.S. Copyright Registration No. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente mediante Genentech Inc., South San Francisco, California o se puede compilar a partir del código fuente proporcionado en la Tabla 1. El programa ALIGN-2 debería compilarse para su utilización en un sistema operativo UNIX, preferiblemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de las secuencias son fijados en el programa ALIGN-2 y no varían.

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

100 veces la fracción X/Y

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

[0040] El “polinucleótido variante de TAHO” o “secuencia de ácidos nucleicos variante de TAHO” significa una molécula de ácido nucleico que codifica una polipéptido TAHO, preferiblemente un polipéptido TAHO activo, tal y como se define a continuación y que tiene por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de polipéptido TAHO de secuencia nativa de longitud completa tal y como se describe en la presente invención, una secuencia de polipéptido TAHO de secuencia nativa y de longitud completa que carece del péptido señal tal y como se describe en la presente invención, un dominio extracelular de un polipéptido TAHO, con o sin el péptido señal, tal y como se describe en la presente invención, o cualquier otro fragmento de una secuencia de polipéptido TAHO de longitud completa tal y como se describe en la presente invención (tales como las codificadas por un ácido nucleico que representa sólo una parte de la secuencia codificante completa para un polipéptido TAHO de longitud completa). Habitualmente, un polinucleótido variante de TAHO tendrá por lo menos aproximadamente un 80% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos, alternativamente por lo menos aproximadamente un 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos con una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia de polipéptido TAHO de secuencia nativa de longitud completa tal y como se describe en la presente invención, una secuencia de polipéptido TAHO de secuencia nativa y longitud completa que carece del péptido señal tal y como se describe en la presente invención, un dominio extracelular de un polipéptido TAHO, con o sin el péptido señal, tal y como se describe en la presente invención, o cualquier otro fragmento de una secuencia de polipéptido TAHO de longitud completa tal y como se describe en la presente invención. Las variantes no comprenden la secuencia de nucleótidos nativa.

[0041] Habitualmente, los polinucleótidos variantes de TAHO tienen por lo menos aproximadamente 5 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750,

760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, ó 1000 nucleótidos de longitud, donde en este contexto el término “aproximadamente” significa la longitud de la secuencia de nucleótidos referenciada más o menos un 10% de esa longitud referenciada.

5 **[0042]** El “porcentaje (%) de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos” con respecto a las secuencias de ácidos nucleicos que codifican el TAHO identificadas en la presente invención se define como el porcentaje de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos con los nucleótidos en la secuencia de ácidos nucleicos que codifica TAHO de interés, después de la alineación de las secuencias y la introducción de espacios, si es necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad en la secuencia. La alineación con el objetivo de determinar el
10 porcentaje de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos se puede conseguir de varias maneras que están dentro de la técnica, por ejemplo, utilizando software informático disponible públicamente, tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR). Para los objetivos de la presente invención, sin embargo, los valores en % de la identidad en la secuencia de ácidos nucleicos se generan utilizando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2, en el que el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se proporciona en la Tabla 1. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 era propiedad de Genentech, Inc. y el código fuente mostrado en la Tabla 1 se ha presentado con la documentación del usuario en la U.S. Copyright Office, Washington D.C. 20559, donde está registrado bajo el U.S. Copyright Registration No. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente mediante Genentech Inc., South San Francisco, California o se puede compilar a partir del código fuente proporcionado en la Tabla 1. El programa ALIGN-2 debería compilarse
15 para su utilización en un sistema operativo UNIX, preferiblemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de las secuencias son fijados en el programa ALIGN-2 y no varían.

[0043] En las situaciones en las que se utiliza ALIGN-2 para las comparaciones de secuencia de ácidos nucleicos, el % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos de una secuencia de ácidos nucleicos determinada C a, con, o
25 contra una secuencia de ácidos nucleicos determinada D (que se puede escribir alternativamente como una secuencia de ácidos nucleicos determinada C que tiene o comprende un cierto % de identidad en la secuencia de ácidos nucleicos a, con, o contra una secuencia de ácidos nucleicos determinada D) se calcula tal y como se indica a continuación:

100 veces la fracción W/Z

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

[0044] En otras realizaciones, los polinucleótidos variantes de TAHO son moléculas de ácido nucleico que codifican
45 un polipéptido TAHO y que son capaces de hibridarse, preferiblemente bajo condiciones de hibridación y lavado astringentes, a secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido TAHO de longitud completa mostrado tal como se describe aquí. Los polipéptidos variantes de TAHO pueden ser aquellos codificados por un polinucleótido variante de TAHO.

50 **[0045]** El término “región codificante de longitud completa” cuando se utiliza en referencia a un ácido nucleico que codifica un polipéptido TAHO se refiere a la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido TAHO de longitud completa de la solicitud (que se muestra a menudo entre los codones de inicio y parada, incluyendo ambos, en las figuras que se acompañan). El término “región codificante de longitud completa” cuando se utiliza en referencia a un ácido nucleico depositado en ATCC se refiere a la parte del ADNc que codifica el polipéptido TAHO que se inserta
55 en el vector depositado con la ATCC (que se muestra a menudo entre los codones de inicio y parada, incluyendo ambos, en las figuras que se acompañan (codones de inicio y parada están en negrita y subrayados en las figuras)).

[0046] El término “aislado”, cuando se utiliza para describir los diversos polipéptidos TAHO descritos en la presente invención, significa polipéptidos que se han identificado y separado y/o recuperado de un componente de su medio
60 natural. Los componentes contaminantes de su medio natural son materiales que habitualmente interferirían con usos terapéuticos para el polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En realizaciones preferidas, se purificará el polipéptido (1) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de una secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante la utilización de un secuenciador de copa giratoria, o (2) hasta una homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones no reductoras o
65 reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. El polipéptido aislado incluye el polipéptido *in situ* en el interior de células recombinantes, ya que por lo menos un componente del medio natural del

polipéptido TAHO no estará presente. Normalmente, sin embargo, el polipéptido aislado se preparará mediante por lo menos una etapa de purificación.

[0047] Un ácido nucleico "aislada" que codifica un polipéptido TAHO o un ácido nucleico que codifica otro polipéptido es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de por lo menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está asociada normalmente en el medio natural del ácido nucleico que codifica el polipéptido. Una molécula de ácido nucleico que codifica el polipéptido aislada es una forma o composición diferente de la que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican un polipéptido se diferencian de la molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido tal y como existen en células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un polipéptido incluye moléculas de ácido nucleico que codifican el polipéptido contenidas en células que normalmente expresan el polipéptido cuando, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales.

[0048] El término "secuencias de control" se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariotas incluyen, por ejemplo, un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión a ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

[0049] Un ácido nucleico está "unido operativamente" cuando está situado en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o secuencia líder secretora está unido operativamente a ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificante si está situado para facilitar la traducción. Generalmente, "unido operativamente" significa que las secuencias de ADN que se unen están contiguas y, en el caso de una secuencia líder secretora, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que estar contiguos. La unión se realiza mediante la unión en los sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, se utilizan los adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos según la práctica convencional.

[0050] La "astringencia" de las reacciones de hibridación se puede determinar fácilmente por un experto habitual en la materia, y generalmente es un cálculo empírico dependiente de la longitud de la sonda, la temperatura de lavado, y la concentración de sal. En general, sondas más largas requieren temperaturas más elevadas para una hibridación más correcta, mientras que sondas más cortas necesitan temperaturas más bajas. La hibridación depende generalmente de la capacidad del ADN desnaturalizado para rehibridarse cuando las cadenas complementarias están presentes en un medio por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor es el grado de homología deseada entre la sonda y la secuencia de hibridación, mayor es la temperatura relativa que se puede utilizar. Como resultado, se deduce que temperaturas relativas superiores tenderían a hacer las condiciones de reacción más astringentes, mientras que temperaturas inferiores no tanto. Para detalles adicionales y explicaciones de la astringencia de las reacciones de hibridación, ver Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995).

[0051] "Condiciones astringentes" o "condiciones de astringencia elevada", tal y como se definen en la presente invención, se pueden identificar por aquéllas que: (1) utilizan una fuerza iónica baja y una temperatura elevada para el lavado, por ejemplo, cloruro sódico 0,015 M/citrato sódico 0,0015 M/dodecil sulfato sódico al 0,1% a 50°C; (2) utilizan durante la hibridación un agente desnaturalizante, tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50% (v/v) con albúmina de suero bovino al 0,1%/Ficol al 0,1%/polivinilpirrolidona al 0,1%/tampón de fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42°C; o (3) utilizan formamida al 50%, 5 x SSC (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico al 0,1%, 5 x solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonificado (50 µg/ml), SDS al 0,1% y sulfato de dextrano al 10% a 42°C, con un lavado de 10 min a 42°C en 0,2 x SSC (cloruro sódico/citrato sódico) seguido de un lavado de astringencia elevada de 10 min que consiste en 0,1 x SSC que contiene EDTA a 55°C.

[0052] Las "condiciones moderadamente astringentes" se pueden identificar tal y como se describen en Sambrook y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen la utilización de una solución de lavado y condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica y % de SDS) menos astringentes que las descritas anteriormente. Un ejemplo de condiciones moderadamente astringentes es la incubación durante toda la noche a 37°C en una solución que comprende: formamida al 20%, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato sódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), 5 x solución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10%, y ADN de esperma de salmón fragmentado desnaturalizado 20 mg/ml, seguido del lavado de los filtros en 1 x SSC a aproximadamente 37-50°C. El experto en la materia sabrá como ajustar la temperatura, la fuerza iónica, etc. necesarias para acomodar factores, tales como la longitud de la sonda y similares.

[0053] El término "epítipo etiquetado", cuando se utiliza en la presente invención, se refiere a un polipéptido químico que comprende un polipéptido TAHO o un anticuerpo anti-TAHO fusionado a un "polipéptido etiqueta". El

polipéptido etiqueta tiene residuos suficientes para proporcionar un epítipo contra el que se puede fabricar un anticuerpo, aunque es suficientemente corto, de manera que no interfiere en la actividad del polipéptido al que se fusiona. El polipéptido etiqueta es también preferiblemente bastante único, de manera que el anticuerpo sustancialmente no reacciona de forma cruzada con otros epítopos. Los polipéptidos etiqueta adecuados tienen generalmente por lo menos seis residuos de aminoácidos y habitualmente entre aproximadamente 8 y 50 residuos de aminoácidos (preferiblemente, entre aproximadamente 10 y 20 residuos de aminoácidos).

[0054] “Activo” o “actividad” para los objetivos de la presente invención se refiere a una forma o formas de un polipéptido TAHO que retiene una actividad biológica y/o inmunológica de un polipéptido TAHO nativo o natural, donde la actividad “biológica” se refiere a una función (inhibidora o estimuladora) provocada por un polipéptido TAHO nativo o natural que es diferente de la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico que se encuentra en un polipéptido TAHO nativo o natural y una actividad “inmunológica” se refiere a la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico que se encuentra en un polipéptido TAHO nativo o natural.

[0055] El término “antagonista” se utiliza en el sentido más amplio, e incluye cualquier molécula que bloquea, inhibe o neutraliza parcial o completamente una actividad biológica de un polipéptido nativo TAHO descrito aquí. De manera similar, el término “agonista” se utiliza en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que mimetiza una actividad biológica de un polipéptido TAHO nativo descrito aquí. Las moléculas agonistas o antagonistas adecuadas incluyen específicamente los anticuerpos o los fragmentos de anticuerpos, fragmentos o variantes en la secuencia de aminoácidos de polipéptidos TAHO nativos, péptidos, oligonucleótidos no codificante, moléculas orgánicas pequeñas, etc., agonistas o antagonistas. Los procedimientos para identificar agonistas o antagonistas de un polipéptido TAHO pueden comprender poner en contacto un polipéptido TAHO con una molécula agonista o antagonista candidata y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas normalmente asociadas con el polipéptido TAHO.

[0056] “Tratar” o “tratamiento” o “alivio” se refieren a tanto un tratamiento terapéutico como con medidas profilácticas o preventivas, en las que el objetivo es prevenir o ralentizar (disminuir) la afección o trastorno patológico reconocido. Los necesitados del tratamiento incluyen aquéllos que ya padecen el trastorno, así como aquéllos propensos a padecer el trastorno o aquéllos a los que debe prevenirse el trastorno. Un sujeto o mamífero es “tratado” satisfactoriamente para una cáncer que expresa el polipéptido TAHO si, después de recibir una cantidad terapéutica de un anticuerpo anti-TAHO, oligopéptido de unión a TAHO o molécula orgánica de unión a TAHO según los métodos de la presente solicitud, el paciente muestra una reducción observable y/o medible o ausencia de uno o más de los siguientes: reducción en el número de células cancerosas o ausencia de células cancerosas; reducción en el tamaño del tumor; inhibición (es decir, ralentización en cierto grado y preferiblemente detención) de la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos incluyendo la extensión del cáncer a tejido blando y hueso; inhibición (es decir, ralentización en cierto grado y preferiblemente detención) de la metástasis tumoral; inhibición, en cierto grado, del crecimiento tumoral; y/o alivio, en cierto grado, de uno o más de los síntomas asociados con el cáncer específico; morbilidad y mortalidad reducidas, y mejora en cuestiones de calidad de vida. Siempre que el anticuerpo anti-TAHO o el oligopéptido de unión a TAHO puedan prevenir el crecimiento y/o la citólisis de células cancerosas existentes, pueden ser citostáticos o citotóxicos. La reducción de estos signos o síntomas también puede ser sentida por el paciente.

[0057] Los parámetros anteriores para evaluar una tratamiento satisfactorio y una mejora en la enfermedad son fácilmente medibles mediante procedimientos de rutina familiares para el médico. Para la terapia contra el cáncer, se puede medir la eficacia, por ejemplo, mediante la valoración del tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP) y/o la determinación de la velocidad de respuesta (RR). La metástasis se puede determinar mediante tests de estadificación y media escaneo óseo y tests de los niveles de calcio y otras enzimas para determinar la expansión hacia los huesos. Los escaneos CT también se pueden realizar para buscar la expansión hacia la pelvis y los nódulos linfáticos en el área. Los rayos X del pecho y la medición de los niveles de enzimas hepáticas mediante métodos conocidos se utilizan para buscar metástasis hacia pulmones e hígado, respectivamente. Otros métodos de rutina para monitorizar la enfermedad incluyen ultrasonografía transrectal (TRUS) y biopsia con aguja transrectal (TRNB).

[0058] 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 mediante citoscopia, monitorización de la presencia de sangre en la orina, visualización del tracto urotelial mediante monografía o un pielograma intravenoso, tomografía computerizada (CT) e imagen por resonancia magnética (MRI). La presencia de metástasis distantes se puede evaluar mediante CT del abdomen, rayos X del pecho u obtención de imágenes por radionucleidos del esqueleto.

[0059] Administración “crónica” se refiere a la administración del agente o agentes de un modo continuo en oposición a un modo agudo, para mantener el efecto (actividad) terapéutica inicial durante un periodo de tiempo largo. Administración “intermitente” es el tratamiento que no se realiza consecutivamente sin interrupción, sino que es cíclico por naturaleza.

[0060] El término “mamífero” con el propósito de tratamiento, o alivio de los síntomas del cáncer, se refiere a

cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo el hombre, animales domésticos y de granja, y animales del zoo, deportivos o de compañía, tales como perros, gatos, ganado, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos etc. Preferiblemente, el mamífero es el hombre.

- 5 **[0061]** La administración “en combinación con” uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea (a la vez) y la administración consecutiva en cualquier orden.

[0062] “Portadores”, tal como se utiliza aquí, incluyen los potadores, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables, que no son tóxicos a la célula o al mamífero que se expone a los mismos en las dosificaciones y concentraciones utilizadas. A menudo, el portador fisiológicamente aceptable es una solución acuosa tamponada de pH. Ejemplos de portadores aceptables fisiológicamente incluyen tampones, tales como fosfato, citrato, y otros ácido orgánicos; antioxidantes incluyendo el ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular

[0063] (inferiores a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como la glicina, la glutamina, la asparagina, la arginina o la lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo la glucosa, la manosa, o las dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; alcoholes de azúcar, tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; y/o tensoactivos no iónicos, tales como TWEENTM, polietilenglicol (PEG) y PLURONICSTM.

[0064] Por “fase sólida” o “soporte sólido” se entiende una matriz no acuosa a la que se puede adherir o unir un anticuerpo, un oligonucleótido de unión a TAHO o una molécula orgánica de unión a TAHO de la presente solicitud. Ejemplos de fases sólidas comprendidas en la presente invención incluyen aquellas formadas parcial o completamente de vidrio (por ejemplo, vidrio de poro controlado), de polisacáridos (por ejemplo, agarosa), de poliacrilamidas, de poliestireno, de polivinil alcohol y de siliconas. En ciertas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otras, es una columna de purificación (por ejemplo, una columna de cromatografía por afinidad). Este término también incluye una fase sólida discontinua de partículas discretas, tal como las descritas en la patente de Estados Unidos no. 4.275.149.

[0065] Un “liposoma” es una vesícula pequeña compuesta de varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensoactivos que es útil para la liberación de un fármaco (tal como un polipéptido TAHO o anticuerpo para el mismo o un oligopéptido de unión a TAHO) a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen habitualmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de los lípidos de las membranas biológicas.

[0066] Una molécula “pequeña” o molécula orgánica “pequeña” se define en la presente invención por tener un peso molecular por debajo de aproximadamente 500 Daltons.

[0067] Una “cantidad eficaz” de un polipéptido, anticuerpo, oligopéptido de unión a TAHO, molécula orgánica de unión a TAHO o un agonista o antagonista de los mismos tal como se describe aquí, es una cantidad suficiente para llevar a cabo un objetivo específicamente indicado. Una “cantidad eficaz” puede determinarse empíricamente y de forma rutinaria, en relación al objetivo indicado.

[0068] El término “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un anticuerpo, polipéptido, oligopéptido de unión a TAHO, molécula orgánica de unión a TAHO u otro fármaco eficaz para “tratar” una enfermedad o trastorno en un sujeto o mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducción en el tamaño del tumor; inhibición (es decir, ralentización en cierto grado y preferiblemente detención) de la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibición (es decir, ralentización en cierto grado y preferiblemente detención) de la metástasis tumoral; inhibición, en cierto grado, del crecimiento tumoral; y/o alivio, en cierto grado, de uno o más de los síntomas asociados con el cáncer. Véase la definición de “tratamiento” en la presente invención. Siempre que el fármaco pueda prevenir el crecimiento y/o la citólisis de células cancerosas existentes, puede ser citostático o citotóxico.

[0069] Una “cantidad inhibidora del crecimiento” de un anticuerpo anti-TAHO, polipéptido TAHO, oligopéptido de unión a TAHO o molécula orgánica de unión a TAHO es una cantidad capaz de inhibir el crecimiento de una célula, especialmente tumoral, por ejemplo, las células cancerosas, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Una “cantidad inhibidora del crecimiento” de un anticuerpo anti-TAHO, polipéptido TAHO, oligopéptido de unión a TAHO o molécula orgánica de unión a TAHO con el propósito de inhibir el crecimiento de células neoplásicas se puede determinar empíricamente y de una manera rutinaria.

[0070] Una “cantidad citotóxica” de un anticuerpo anti-TAHO, polipéptido TAHO, oligopéptido de unión a TAHO o molécula orgánica de unión a TAHO es una cantidad capaz de causar la destrucción de una célula, especialmente tumoral, por ejemplo las células cancerosas, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Una “cantidad citotóxica” de un anticuerpo anti-TAHO, polipéptido TAHO, oligopéptido de unión a TAHO o molécula orgánica de unión a TAHO con el propósito de inhibir el crecimiento de células neoplásicas se puede determinar empíricamente y de una manera rutinaria.

[0071] El término “anticuerpo” se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente, por ejemplo, anticuerpos

monoclonales anti-TAHO individuales (incluyendo agonista, antagonista, y anticuerpos neutralizantes), composiciones de anticuerpos anti-TAHO con especificidad poliepitópica, anticuerpos policlonales, anticuerpos anti-TAHO de cadena única, y fragmentos de anticuerpos anti-TAHO (ver a continuación), siempre y cuando muestren la actividad biológica o inmunológica deseadas. El término "inmunoglobulina" (Ig) se utiliza indistintamente con el anticuerpo de la presente invención.

[0072] Un "anticuerpo aislado" es aquel que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su medio natural. Los componentes contaminantes de su medio natural son materiales que habitualmente interferirían con usos terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En realizaciones preferidas, se purificará el anticuerpo (1) en más de un 95% en peso del anticuerpo determinado por el método de Lowry, y aún más preferiblemente en más de un 99% en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener por lo menos 15 residuos de una secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante la utilización de un secuenciador de copa giratoria, o (3) hasta una homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* en el interior de células recombinantes, ya que por lo menos un componente del medio natural del anticuerpo no estará presente. Normalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante por lo menos una etapa de purificación.

[0073] La unidad básica del anticuerpo de 4 cadenas es una glicoproteína heterotetramérica compuesta de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas (un anticuerpo IgM consiste en 5 de la unidad heterotetramérica básica junto con un polipéptido adicional denominado cadena J y, por tanto, contiene 10 sitios de unión a antígeno, mientras que los anticuerpos IgA secretados pueden polimerizar para formar ensamblajes polivalentes que comprenden 2-5 de las unidades básicas de 4 cadenas junto con la cadena J). En el caso de las IgGs, la unidad de 4 cadenas es generalmente de 150.00 daltons. Cada cadena L está unida a una cadena H mediante un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H están unidas entre sí mediante uno o más enlaces disulfuro que dependen del isotipo de cadena H. Cada cadena H y L también está regularmente presenta puentes disulfuro intracatenarios regularmente separados. Cada cadena H tiene en el extremo N-terminal un dominio variable (V_H) seguido de tres dominios constantes (C_H) para cada una de las cadenas α y γ y cuatro dominios C_H para los isotipos μ y ϵ . Cada cadena L tiene en el extremo N-terminal un dominio variable (V_L) seguido de un dominio constante (C_L) en su otro extremo. El V_L está alineado con el V_H y el C_L está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada (C_{H1}). Se cree que los residuos de aminoácidos particulares forman una interfase entre los dominios variables de cadena ligera y cadena pesada. El emparejamiento de un V_H y un V_L juntos forma un único sitio de unión a antígeno. Para la estructura y las propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, véase, por ejemplo, Basic and Clinical Immunology, 8ª Edición, Daniel P. Stites, Abba I. Terr y Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, página 71 y capítulo 6.

[0074] La cadena L de cualquier especie vertebrada se puede asignar a uno de los dos tipos claramente distintos, denominados kappa y lambda, en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (C_H), las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases o isotipos. Existen cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que tienen las cadenas pesadas designadas α , δ , ϵ , γ , y μ , respectivamente. Las clases γ y α se dividen además en subclases en base a diferencias relativamente menores en la secuencia y la función de C_H , por ejemplo, los humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2.

[0075] El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas partes de los dominios variables difieren ampliamente en la secuencia entre anticuerpos. El dominio V media en la unión a antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está distribuida uniformemente a lo largo del tramo de 110 aminoácidos de los dominios variables. En cambio, las regiones V consisten en tramos relativamente invariantes denominados regiones armazón ("framework") (FRs) de 15-30 aminoácidos separados por regiones más cortas de variabilidad extrema denominadas "regiones hipervariables" que tienen cada una de 9 a 12 aminoácidos de longitud. Los dominios variables de cadenas ligeras y pesadas nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan ampliamente una configuración de lámina beta, conectadas mediante tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina beta. Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen juntas de manera próxima mediante las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (ver Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero muestran varias funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

[0076] El término "región hipervariable" cuando se utiliza en la presente invención 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" (por ejemplo, aproximadamente los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el V_L y aproximadamente 1-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en V_H ; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o aquellos residuos de un "bucle hipervariable" (por

ejemplo, los residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en 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)).

[0077] El término "anticuerpo monoclonal" tal y como se utiliza en la presente invención se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos a excepción de posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un sitio antigénico único. Además, a diferencia de preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes (epítomos) diferentes, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un determinante único en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en que se pueden sintetizar sin estar contaminados por otros anticuerpos. El modificador "monoclonal" no debe interpretarse como que se requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales útiles en la presente invención tal como se definen en las reivindicaciones, se pueden fabricar mediante el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., *Nature*, 256:495 (1975), o se pueden fabricar mediante procedimientos de ADN recombinante en células bacterianas, animales o vegetales eucariotas (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar de las bibliotecas de anticuerpos en fagos utilizando las técnicas descritas en Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), por ejemplo.

[0078] Entre los anticuerpos monoclonales de la presente invención se incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica con u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenece a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de cadena o cadenas es idéntico con u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenece a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre y cuando muestren la actividad biológica deseada (véase, Patente de Estados Unidos No. 4.816.567; y Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en la presente incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno del dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, Mono del viejo Mundo, Simio, etc) y secuencias de la región constante humana.

[0079] Un anticuerpo "intacto" es aquel que comprende un sitio de unión a antígeno, así como un C_L y por lo menos dominios constantes de cadena pesada C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (por ejemplo, dominios constantes de secuencia nativa humana) o variantes en la secuencia de aminoácidos de los mismos. Preferiblemente, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

[0080] Los "fragmentos de anticuerpos" comprende una parte de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región de unión a antígeno o variable del mismo. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpos se incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diabodies; anticuerpos lineales (véase la Patente de Estados Unidos No. 5.641.870, Ejemplo 2; Zapata et al., *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpo de cadena única; y anticuerpos multispecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

[0081] La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab" y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad de cristalizar fácilmente. El fragmento Fab consiste en una cadena L completa junto con el dominio de la región variable de la cadena H (V_H) y el primer dominio constante de una cadena pesada (C_{H1}). Cada fragmento de Fab es monovalente con respecto a la unión a antígeno, es decir, presenta un único sitio de unión a antígeno. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ grande único que corresponde aproximadamente a dos fragmentos de Fab unidos por puentes disulfuro que tienen una actividad de unión a antígeno divalente y aún es capaz de reticular con el antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por la adición de una serie de residuos en el extremo carboxi terminal del dominio C_{H1} que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación en la presente invención para Fab' en el que el residuo o residuos de cisteína de los dominios constantes transportan por lo menos un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpos F(ab')₂ se produjeron originalmente como parejas de fragmentos de Fab' que tienen cisteínas bisagras entre ellos. También se conocen otros acoplamiento químicos de fragmentos de anticuerpos.

[0082] El fragmento Fc comprende las partes carboxi terminales de ambas cadenas H mantenidas juntas mediante enlaces disulfuro. Las funciones efectoras de los anticuerpos se determinan mediante las secuencias en la región Fc, cuya región es también la parte reconocida por receptores Fc (FcR) hallados en ciertos tipos de células.

[0083] "Fv" es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio completo de unión y reconocimiento de antígeno. Este fragmento consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y cadena ligera en asociación estrecha no covalente. A partir del pliegue de estos dos dominios emanan seis bucles hipervariables (3 bucles cada uno de las cadenas H y L) que contribuyen con los residuos de aminoácidos para la unión a antígeno y que confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de una Fv que comprende sólo tres CDRs específicas de antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse a antígeno, aunque con una menor afinidad que el sitio de unión completo.

[0084] "Fv de cadena única", también abreviado como "sFv" o "scFv" son fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo conectados en una única cadena de polipéptido. Preferiblemente, el polipéptido sFv comprende además un polipéptido enlazador entre los dominios V_H y V_L que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de sFv véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, páginas 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, infra.

[0085] El término "diabodies" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos preparados mediante la construcción de fragmentos sFv (véase el párrafo anterior) con enlazadores cortos (aproximadamente 5-10 residuos) entre los dominios V_H y V_L , de manera que se consigue el emparejamiento de los dominios V entre cadenas, pero no intracadenas, dando lugar a un fragmento bivalente, es decir, un fragmento que tiene dos sitios de unión a antígeno. Los diabodies biespecíficos son heterodímeros de dos fragmentos de sFv "de entrecruce", donde los fragmentos V_H y V_L de los dos anticuerpos están presentes en diferentes cadenas polipeptídicas. Los diabodies se describen más detalladamente en, por ejemplo, EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6444-6448 (1993).

[0086] Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada del anticuerpo no humano. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en que los residuos de una región hipervariable del receptor se sustituyen por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo dador), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos del armazón ("framework") (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo dador. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente la acción del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de por lo menos uno, y habitualmente dos, dominios variables, en que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a aquellos de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente por lo menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, habitualmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986), Reichmann et al., *Nature* 332: 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992).

[0087] Un "anticuerpo dependiente de especie", por ejemplo, un anticuerpo anti-IgE humana de mamífero, es un anticuerpo que tiene una afinidad de unión más fuerte por un antígeno de una primera especie mamífera que la que tiene un homólogo de ese antígeno de una segunda especie de mamífero. Normalmente, el anticuerpo dependiente de especie "se une específicamente" a un antígeno humano (es decir, tiene un valor de afinidad de unión (K_d) de no más de aproximadamente 1×10^{-7} M, preferiblemente no más de aproximadamente 1×10^{-8} y lo más preferible no más de aproximadamente 1×10^{-9} M), pero presenta una afinidad de unión por un homólogo del antígeno de una segunda especie de mamífero no humano que es por lo menos aproximadamente 50 veces, o por lo menos aproximadamente 500 veces, o por lo menos aproximadamente 1000 veces, más débil que su afinidad de unión por el antígeno humano. El anticuerpo dependiente de especie puede ser cualquiera de los diversos tipos de anticuerpos definidos anteriormente, pero preferiblemente es un anticuerpo humanizado o humano.

[0088] Un "polipéptido de unión a TAHO" es un oligopéptido que se une, preferiblemente específicamente, a un polipéptido TAHO tal como se describe aquí. Los oligopéptidos de unión a TAHO se pueden sintetizar químicamente utilizando una metodología de síntesis de oligopéptidos conocida o se pueden preparar y purificar utilizando tecnología recombinante. Los oligopéptidos de unión a TAHO tienen habitualmente por lo menos aproximadamente 5 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, ó 100 aminoácidos de longitud o más, donde dichos oligopéptidos son capaces de unirse, preferiblemente específicamente, a un polipéptido TAHO tal como se describe aquí. Los oligopéptidos de unión a TAHO se pueden identificar sin una gran experimentación utilizando técnicas bien conocidas. En este aspecto, cabe indicar que las técnicas para cribar bibliotecas de oligopéptidos para oligopéptidos que son capaces de unirse específicamente a un polipéptido diana son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,556,762, 5,750,373, 4,708,871, 4,833,092, 5,223,409, 5,403,484, 5,571,689, 5,663,143; Publicación PCT Nos. WO 84/03506 y WO84/03564; Geysen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81: 3998-4002 (1984); Geysen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82: 178-182 (1985); Geysen et al., in *Synthetic Peptides as Antigens*, 130-149 (1986); Geysen et al., *J. Immunol. Meth.*, 102: 259-274 (1987); Schoofs et al., *J. Immunol.*, 140: 611-616 (1988), Cwirla, S. E. et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 6378; Lowman, H.B. et al. (1991) *Biochemistry*, 30: 10832; Clackson, T. et al. (1991) *Nature*, 352: 624; Marks, J. D. et al. (1991). *J. Mol. Biol.*, 222: 581; Kang, A.S. et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 8363, y Smith, G. P. (1991) *Current Opin. Biotechnol.*, 2: 668).

[0089] Una "molécula orgánica de unión a TAHO" es una molécula orgánica diferente de un oligopéptido o

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

[0090] Un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica “que se une” a un antígeno de interés, por ejemplo, un polipéptido antígeno diana asociado a un tumor, es aquel que se une al antígeno con suficiente afinidad, de manera que el anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica es útil como agente terapéutico en el reconocimiento de una célula o tejido que expresan el antígeno, y no reacciona significativamente de forma cruzada con otras proteínas. En dichas realizaciones, el grado de unión del anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica a una proteína “no diana” será inferior a aproximadamente un 10% de la unión del anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica a su proteína diana particular tal como se determina mediante un análisis mediante separador celular activada por fluorescencia (FACS) o radioinmunoprecipitación (RIA). Con respecto a la unión de un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica a una molécula diana, el término “unión específica” o “que se une específicamente a” o es “específico para” un polipéptido particular o un epítipo en un polipéptido diana particular significa una unión que es diferente de forma medible de una interacción no específica. La unión específica se puede medir, por ejemplo, determinando la unión de una molécula en comparación con la unión de una molécula de control, que generalmente es una molécula de estructura similar que no tiene actividad de unión. Por ejemplo, la unión específica se puede determinar mediante la competición con una molécula de control que es similar a la diana, por ejemplo, un exceso de diana no marcada. En este caso, se indica unión específica si la unión de la diana marcada a una sonda es inhibida competitivamente por un exceso de diana no marcada. El término “unión específica” o “que se une específicamente a” o es “específico para” un polipéptido particular o un epítipo en un polipéptido diana particular tal como se utiliza aquí se pueden mostrar, por ejemplo, mediante una molécula que tiene una K_d para la diana de por lo menos aproximadamente 10^{-4} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-5} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-6} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-7} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-8} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-9} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-10} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-11} M, alternativamente por lo menos aproximadamente 10^{-12} M, o superior. En una realización, el término “unión específica” se refiere a la unión en la que una molécula se une a un polipéptido particular o un epítipo en un polipéptido particular sin unirse específicamente a cualquier otro polipéptido o epítipo en polipéptido.

[0091] Un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica que “inhibe el crecimiento de células tumorales que expresan un polipéptido TAHO” o un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica “inhibidora del crecimiento” son aquellos que dan lugar a una inhibición de crecimiento medible de las células cancerosas que expresan o sobreexpresan el polipéptido TAHO apropiado. El polipéptido TAHO puede ser un polipéptido transmembrana expresado en la superficie de una célula cancerosa o puede ser un polipéptido que es producido o secretado por una célula cancerosa. Los anticuerpos anti-TAHO, oligopéptidos o moléculas orgánicas inhibidoras del crecimiento preferidos inhiben el crecimiento de las células tumorales que expresan TAHO en más de un 20%, preferiblemente de aproximadamente un 20% a aproximadamente un 50% e incluso, más preferiblemente, en más de un 50%, por ejemplo, de aproximadamente un 50% a aproximadamente un 100%), en comparación con el control apropiado, siendo habitualmente el control células tumorales no tratadas con el anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica a analizar. En una realización, la inhibición del crecimiento se puede medir a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,1 a 30 $\mu\text{g/ml}$ o aproximadamente 0,5 nM a 200 nM en cultivo celular, donde la inhibición del crecimiento se determina 1-10 días después de la exposición de las células tumorales al anticuerpo. La inhibición del crecimiento de las células tumorales in vivo se puede determinar de varias maneras, tales como las descritas en la sección de Ejemplos Experimentales siguiente. El anticuerpo es inhibidor del crecimiento in vivo si la administración del anticuerpo anti-TAHO a aproximadamente 1 $\mu\text{g/kg}$ a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal da lugar a la reducción en el tamaño tumoral o proliferación de células tumorales en aproximadamente 5 días a 3 meses desde la primera administración del anticuerpo, preferiblemente en aproximadamente 5 a 30 días.

[0092] Un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica que “induce apoptosis” es aquel que induce la muerte celular programada determinada mediante la unión de annexina V, la fragmentación de ADN, contracción celular, dilatación del retículo endoplasmático, fragmentación celular y/o formación de vesículas de membrana (denominadas cuerpos apoptóticos). La célula es normalmente aquella que sobreexpresa un polipéptido TAHO. Preferiblemente, la célula es una célula tumoral, por ejemplo, una célula hematopoyética, tal como una célula B, célula T, basófilo, eosinófilo, neutrófilo, monocito, plaqueta o eritrocito. Existen varios métodos disponibles para evaluar los eventos celulares asociados con la apoptosis. Por ejemplo, la translocación de la fosfatidil serina (PS) se puede medir mediante la unión a annexina; la fragmentación de ADN se puede evaluar a través del “laddering” del ADN; y la condensación nuclear/cromatina junto con la fragmentación de ADN se pueden evaluar mediante cualquier aumento en células hipodiploides. Preferiblemente, el anticuerpo, el oligopéptido u otra molécula orgánica que

induce la apoptosis es aquel que da lugar a de aproximadamente 2 a 50 veces, preferiblemente de aproximadamente 5 a 50 veces, y aún más preferiblemente de aproximadamente 10 a 50 veces, la inducción de unión a annexina en relación a célula no tratada en un ensayo de unión a annexina.

- 5 **[0093]** Las "funciones efectoras" de anticuerpo se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o una región Fc de una variante en la secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo y varían con el isotipo del anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen la unión a C1q y la citotoxicidad dependiente de complemento; la unión a receptor de Fc; citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; subregulación de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de células B); y la activación de células B.

- [0094]** "Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" o "ADCC" se refieren a una forma de citotoxicidad en que la Ig secretada unida a receptores de Fc (FcRs) presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo, células asesinas ("killer") naturales (NK), neutrófilos, y macrófagos) permite que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana que porta el antígeno y, posteriormente, destruyan la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos "arman" las células citotóxicas y son absolutamente necesarias para dicha destrucción. Las células primarias para mediar la ADCC, las células NK, expresan FcγRIII solo, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991). Para determinar la actividad de ADCC de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo ADCC in vitro, tal como el descrito en las patentes de Estados Unidos 5.500.362 ó 5.821.337. Células efectoras útiles para estos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y células asesinas naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede determinar in vivo, por ejemplo en un modelo animal, tal como el descrito en Clynes et al. *PNAS (USA)*, 95:652-656 (1998).

- 25 **[0095]** Los términos "receptor Fc" y "FcR" se usan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. La FcR preferida es una FcR humana de secuencia nativa. Además, una FcR preferida es aquella que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII, y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas alternativamente empalmadas ("spliced") de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor de activación") y FcγRIIB (un "receptor de inhibición"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en sus dominios citoplásmicos. El receptor de activación FcγRIIA contiene un motivo de activación del inmunoreceptor basado en tirosina (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor de inhibición FcγRIIB contiene un motivo de inhibición del inmunoreceptor basado en tirosina (ITIM) en su dominio citoplásmico (revisado en Daëron, *Annu. Rev. Immunol.*, 15:203-234 (1997)). Los FcRs se revisan en Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods*, 4:25-34 (1994); y de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41 (1995). Otros FcRs, incluyendo los que se identifiquen en el futuro, están comprendidos por el término "FcR" aquí. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgGs maternas al feto (Guyer et al., *J. Immunol.*, 117:587 (1976); y Kim et al., *J. Immunol.*, 24:249 (1994)).

- 40 **[0096]** "Células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcRs y realizan funciones efectoras. Preferiblemente, las células expresan por lo menos FcγRIII y realizan la función efectora ADCC. Ejemplos de leucocitos humanos que median la ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC), células asesinas naturales (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos; prefiriéndose las células PBMCs y NK. Las células efectoras se pueden aislar de una fuente nativa, por ejemplo, de sangre.

- [0097]** "Citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" se refieren a la lisis de una célula diana en presencia del complemento. La activación del mecanismo de del complemento clásico se inicia mediante la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) a anticuerpos (de la subclase apropiada) que están unidos a su antígeno afín. Para determinar la activación del complemento se puede realizar un ensayo CDC, por ejemplo tal como se describe en Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods*, 202:163 (1996).

- [0098]** Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la afección fisiológica en mamíferos que se caracteriza habitualmente por un crecimiento celular no regulado. Entre los ejemplos de cáncer se incluyen, pero no se limitan a, cánceres hematopoyéticos o cánceres relacionados con la sangre, tales como linfoma, leucemia, mieloma o tumores linfoides, pero también cánceres del bazo y cánceres de los nódulos linfáticos. Ejemplos más particulares de dichos cánceres asociados a células B incluyen, por ejemplo, linfomas de grado alto, intermedio y bajo (incluyendo linfomas de células B tales como, por ejemplo, linfoma de células B de tejido linfoide asociado a mucosa y linfoma que no es de Hodgkin, linfoma de células de manto, linfoma de Burkitt, linfoma linfocítico pequeño, linfoma de zona marginal, linfoma de células grandes difusas, linfoma folicular y linfoma de Hodgkin y linfomas de células T) y leucemias (incluyendo leucemia secundario, leucemia linfocítica crónica, tal como leucemia de células B (linfocitos B CD5+), leucemia de mieloma, tal como leucemia mielóide aguda, leucemia de mieloma crónica, leucemia linfoide, tal como leucemia linfoblástico agudo y mielodisplasia), mieloma múltiple, tal como tumores de células plasmáticas y otros cánceres hematológicos y/o asociados a células B o células T. También se incluyen cánceres de células hematopoyéticas adicionales, incluyendo leucocitos polimorfonucleares, tales como basófilos, eosinófilos, neutrófilos y monocitos, células dendríticas, plaquetas, eritrocitos y células asesinas naturales. Los

orígenes de los cánceres de células B son los siguientes: el linfoma de células B de zona marginal se origina en células B de memoria en la zona marginal, el linfoma folicular y el linfoma de células B grandes difusas se origina en centrocitos en la zona clara de los centros germinales, el mieloma múltiple se origina en las células plasmáticas, la leucemia linfocítica crónica y la leucemia linfocítica pequeña se originan en células B1 (CD5+), el linfoma de células de manto se origina en células B intactas en la zona del manto y el linfoma de Burkitt se origina en centroblastos en la zona oscura de los centros germinales. Los tejidos que incluyen células hematopoyéticas referidos en la presente invención como "tejidos de células hematopoyéticas" incluyen el timo y la médula ósea y tejidos linfoides periféricos, tales como el bazo, nódulos linfáticos, tejidos linfoides asociados con mucosa, tales como los tejidos linfoides asociados a intestino, amígdalas, parches de Peyer y apéndice y tejidos linfoides asociados con otra mucosa, por ejemplo, los recubrimientos bronquiales.

[0099] Los términos "trastorno proliferativo celular" y "trastorno proliferativo" se refieren a trastornos que están asociados con cierto grado de proliferación de células anormales. En una realización, el trastorno proliferativo celular es el cáncer.

[0100] "Tumor", tal como se utiliza aquí, se refiere a todo crecimiento y proliferación de células neoplásicas, tanto malignas como benignas y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos.

[0101] Un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica que "induce la muerte celular" es aquel que provoca que una célula viable se convierta en no viable. La célula es aquella que expresa un polipéptido TAHO y es de un tipo celular que específicamente expresa o sobreexpresa un polipéptido TAHO. La célula puede ser una célula cancerosa o normal del tipo de célula particular. El polipéptido TAHO puede ser un polipéptido transmembrana expresado en la superficie de una célula cancerosa o puede ser un polipéptido que es producido y secretado por una célula cancerosa. La célula puede ser una célula cancerosa, por ejemplo, una célula B o una célula T. La muerte celular in vitro se puede determinar en ausencia de complemento y de células efectoras inmunes para distinguir la muerte celular inducida por la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). De este modo, el ensayo por la muerte celular se puede realizar utilizando suero inactivado por calor (es decir, en ausencia de complemento) y en ausencia de células efectoras inmunes. Para determinar si el anticuerpo, oligopéptido, u otra molécula orgánica es capaz de inducir la muerte celular, la pérdida de la integridad de membrana evaluada mediante la captación de yoduro de propidio (PI), azul de tripano (véase Moore et al. Cytotechnology 17: 1-11 (1995)) o 7AAD se puede evaluar en relación con las células no tratadas. Los anticuerpos, oligopéptidos u otras moléculas orgánicas que inducen la muerte celular preferidas son aquellos que inducen la captación de PI en el ensayo de captación de PI en células BT474.

[0102] Una "célula que expresa TAHO" es una célula que expresa un polipéptido TAHO endógeno o transfectado en la superficie celular o en una forma secretada. Un "cáncer que expresa TAHO" es un cáncer que comprende células que tienen un polipéptido TAHO presente en la superficie celular o que producen y secretan un polipéptido TAHO. Un "cáncer que expresa TAHO" produce opcionalmente niveles suficientes de polipéptido TAHO en la superficie de células del mismo, de manera que un anticuerpo anti-TAHO, un oligopéptido u otra molécula orgánica se pueden unir al mismo y tener un efecto terapéutico con respecto al cáncer. En otra realización, un "cáncer que expresa TAHO" produce y secreta opcionalmente niveles suficientes de polipéptido TAHO, de manera que un anticuerpo anti-TAHO, un oligopéptido u otra molécula orgánica antagonistas se pueden unir al mismo y tener un efecto terapéutico con respecto al cáncer. Con respecto a esto último, el antagonista puede ser un oligonucleótido no codificante que reduce, inhibe o evita la producción y la secreción del polipéptido TAHO secretado mediante células tumorales. Un cáncer que "sobreexpresa" un polipéptido TAHO es aquel que tiene niveles significativamente más elevados de polipéptido TAHO en la superficie celular del mismo, o produce y secreta, en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo de tejido. Dicha sobreexpresión puede estar causada por la amplificación génica o mediante el aumento de la transcripción o la traducción. La sobreexpresión de polipéptido TAHO se puede determinar en un ensayo de detección o pronóstico mediante la evaluación de niveles incrementados de la proteína TAHO presente en la superficie de una célula, o secretada por la célula, (por ejemplo, mediante un ensayo de inmunohistoquímica utilizando anticuerpos anti-TAHO preparados contra un polipéptido TAHO aislado que se puede preparar utilizando tecnología de ADN recombinante a partir de un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido TAHO; análisis FACS, etc.). Alternativamente, o adicionalmente, se pueden medir los niveles de ácido nucleico que codifica el polipéptido TAHO o ARNm en la célula, por ejemplo, a través de hibridación in situ fluorescente utilizando una sonda basada en ácidos nucleicos correspondiente a un ácido nucleico que codifica TAHO o el complemento del mismo; (FISH; véase WO98/45479 publicada en octubre 1998), técnicas de transferencia Southern, transferencia Northern o reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tales como PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR). También se puede estudiar la sobreexpresión del polipéptido TAHO midiendo el antígeno escindido en un fluido biológico, tal como suero, por ejemplo, utilizando ensayos basados en anticuerpos (véase, también por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 4,933,294 concedida el 12 de junio de 1990; WO91/05264 publicada el 18 de abril de 1991; la Patente de estados unidos 5,401,638 concedida el 28 de marzo de 1995; y Sias et al., J. Immunol. Methods 132: 73-80 (1990)). A parte de los ensayos anteriores, existen varios ensayos in vivo para el técnico experto. Por ejemplo, se pueden exponer células en el cuerpo del paciente a un anticuerpo que es opcionalmente marcado con un marcador detectable, por ejemplo, un isótopo radioactivo, y se puede evaluar la unión del anticuerpo a células en el paciente, por ejemplo, mediante rastreo externo para la radioactividad o mediante en análisis de una biopsia tomada de un paciente previamente expuesto al anticuerpo.

[0103] Tal como se utiliza aquí, el término "inmuno adhesina", designa moléculas de tipo anticuerpo que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesina") con las funciones efectoras de los dominios constantes de la inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmuno adhesinas se componen de la fusión de una
 5 secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada y que es distinta del sitio de reconocimiento y unión a antígeno de un anticuerpo (es decir es "heteróloga"), y de una secuencia del dominio constante de la inmunoglobulina. La parte de adhesina de una molécula de inmuno adhesina típicamente es una secuencia contigua de aminoácidos que comprende al menos el sitio de unión de un receptor a un ligando. La secuencia del dominio constante de la inmunoglobulina en la inmuno adhesina puede obtenerse a partir de cualquier inmunoglobulina, tal
 10 como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3 o IgG-4, IgA (incluidos IgA-1 y IgA-2), IgE, IgD o IgM.

[0104] La palabra "marcador", cuando se usa aquí, se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente al anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica para generar anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica "marcados". El marcador puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo
 15 marcadores radioisotópicos o marcadores fluorescentes) o, en el caso del marcador enzimático, pueden catalizar la alteración química de un compuesto o composición sustrato detectables.

[0105] El término "agente citotóxico" tal como se utiliza aquí se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o causa la destrucción de las células. El término pretende incluir isótopos radioactivos (por
 20 ejemplo, At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} e isótopos radioactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, por ejemplo, metotrexato, adriamicina, vinca, alcaloides (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalan, mitomicina C, clorambucilo, daunorubicina, u otros agentes intercalantes, enzimas y fragmentos de los mismos, tales como enzimas nucleolíticos, antibióticos, y toxinas, tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal animal, incluyendo fragmentos
 25 y/o variantes de los mismos, y los diversos agentes antitumorales o anticancerígenos descritos a continuación. A continuación, se describen otros agentes citotóxicos. Un agente tumoricida causa la destrucción de células tumorales.

[0106] Un "agente inhibidor del crecimiento" cuando se utiliza en la presente invención se refiere a un compuesto o
 30 una composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente una célula cancerosa que expresa TAHO, *in vitro* o *in vivo*. De este modo, el agente inhibidor del crecimiento es aquel que reduce significativamente el porcentaje de células que expresan TAHO en la fase S. Algunos ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un punto diferente de la fase S), tales como
 35 agentes que inducen la interrupción de G1 y la interrupción de la fase M. Algunos bloqueadores clásicos de fase M incluyen los vincas (vincristina y vinblastina), taxanos, e inhibidores de topoisomerasa II, tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido, y bleomicina. Los agentes que interrumpen G1 también afectan a la interrupción de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN, tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloroetamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo, y ara-C. Puede encontrarse más información en The
 40 Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn y Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs" por Murakami et al., (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente la página 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos anticancerígenos derivados del tejo. El docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo es un análogo semisintético del paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). El paclitaxel y el docetaxel promueven el ensamblaje de microtúbulos a partir de dímeros de tubulina y estabilizan los microtúbulos mediante la prevención de la despolimerización, lo que da lugar a la inhibición de la
 45 mitosis en células.

[0107] "Doxorubicina" es un antibiótico de antraciclina. El nombre químico completo de la doxorubicina es (8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-tridesoxi- α -L-lixo-hexapiranosil) oxil]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-8-(hidroxiacetil)-1-metoxi-5,12-naftacenodiona.
 50

[0108] El término "citoquina" es un término genérico para proteínas liberadas por una población de células que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Algunos ejemplos de dichas citoquinas son linfoquinas, monoquinas, y hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citoquinas se incluyen hormonas del crecimiento, tales como hormona del crecimiento humano, hormona del crecimiento humano N-metionilo, y hormona de
 55 crecimiento bovino; hormona paratiroidal; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorrelinaxina; hormonas de glicoproteínas, tales como hormona estimulante del folículo (FSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH), y hormona luteínica (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor α y β de necrosis tumoral; sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de
 60 crecimiento nervioso, tales como NGF- β ; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento transformante (TGFs), tales como TGF- α y TGF- β , factor de crecimiento I y II de tipo insulina; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones, tales como interferón- α , β , y γ ; factores estimulantes de colonias (CSFs), tales como macrófago-CSF (M-CSF); granulocito-macrófago-CSF (GM-CSF); y granulocito-CSF (G-CSF); interleuquinas (ILs), tales como IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5 IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; un factor de necrosis tumoral, tal como
 65 TNF- α o TNF- β , y otros factores de polipéptidos que incluyen LIF y ligando kit (LK). Tal y como se utiliza en la

presente invención, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivos de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa.

[0109] El término "prospecto" se utiliza para referirse a las instrucciones incluidas habitualmente en los envases comerciales de los productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, utilización, dosis, administración, contraindicaciones y/o avisos con respecto al uso de dichos productos terapéuticos.

Tabla 1

```

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

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

```

```

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

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

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

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

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

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

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

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

```

```

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

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

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

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

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

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

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

```

main

```

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

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

    dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));
    ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
    dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
    col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
    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;

    /* fill in match matrix
    */
    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;
        }
    }
}

```

nw

...NW

```

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

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

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

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

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

```

...NW

```

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

```

```

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

#include "nw.h"

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

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

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

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

```

print

```

/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)                                getmat
{
    int      lx, ly;                                           /* "core" (minus endgaps) */
    int      firstgap, lastgap;                                  /* leading trailing overlap */

    int      nm, i0, i1, siz0, siz1;
    char      outx[32];
    double    pct;
    register  n0, n1;
    register char *p0, *p1;
    /* get total matches, score
     */
    i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
    p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
    p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
    n0 = pp[1].spc + 1;
    n1 = pp[0].spc + 1;
    nm = 0;
    while ( *p0 && *p1 ) {
        if (siz0) {
            p1++;
            n1++;
            siz0--;
        }
        else if (siz1) {
            p0++;
            n0++;
            siz1--;
        }
        else {
            if (xbm[*p0-'A'] & xbm[*p1-'A'])
                nm++;
            if (n0++ == pp[0].x[i0])
                siz0 = pp[0].n[i0++];
            if (n1++ == pp[1].x[i1])
                siz1 = pp[1].n[i1++];
            p0++;
            p1++;
        }
    }

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

```

```

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

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

```

...getmat

pr_align

```

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

```

...pr_align

dumpblock

...dumpblock

```

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

```

nums

putline

...putline

```

int          i;
register char *px;

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

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

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

    if (!*out[0] || (*out[0] == '' && *(p0[0]) == ' ') ||
        !*out[1] || (*out[1] == '' && *(p0[1]) == ' '))
        return;
    px = star;
    for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
        *px++ = ' ';

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

```

stars

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

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

stripname

```

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

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

```

cleanup

getseq

```

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

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

```

...getseq

g_calloc

readjmps

...readjumps

```

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

```

writeimps

Tabla 2

Tabla 3

Tabla 4Tabla 5

A. Anticuerpos anti-TAHO

[0110] en una realización, la presente invención proporciona anticuerpos anti-TAHO tal como se definen en las reivindicaciones que pueden ser útiles como agentes terapéuticos. Entre los anticuerpos de ejemplo se incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, biespecíficos y heteroconjugados.

1. Anticuerpos policlonales

[01111] Los anticuerpos policlonales se desarrollan preferiblemente en animales mediante inyecciones múltiples subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno pertinente y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno pertinente (especialmente cuando se utilizan péptidos sintéticos) a una proteína que es inmunogénica en la especie a inmunizar. Por ejemplo, el antígeno se puede conjugar a la hemocianina de la lapa californiana (KLH), albúmina de

suero, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja utilizando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 , o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, donde R y R^1 son grupos alquilo diferentes.

5

[0112] Los animales se inmunizan contra el antígeno, conjugados inmunogénicos o derivados mediante la combinación de, por ejemplo, 100 μg o 5 μg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund y la inyección intradérmica de la solución en múltiples sitios. Un mes más tarde, los animales se refuerzan con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en

10

adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. De siete a catorce días más tarde los animales sangran y el suero se ensaya para el título de anticuerpo. Los animales se refuerzan hasta que el título se estabiliza. Los conjugados también se pueden producir en cultivos de células recombinantes como fusiones de proteínas. Además, los agentes de agregación, tales como el alumbre, se utilizan de forma adecuada para potenciar la respuesta inmune.

15

2. Anticuerpos monoclonales

[0113] Los anticuerpos monoclonales se pueden producir utilizando el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., *Nature* 256:495 (1975) o se pueden producir mediante métodos de ADN recombinante (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567).

20

[0114] En el método del hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster, se inmunizan como se ha descrito anteriormente para conseguir linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos se pueden

25

inmunizar *in vitro*. Después de la inmunización, los linfocitos se aíslan y se fusionan con una línea celular de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, páginas 59-103 (Academia Press. 1986)).

30

[0115] Las células de hibridoma preparadas de esta manera se siembran y se desarrollan en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas (también referidas como compañero de fusión). Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirán habitualmente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), cuyas sustancias evitan el crecimiento de células deficientes de HGPRT.

35

[0116] Las células de mieloma de compañero de fusión preferidas son aquellas que se fusionan de manera eficaz, contribuyen a una producción estable a un nivel elevado de anticuerpo por las células seleccionadas productoras de los anticuerpos, y son sensibles a un medio que se selecciona contra las células parentales no fusionadas. Entre las líneas de células de mieloma preferidas están las líneas de mieloma murinas, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, y las células SP-2 y derivadas, por ejemplo X63-Ag8-653, disponibles en la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, Estados Unidos. También se han descrito líneas de células de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.* 133: 3001 (1984); y Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, páginas 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

40

[0117] Se ensaya el medio de cultivo en el que crecen las células de hibridoma para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina mediante la inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión

50

in vitro, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA).

[0118] La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, mediante análisis Scatchard de Munson et al., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

55

[0119] Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y se pueden desarrollar mediante métodos estándar (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, páginas 59-103 (Academia Press, 1986)). Entre los medios de cultivo adecuados para este objetivo se incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o medio RPMI-1640. Además, las células de hibridoma se pueden desarrollar *in vivo* como tumores

60

ascíticos en un animal, por ejemplo, mediante inyección i.p. de las células en los ratones.

[0120] Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan de forma adecuada del medio de cultivo, fluido ascítico, o suero mediante procedimientos de purificación de anticuerpos convencionales, tales como, por ejemplo, cromatografía de afinidad (por ejemplo, proteína A o proteína G-Sefarosa) o cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, etc.

65

[0121] El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencia utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que a continuación se transfectan en células huésped, tales como células *E. coli*, células COS de simios, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que de ningún otro modo producen proteína de anticuerpo, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Entre los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifican el anticuerpo se incluyen Skerra et al., *Curr. Opinión in Immunol.*, 5:256-262 (1993) y Plückthun, *Immunol Revs.*, 130:151-188 (1992).

[0122] En una realización adicional, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos monoclonales se pueden aislar de bibliotecas de anticuerpos en fagos generados utilizando las técnicas descritas en McCafferty et al., *Nature*, 348: 552-554 (1990). Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, utilizando bibliotecas de fagos. Las posteriores publicaciones describen la producción de anticuerpos humanos de afinidad elevada (rango de nM) mediante intercambio de cadenas (Marks et al., *Biol. Technology*, 10:779-783 (1992)), así como la infección combinatoria y la recombinación *in vivo* como estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse et al., *Nuc. Acids. Res.*, 21: 2265-2266 (1993)). De este modo, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas convencionales de hibridomas de anticuerpos monoclonales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

[0123] El ADN que codifica el anticuerpo se puede modificar para producir polipéptidos anticuerpo quiméricos o de fusión, por ejemplo, mediante la sustitución de las secuencias de los dominios constantes de cadena pesada y ligera (C_H y C_L) humanos por las secuencias murinas homólogas (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567; Morrison et al. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), o mediante la fusión de la secuencia codificante de inmunoglobulina con toda o parte de la secuencia codificante de un polipéptido que no es inmunoglobulina (polipéptido heterólogo). Las secuencias de polipéptidos que no son inmunoglobulinas se pueden sustituir por los dominios constantes de un anticuerpo o se sustituyen por los dominios variables de un sitio de combinación a antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo divalente quimérico que comprende un sitio de combinación a antígeno que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación a antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

3. Anticuerpos humanos y humanizados

[0124] Los anticuerpos anti-TAHO para utilizar según la presente invención pueden comprender además anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Entre los anticuerpos humanizados se incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo dador), tal como ratón, rata o conejo que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos del armazón ("framework") de Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de la CDR o el armazón importados. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de por lo menos uno, y habitualmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones de FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá por lo menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), habitualmente la de una inmunoglobulina humana [Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332 : 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992)].

[0125] Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son conocidos en la técnica. En general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en el mismo a partir de una fuente que es no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan frecuentemente como residuos "importados", que habitualmente se obtienen de un dominio variable "importado". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988)), mediante la sustitución de secuencias de CDRs o CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son habitualmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

[0126] La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para utilizar en la fabricación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad y la respuesta HAMA (anticuerpo anti-

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

10

[0127] Es también importante que los anticuerpos se humanicen manteniendo una afinidad elevada por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, según un método preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios productos humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas están disponibles normalmente y son familiares para los expertos en la materia. Existen programas informáticos que muestran y visualizan probables estructuras conformacionales tridimensionales de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La observación de estas visualizaciones permite el análisis de la probable función de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos de FR se pueden seleccionar y combinar a partir de secuencias receptoras e importadas, de manera que se consigue la característica del anticuerpo deseado, tal como una mayor afinidad para el antígeno o antígenos diana. En general, los residuos de la región hipervariable están directamente y más sustancialmente implicados en la influencia sobre la unión al antígeno.

[0128] Se contemplan varias formas de un anticuerpo anti-TAHO humanizado. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como Fab, que está conjugado opcionalmente con uno o más agentes citotóxicos con el fin de generar un inmunoconjugado. Alternativamente, el anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo IgG1 intacto.

[0129] Como alternativa a la humanización, se pueden generar anticuerpos humanos. Por ejemplo, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo ratones) que son capaces, tras inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigótica del gen la región de unión (J_H) de la cadena pesada del anticuerpo en ratones mutantes quiméricos y en la línea germinal da lugar a la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia del grupo de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana en dichos ratones mutantes en la línea germinal dará lugar a la producción de anticuerpos humanos tras la estimulación con antígenos. Ver, por ejemplo Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 2551-255 (1993); Jakobovits et al., *Nature* 362, 255-258 (1993); Bruggermann et al., *Year in Immuno.*, 7: 33 (1993); y las Patentes de Estados Unidos 5.545.806, 5.569.825 y 5.591.669 (todas de GenPharm); 5.547.807; y WO 97/17852.

40

[0130] Alternativamente, la tecnología de expresión de fagos (McCafferty et al., *Nature* 348, 552-553 [1990]) se puede utilizar para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos in vitro, a partir de repertorios de genes de dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. Según esta técnica, los genes del dominio V de anticuerpo se clonan en el marco en un gen de proteína de recubrimiento principal o secundario de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se expresan como fragmentos de anticuerpos funcionales sobre la superficie de la partícula del fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN de cadena sencilla del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan lugar a la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta esas propiedades. De este modo, el fago mimetiza algunas de las propiedades de la célula B. La expresión en fagos se puede realizar en una variedad de formatos; para su revisión ver, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3, 564-571 (1993). Se pueden usar varias fuentes de segmentos de genes V para la expresión en fagos. Clackson et al., *Nature* 352, 624-628 (1991) aislaron un conjunto diverso de anticuerpos de anti-oxazolona a partir de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes V derivados de bazo de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V a partir de donantes humanos no inmunizados y se pueden aislar anticuerpos para un conjunto diverso de antígenos (incluyendo auto-antígenos) esencialmente siguiendo las técnicas descritas por Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222, 581-597 (1991), o Griffith et al., *EMBO J.* 12, 725-734 (1993). Véase también las Patentes de Estados Unidos Nos. 5.565.332 y 5.573.905.

[0131] Tal como se ha descrito anteriormente, también se pueden generar anticuerpos humanos mediante células B activadas *in vivo* (véase las Patentes de Estados Unidos 5.567.610 y 5.229.275).

60

4. Fragmentos de anticuerpos

[0132] En ciertas circunstancias, existen ventajas al utilizar fragmentos de anticuerpos, en lugar de anticuerpos completos. El menor tamaño de los fragmentos permite una depuración rápida y puede conducir a un mejor acceso a los tumores sólidos.

65

[0133] Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Habitualmente, estos fragmentos se derivaban mediante la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto et al., *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) y Brennan et al., *Science* 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos se pueden producir actualmente directamente mediante células huésped recombinantes. Los fragmentos de anticuerpos Fab, Fv y ScFv se pueden todos expresar en y secretarse de *E. coli*, permitiendo así la producción simple de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpos se pueden aislar a partir de las bibliotecas de fagos de anticuerpos descritas anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E. coli* y pueden acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). Según otra estrategia, los fragmentos F(ab')₂ se pueden aislar directamente del cultivo de células huésped recombinantes. Los fragmentos Fab y F(ab')₂ con una mayor vida media in vivo que comprenden residuos de epítipo de unión a receptor salvaje se describen en la Patente de Estados Unidos No. 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el técnico de la materia. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv). Véase WO 93/16185; Patente de Estados Unidos No. 5.571.894; y Patente de Estados Unidos No. 5.587.458. Fv y sFv son las únicas especies con sitios de combinación intacta carentes de regiones constantes; de este modo, son adecuadas para una unión específica reducida durante el uso in vivo. Las proteínas de fusión con sFv se pueden construir para producir la fusión de una proteína efectora en el extremo amino o carboxi de un sFv. Véase, *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, supra. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, tal como se describe en la Patente de Estados Unidos No. 5.641.870, por ejemplo. Dichos fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

5. Anticuerpos biespecíficos

[0134] Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión con por lo menos dos epítopos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos de ejemplo se pueden unir a dos epítopos diferentes de la proteína TAHO. Otros de dichos anticuerpos pueden combinar un sitio de unión a TAHO con un sitio de unión por otra proteína. Alternativamente, un brazo anti-TAHO puede combinarse con un brazo que se une a una molécula inductora en un leucocito, tal como una molécula receptora de células T (por ejemplo, CD3) o receptores Fc para IgG (FCγR), tales como FCγRI (CD64), FCγRII (CD32) y FCγRIII (CD16) con el fin de centrar y localizar los mecanismos de defensa celulares en la célula que expresa TAHO. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden utilizar para localizar agentes citotóxicos en células que expresan TAHO. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a TAHO y un brazo que se une al agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti-interferón-α, alcaloide vinca, cadena A de ricina, metotrexato o hapteno con isótopo radioactivo). Los anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

[0135] WO 96/16673 describe un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/anti-FcγRIII y la Patente de Estados Unidos 5.837.234 describe un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/anti-FcγRI. En WO98/02463 se muestra un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/Fcα. La Patente de Estados Unidos No. 5.821.337 describe un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/anti-CD3.

[0136] Los procedimientos para realizar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. La producción habitual de anticuerpos específicos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Milstein et al., *Nature*, 305:537-539 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpos diferentes, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se realiza habitualmente mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante incómoda y los rendimientos de producto son bajos. En WO 93/08829 y en Traunecker et al., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991) se describen procesos similares.

[0137] Según una estrategia diferente, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan a secuencias del dominio constante de inmunoglobulina. La fusión se produce preferiblemente con un dominio constante de cadena pesada de la inmunoglobulina, que comprende por lo menos parte de las regiones bisagra, C_H2 y C_H3. Se prefiere que la primera región constante de cadena pesada (C_H1) contenga el sitio necesario para la unión a cadena ligera, presente en por lo menos una de las fusiones. Los ADNs que codifican las fusiones de la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en una célula huésped adecuada. Esto proporciona una mayor flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones cuando las proporciones desiguales de las tres cadenas de polipéptido utilizadas en la construcción proporcionan el rendimiento óptimo del anticuerpo biespecífico deseado. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes de dos o las tres cadenas de polipéptido en un único vector de expresión cuando la expresión de por lo menos dos cadenas de polipéptido en proporciones iguales da lugar a rendimientos elevados o cuando las proporciones no tienen un efecto significativo en el rendimiento de la combinación de cadena deseadas.

- [0138]** En una realización preferida de esta estrategia, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y una pareja de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se observó que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadenas de inmunoglobulinas no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una manera sencilla de separación. Esta estrategia se describe en WO 94/04690. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121:210 (1986).
- 10 **[0139]** Según otra estrategia descrita en la Patente de Estados Unidos No. 5.731.168, la interfase entre una pareja de moléculas de anticuerpos se puede diseñar para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan de cultivos de células recombinantes. La interfase preferida comprende por lo menos una parte del dominio C_H3. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeños de la interfase de la primera molécula de anticuerpo se sustituyen por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean las
- 15 "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la cadena o cadenas laterales grandes en la interfase de la segunda molécula de anticuerpo mediante la sustitución de cadenas laterales de aminoácidos grandes por más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero sobre otros productos finales no deseados, tales como homodímeros.
- 20 **[0140]** Entre los anticuerpos biespecíficos se incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado se puede acoplar a avidina, y el otro a biotina. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir las células del sistema inmune a células no deseadas (Patente de Estados Unidos No. 4.676.980) y para el tratamiento de la infección por VIH (WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados se pueden fabricar utilizando cualquier método de reticulación conveniente. Los
- 25 agentes de reticulación adecuados son bien conocidos en la técnica y se describen en la Patente de Estados Unidos No. 4.676.980 junto con un grupo de técnicas de reticulación.
- [0141]** Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también se han descrito en la literatura. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos utilizando enlaces químicos.
- 30 Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que anticuerpos intactos se descomponen proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiol, arsenito sódico, para estabilizar los ditioles vecinales y evitar la formación de enlaces disulfuro intermoleculares. A continuación, los fragmentos Fab' generados se convierten en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte a continuación en Fab'-tiol mediante la reducción con
- 35 mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden utilizar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.
- [0142]** El reciente progreso ha facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que se pueden acoplar químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby et al., *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico F(ab')₂ completamente humanizada. Cada fragmento de Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a un acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de esta manera era capaz de unirse a células que sobreexpresaban el receptor ErbB2 y células T humanas normales, así como de desencadenar la actividad lítica
- 45 de linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumores de mama humanos. Se han descrito también varias técnicas para fabricar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente de cultivos de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucina. Kostelny et al., *J. Immunol.* 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las partes de Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpos se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y, a continuación, se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpos. Este procedimiento también se puede utilizar para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología de "diabody" descrita por Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un V_H conectado a un V_L mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el
- 50 emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando así dos sitios de unión a antígeno. También se ha descrito otra estrategia para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante la utilización de dímeros de Fv de cadena sencilla (sFv). Véase Gruber et al., *J. Immunol.* 152:5368 (1994).
- 60 **[0143]** Se consideran los anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos triespecíficos. Tutt et al., *J. Immunol.* 147:60 (1991).

6. Anticuerpos heteroconjugados

- 65 **[0144]** Los anticuerpos heteroconjugados tal como se definen en las reivindicaciones también se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos

unidos covalentemente. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmune a células no deseadas [Patente de Estados Unidos No. 4.676.980] y para el tratamiento de la infección por VIH [WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089]. Se contempla que los anticuerpos se pueden preparar *in vitro* utilizando procedimientos conocidos en la química sintética de proteínas, incluyendo los que implican agentes de reticulación.

- 5 Por ejemplo, las inmunotoxinas se pueden construir utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o mediante la formación de un enlace tioéter. Entre los ejemplos de reactivos adecuados para este objetivo se incluyen el iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y los descritos, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos No. 4.676.980.

10 7. Anticuerpos multivalentes

[0145] Un anticuerpo multivalente se puede internalizar (y/o catabolizar) más rápido que un anticuerpo bivalente por una célula que expresa un antígeno al que se unen los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención tal como se definen en las reivindicaciones pueden ser anticuerpos multivalentes

15

[0146] (que son diferentes de a los de la clase IgM) con tres o más sitios de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que se pueden producir fácilmente mediante expresión recombinante de ácido nucleico que codifica las cadenas polipeptídicas del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígeno. El dominio de dimerización preferido comprende (o consiste en) una región Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión a antígeno amino terminales a la región fc. El anticuerpo multivalente preferido de la presente invención comprende (o consiste en) tres a aproximadamente ocho, pero preferiblemente cuatro, sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente comprende por lo menos una cadena polipeptídica (y preferiblemente dos cadenas polipeptídicas), donde la cadena o cadenas polipeptídicas comprenden dos o más dominios variables. Por ejemplo, la cadena o cadenas polipeptídicas pueden comprender VD1-(X1)*n*-VD2-(X2)*n*-Fc, donde VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena polipeptídica de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o un polipéptido, y *n* es 0 ó 1. Por ejemplo, la cadena o cadenas polipeptídicas pueden comprender: VH-CH1-enlazador flexible-VH-CH1-cadena de región Fc; o VH-CH1-VH-CH1-cadena de región Fc. El anticuerpo multivalente de la presente invención comprende preferiblemente además por lo menos dos (y preferiblemente cuatro) polipéptidos del dominio variable de cadena ligera. El anticuerpo multivalente de la presente invención puede comprender, por ejemplo, de aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptidos del dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos del dominio variable de cadena ligera contemplados aquí comprenden un dominio variable de cadena ligera y, opcionalmente, además, comprenden un dominio CL.

35 8. Diseño de la función efectora

[0147] Se puede desear modificar el anticuerpo de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones con respecto a la función efectora, por ejemplo, con el fin de aumentar la citotoxicidad mediada por célula dependiente de antígeno (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) del anticuerpo. Esto se puede conseguir mediante la introducción de una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Alternativamente o adicionalmente, el residuo o residuos de cisteínas se pueden introducir en la región Fc, permitiendo de esta manera la formación de enlaces disulfuro entre cadenas en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de esta manera puede mejorar la capacidad de internalización y/o incrementar la citólisis mediada por el complemento y la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). Véase Caron et al., *J. Exp. Med.*, 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, *J. Immunol.*, 148: 2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos con una actividad anti-tumoral aumentada también se pueden preparar utilizando entrecruzadores heterobifuncionales tal y como se describe en Wolf et al. *Cancer Research*, 53: 2560-2565 (1993). Alternativamente, se puede diseñar un anticuerpo para que tenga regiones Fc duales y, de esta manera, pueda aumentar la lisis complementaria y las capacidades de ADCC. Véase, Stevenson et al., *Anti-Cancer Drug Design*, 3:219-230 (1989). Para aumentar la vida media del suero del anticuerpo, se puede incorporar un epítipo de unión al receptor salvaje en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) tal como se describe en la Patente de Estados Unidos 5,739,277, por ejemplo. Tal como se utiliza aquí, el término "epítipo de unión al receptor salvaje" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄) que son responsables del incremento de la vida media en suero *in vivo* de la molécula IgG.

55

9. Inmunoconjugados

[0148] La presente invención también se refiere a inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico, tal como un agente quimioterapéutico, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

60

[0149] Anteriormente se han descrito agentes quimioterapéuticos útiles para la generación de dichos inmunoconjugados. Entre las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden utilizar se incluyen la cadena A de difteria, fragmentos activos no enlazantes de la toxina de difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas

65

de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecnos. Existe un conjunto de radionucleidos disponibles para la producción de anticuerpos radioconjugados. Algunos ejemplos son ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y y ^{186}Re . Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se fabrican utilizando un conjunto de agentes bifuncionales acopladores de proteínas, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol)propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina tal y como se describe en Vitella *et al.*, *Science*, **238**: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilen triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de radionucleótidos al anticuerpo. Véase WO94/11026.

15 **[0150]** También se contemplan en la presente invención conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como caliqueamicina, péptidos de auristatina, tales como monometilauristatina (MMAE) (análogo sintético de dolastatina), maitansinoides, tales como DM1, un tricoteno y CC1065 y los derivados de estas toxinas que tiene actividad de toxina.

20 Maitansina y maitansinoides

[0151] En una realización preferida, se conjuga un anticuerpo anti-TAHO (longitud completa o fragmentos) a una o más moléculas maitansinoides.

25 **[0152]** Los maitansinoides, tales como DM1, son inhibidores mitotóticos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto *Maytenus serrata* del África del este (Patente de Estados Unidos No. 3,896,111). Posteriormente, se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres de C-3 maitansinol (Patente de Estados Unidos No. (4,151,042). El maitansinol sintético y derivados y análogos del mismo se describe, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nos. 4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,424,219; 4,450,254; 4,362,663; y 4,371,533.

Conjugados maitansinoide-anticuerpo

35 **[0153]** En un intento por mejorar su índice terapéutico, la maitansina y los maitansinoides se han conjugado a anticuerpos que se unen específicamente a antígenos de células tumorales. Los inmunoconjugados que contienen maitansinoides y su uso terapéutico se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,208,020, 5,416,064 y la Patente Europea EP 0 425 235 B1. Liu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8618-8623 (1996) describieron inmunoconjugados que comprenden un maitansinoide designado como DM1 unido al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra el cáncer colorectal humano. Se observó que el conjugado era altamente citotóxico hacia las células del cáncer de colon cultivadas y mostró actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento de tumores in vivo. Chari *et al.*, *Cancer Research* 52: 127-131 (1992) describen inmunoconjugados en los que se conjugó un maitansinoide a través de un enlace disulfuro al anticuerpo murino A7 que se une a un antígeno en líneas celulares de cáncer de colon humano, o a otro anticuerpo monoclonal murino TA.1 que se une al oncogén HER-2/neu. La citotoxicidad del conjugado Ta.1-maitansinoide se ensayó in vitro en la línea de células de cáncer de mama humano SK-BR-3, que expresa 3×10^5 antígenos de la superficie de HER-2 por célula. El fármaco conjugado consiguió un grado de citotoxicidad similar al del fármaco maitansinoide libre, que se podía incrementar mediante el incremento del número de moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo. El conjugado A7-maitansinoide 50 mostró una citotoxicidad sistémica baja en ratones.

Conjugados anticuerpo anti-polipéptido TAHO-maitansinoide

55 **[0154]** Los conjugados anticuerpo anti-TAHO-maitansinoide se preparan mediante la unión química de un anticuerpo anti-TAHO a una molécula maitansinoide sin disminuir significativamente la actividad biológica del anticuerpo o la molécula maitansinoide. Un promedio de 3-4 moléculas de maitansinoide conjugadas por molécula de anticuerpo han mostrado una eficacia en el aumento de la citotoxicidad de células diana sin afectar significativamente a la función o solubilidad del anticuerpo, aunque se esperaría que incluso una molécula de toxina/anticuerpo aumentara la citotoxicidad sobre el uso de anticuerpo desnudo. Los maitansinoides son bien conocidos en la técnica y se pueden sintetizar mediante técnicas conocidas o aislarse de fuentes naturales. Se describen maitansinoides adecuados, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos No. 5,208,020 y en las otras publicaciones de patente y no patente referidas anteriormente aquí. Los maitansinoides preferidos son maitansinol y análogos de maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, tales como varios ésteres de maitansinol.

65

[0155] Existen muchos grupos enlazadores conocidos en la técnica para fabricar conjugados anticuerpo-maitansinoide, incluyendo, por ejemplo, los descritos en la Patente de Estados Unidos No. 5,208,020 o Patente EP 0 425 235 B1, y Chari et al., Cancer Research 52: 127-131 (1992). Los grupos enlazadores incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles ácidos, grupos fotolábiles, o grupos lábiles peptidasa o grupos lábiles esterasa, tal como se describe en las patentes identificadas anteriormente, siendo preferidos los grupos disulfuro y tioéter.

[0156] Los conjugados del anticuerpo y el maitansinoide se pueden fabricar utilizando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como, dimetil adipimidato HCL), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como, bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Los agentes de acoplamiento particularmente preferidos incluyen N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP) (Carlsson et al., Biochem. J. 173: 723-737 [1978]), sulfosuccinimidil maleimidometil ciclohexano carboxilato (SMCC) y N-succinimidil-4-(2-piridilditio)pentanoato (SPP) para proporcionar un enlace disulfuro. Otros enlazadores disulfuro incluyen cys-MC-vc-PAB (un reactivo enlazador dipéptido valina-citrulina (vc) que tiene un componente maleimida y un componente auto-inmolador para-aminobencilcarbamoil (PAB)).

[0157] El enlazador se puede unir a la molécula de maitansinoide en varias posiciones, dependiendo del tipo de enlace. Por ejemplo, un enlace éster puede estar formado por la reacción con un grupo hidroxilo utilizando técnicas de acoplamiento convencionales. La reacción puede tener lugar en la posición C-3 que tiene un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo, y la posición C-20 que tiene un grupo hidroxilo. En una realización preferida, el enlace se forma en la posición C-3 de maitansinol o un análogo de maitansinol.

Caliqueamicina

[0158] Otro inmunoconjugado de particular interés comprende un anticuerpo anti-TAHO conjugado a una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de antibióticos de caliqueamicina es capaz de producir roturas de ADN de doble cadena a concentraciones subpicomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de caliqueamicina, véase las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,712,374; 5,714,586; 5,739,116; 5,767,285; 5,770,701; 5,773,001; y 5,877,296 (todas de la American Cyanamid Company). Entre los análogos estructurales de caliqueamicina que se pueden utilizar se incluyen, pero sin limitación, γ_1^1 , α_2^1 , α_3^1 , N-acetil- γ_1^1 , PSAG, y θ_1^1 (Hinman et al, CancerRes 53: 3336-3342 (1993); Lode et al., Cancerres 58: 2925-2928 (1998) y las patentes de Estados Unidos mencionadas anteriormente de American Cyanamid). Otro fármaco antitumoral preferido al que el anticuerpo se puede conjugar es QFA, un antifolato. Tanto la caliqueamicina como QFA tienen sitios intracelulares de acción y no atraviesan fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la captación celular de estos agentes a través de la internalización mediada por anticuerpos aumenta ampliamente sus efectos citotóxicos.

Otros agentes citotóxicos

[0159] Otros agentes antitumorales que se pueden conjugar a los anticuerpos anti-TAHO de la presente invención incluyen BCNU, estreptoizina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocida colectivamente como complejo LL-E33288 descrita en las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,053,394, 5,770,710, así como esperamicinas (patente de Estados Unidos 5,877,296).

[0160] Entre las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden utilizar se incluyen la cadena A de difteria, fragmentos activos no enlazantes de toxina de difteria, cadena A de exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de ricina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAPS), inhibidor de momordica charantia, curcina, crotina, inhibidor de sapaonaria officinalis, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. Véase, por ejemplo, WO 93/21232 publicada el 28 de octubre de 1993.

[0161] La presente invención contempla además un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una ADN endonucleasa, tal como una desorribonucleasa; ADNasa).

[0162] Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radioactivo. Existe un conjunto de isótopos radioactivos disponibles para la producción de anticuerpos anti-TAHO radioconjugados. Algunos ejemplos incluyen Al^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} e isótopos radioactivos de Lu. Cuando se utiliza el conjugado para la detección, puede comprender un átomo radioactivo para estudios centellográficos, por ejemplo Tc^{99m} o I^{123} , o un marcador de spin para la obtención de imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como imagen por resonancia magnética, mri), tal como yodo-123, de nuevo, yodo-131, indio-111, fluor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

[0163] Los radiomarcadores u otros marcadores se pueden incorporar en el conjugado de varias maneras conocidas. Por ejemplo, el péptido se puede biosintetizar o se puede sintetizar mediante la síntesis química de aminoácidos utilizando precursores de aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, fluor-19 en lugar de hidrógeno. Los marcadores, tales como, $\text{tc}^{99\text{m}}$ o I^{123} , Re^{186} , Re^{188} y In^{111} se pueden unir mediante un residuo de cisteína en el péptido. El ytrio-90 se puede unir mediante un residuo de lisina. El método de IODOGEN (Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:49-57) se puede utilizar para incorporar yodo-123. "Monoclonal antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros métodos en detalle.

[0164] Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se pueden fabricar utilizando un conjunto de agentes bifuncionales acopladores de proteínas, tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol)propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina tal y como se describe en Vitetta et al., Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilen triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de radionucleótidos al anticuerpo. Véase WO94/11026. El enlazador puede ser un "enlazador separable" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se puede utilizar un enlazador lábil en ácido, un enlazador sensible a peptidasa, un enlazador fotolábil, un enlazador dimetilo o un enlazador que contiene disulfuro (Chari et al. Cancer Research 52: 127-131 [1992]; Patente de Estados Unidos No. 5,208,020).

[0165] Alternativamente, se puede fabricar una proteína de fusión que comprende el anticuerpo anti-TAHO y agente citotóxico, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. La longitud del ADN puede comprender regiones respectivas que codifican las dos partes del conjugado ya sea adyacentes entre sí o separadas por una región que codifica un péptido enlazador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

10. Inmunoliposomas

[0166] Los anticuerpos anti-TAHO descritos en la presente invención también se pueden formular como inmunoliposomas. Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta de varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensoactivo que es útil para la liberación de un fármaco a un mamífero. Los componentes del liposoma están dispuesto habitualmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de lípidos de las membranas biológicas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos en Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci.USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); Pat. De Estados Unidos Nos. 4.485.045 y 4.544.545; y WO97/38731 publicada el 23 de octubre de 1997. Liposomas con mayor tiempo de circulación se describen en la Patente de Estados Unidos No. 5.013.556.

[0167] Se pueden generar liposomas particularmente útiles mediante el método de evaporación de fase inversa con una composición de lípidos que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente solicitud se pueden conjugar con los liposomas tal como se describe en Martin et al. J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982) a través de una reacción de intercambio de disulfuro. En el liposoma está contenido opcionalmente un agente quimioterapéutico. Véase Gabizon et al. J. National Cancer Inst. 81(19) 1484 (1989).

B. Oligopéptidos de unión a TAHO

[0168] Los oligopéptidos de unión a TAHO son oligopéptidos que se unen, preferiblemente específicamente, a un polipéptido TAHO tal como se describe aquí. Los oligopéptidos de unión a TAHO se pueden sintetizar químicamente utilizando la metodología de síntesis de oligopéptidos conocida o se pueden preparar y purificar utilizando tecnología recombinante. Los oligopéptidos de unión a TAHO tiene habitualmente por lo menos aproximadamente 5 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, ó 100 aminoácidos de longitud o más, donde dichos oligopéptidos que son capaces de unirse, preferiblemente específicamente, a un polipéptido TAHO tal como se describe aquí. Los oligopéptidos de unión a TAHO se pueden identificar sin una gran experimentación utilizando técnicas conocidas. En este aspecto, cabe indicar que las técnicas para cribar bibliotecas de oligopéptidos para oligopéptidos que son capaces de unirse específicamente a un polipéptido diana son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos. 5,556,762, 5,750,373, 4,708,871, 4,833,092, 5,223,409, 5,403,484, 5,571,689, 5,663,143; Publicación PCT Nos. WO 84/03506 y WO84/03564; Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81: 3998-4002 (1984); Geysen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82: 178-182 (1985); Geysen et al., in Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986); Geysen et al., J. Immunol. Meth., 102: 259-274

(1987); Schoofs et al., J. Immunol., 140: 611-616 (1988), Cwirla, S. E. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6378; Lowman, H.B. et al. (1991) Biochemistry, 30: 10832; Clackson, T. et al. (1991) Nature, 352: 624; Marks, J. D. et al. (1991), J. Mol. Biol., 222: 581; Kang, A.S. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 8363, y Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2: 668).

5

[0169] En este aspecto, la expresión en bacteriófagos (fagos) es una técnica bien conocida que permite cribar bibliotecas grandes de oligopéptidos para identificar el miembro o miembros de estas bibliotecas que son capaces de unirse específicamente a un polipéptido diana. La expresión en fago es una técnica por la cual se expresan variantes de polipéptidos como proteínas de fusión a la proteína de recubrimiento en la superficie de partículas de bacteriófagos (Scott, J.K. and Smith, G. P. (1990) Science, 249: 386). La utilidad de la expresión en fagos radica en el hecho de que grandes bibliotecas de variantes de proteínas seleccionadas al azar (o ADNcs clonados al azar) se pueden separar rápida y eficazmente para las secuencias que se unen a una molécula diana con gran afinidad. La expresión de bibliotecas de péptido (Cwirla, S. E. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6378) o proteína (Lowman, H.B. et al. (1991) Biochemistry, 30: 10832; Clackson, T. et al. (1991) Nature, 352: 624; Marks, J. D. et al. (1991), J. Mol. Biol., 222: 581; Kang, A.S. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 8363) en fagos se ha utilizado para cribar millones de polipéptidos u oligopéptidos para aquellos con propiedades de unión específicas (Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2: 668). La separación de la bibliotecas en fagos de mutantes aleatorios requiere una estrategia para construir y propagar un gran número de variantes, un procedimiento para la purificación por afinidad utilizando el receptor diana, y un medio de evaluación de los resultados de enriquecimientos de unión. Patentes de Estados Unidos nos. 5,223,409, 5,403,484, 5,571,689, y 5,663,143.

[0170] Aunque la mayoría de métodos de expresión en fago han utilizado sistemas de expresión en fago filamentoso, también son conocidos los sistemas de expresión en fago lamboide (WO 95/34683; U.S. 5,627,024), sistema de expresión fago T4 (Ren et al., Gene, 215: 439 (1998); Zhu et al., Cancer Research, 58 (15): 3209-3214 (1998); Jiang et al., Infection & Immunity, 65 (11): 4770-4777 (1997); Ren et al., Gene, 195 (2): 303-311 (1997); Ren, Protein Sci., 5: 1833 (1996); Efimov et al., Virus Genes, 10: 173 (1995)) y sistemas de expresión en fago T7 (Smith and Scott, Methods in Enzymology, 217: 228-257 (1993); U.S. 5,766,905).

[0171] Actualmente se han desarrollado muchas otras mejoras y variaciones del concepto básico de expresión en fagos. Estas mejoras aumentan la capacidad de los sistemas de expresión para cribar bibliotecas de péptidos para unirse a moléculas diana seleccionadas y para expresar proteínas funcionales con el potencial de cribar estas proteínas por las propiedades deseadas. Se han desarrollado dispositivos de reacción combinatoria para las reacciones de expresión en fagos (WO 98/14277) y se han utilizado bibliotecas de expresión en fagos para analizar y controlar interacciones bimoleculares (WO 98/20169; WO 98/20159) y propiedades de péptidos helicoidales obligados (WO 98/20036). WO 97/35196 describe un método para aislar un ligando de afinidad en el que se pone en contacto una biblioteca de expresión en fagos con una solución en la que el ligando se unirá a una molécula diana y una segunda solución en la que el ligando de afinidad no se unirá a la molécula diana, para aislar selectivamente los ligandos de unión. WO 97/46251 describe un método para la bioadsorción de una biblioteca de expresión en fagos aleatoria con un anticuerpo purificado por afinidad y a continuación el aislamiento del fago de unión, seguido de un proceso de microadsorción utilizando pocillos de microplacas para aislar el fago de unión con afinidad elevada. También se ha descrito el uso de proteína A de *Staphylococcus aureus* como etiqueta de afinidad (Li et al. (1998) Mol Biotech., 9: 187). WO 97/47314 describe el uso de bibliotecas de sustracción de sustrato para distinguir las especificidades de enzima utilizando una biblioteca combinatoria que puede ser una biblioteca de expresión en fagos. En WO 97/094446 se describe un método para seleccionar enzimas adecuadas para su uso en detergentes utilizando la expresión en fagos. Métodos adicionales de selección de proteínas de unión específica se describen en las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,498,538, 5,432,018, y WO 98/15833.

[0172] Los métodos de generación de bibliotecas de péptidos y cribado de estas bibliotecas también se describen en las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,723,286, 5,432,018, 5,580,717, 5,427,908, 5,498,530, 5,770,434, 5,734,018, 5,698,426, 5,763,192, y 5,723,323.

C. Moléculas orgánicas de unión a TAHO

[0173] Las moléculas orgánicas de unión a TAHO son moléculas orgánicas diferentes de oligopéptidos o anticuerpos tal como se definen aquí que se unen, preferiblemente específicamente, a un polipéptido TAHO tal como se describe aquí. Las moléculas orgánicas de unión a TAHO se pueden identificar y sintetizar químicamente utilizando metodología conocida (véase, por ejemplo, Publicación PCT Nos. WO00/00823 y WO00/39585). Las moléculas orgánicas de unión a TAHO tienen habitualmente menos de aproximadamente 200 daltons de tamaño, alternativamente menos de aproximadamente 1500, 750, 500, 250 ó 200 daltons de tamaño, donde dichas moléculas orgánicas que son capaces de unirse, preferiblemente específicamente a un polipéptido tal como se describe aquí, se pueden identificar sin una gran experimentación utilizando técnicas conocidas. En este aspecto, cabe indicar que las técnicas para cribar bibliotecas de moléculas orgánicas para moléculas que son capaces de unirse a un polipéptido diana son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, la Publicación PCT Nos. WO00/00823 y WO00/39585). Las moléculas de orgánicas de unión a TAHO pueden ser, por ejemplo, aldehídos, cetonas, oximas, hidrazonas, semicarbazonas, carbazidas, aminas primarias, aminas secundarias, aminas terciarias, hidrazinas N-sustituidas, hidrazidas, alcoholes, éteres, tioles, tioéteres, disulfuros, ácidos carboxílicos, ésteres,

amidas, ureas, carbamatos, carbonatos, cetales, tiocetales, acetales, tioacetales, haluros de arilo, sulfonatos de arilo, haluros de alquilo, sulfonatos de alquilo, compuestos aromáticos, compuestos heterocíclicos, anilinas, alquenos, alquinos, dioles, amino alcoholes, oxazolidinas, oxazolininas, tiazolidinas, tiazolininas, enaminas, sulfonamidas, epóxidos, aziridinas, isocianatos, cloruros de sulfonilo, compuestos diazo, cloruros de ácido o similares.

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

10 **[0174]** Las técnicas para generar anticuerpos, oligopéptidos y moléculas orgánicas que se unen a polipéptidos TAHO se han descrito anteriormente. Se pueden seleccionar además anticuerpos, oligopéptidos u otras moléculas orgánicas con ciertas características biológicas, según se desee.

[0175] Los efectos inhibidores del crecimiento de un anticuerpo anti-TAHO, oligopéptido u otra molécula orgánica de la solicitud se pueden valorar mediante los métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, utilizando células que expresan un polipéptido TAHO endógenamente o tras la transfección con el gen de TAHO. Por ejemplo, las líneas de células tumorales y las células transfectadas con TAHO apropiadas se pueden tratar con un anticuerpo monoclonal anti-TAHO, oligopéptido u otra molécula orgánica de la solicitud a varias concentraciones durante unos días (por ejemplo, 2-7 días) y se pueden teñir con violeta cristal o MTT o analizarse mediante algún otro ensayo colorimétrico. Otro método de medición de la proliferación sería mediante la comparación de la captación de ³H-timidina por las células tratadas en presencia o ausencia de un anticuerpo anti-TAHO, oligopéptido de unión a TAHO o molécula orgánica de unión a TAHO de la solicitud. Después del tratamiento, las células se recogen y se cuantifica la cantidad de radioactividad incorporada en el ADN en un contador de centelleo. Los controles positivos apropiados incluyen el tratamiento de una línea celular seleccionada con un anticuerpo inhibidor del crecimiento conocido por inhibidor el crecimiento de esa línea celular. La inhibición del crecimiento de las células tumorales in vivo se puede determinar de varias maneras conocidas en la técnica. La célula tumoral puede ser la que sobreexpresa un polipéptido TAHO. El anticuerpo anti-TAHO, oligopéptido de unión a TAHO o molécula orgánica de unión a TAHO inhibirán la proliferación celular de una célula tumoral que expresa TAHO in vitro o in vivo en aproximadamente 25-100% en comparación con la célula tumoral no tratada, más preferiblemente, en aproximadamente 30-100%, e incluso más preferiblemente en aproximadamente 50-100% ó 70-100%, en una realización, a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,5 a 30 µg/ml. La inhibición del crecimiento se puede medir a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,5 a 30 µg/ml o aproximadamente 0,5 nM a 200 nM en cultivo celular, donde la inhibición del crecimiento 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-TAHO de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal da lugar a la reducción del tamaño tumoral o la reducción de la proliferación del tumor dentro de aproximadamente 5 días a 3 meses desde la primera administración del anticuerpo, preferiblemente dentro de aproximadamente 5 a 30 días.

[0176] Para seleccionar un anticuerpo anti-TAHO, oligopéptido de unión a TAHO o molécula orgánica de unión a TAHO que induce la muerte celular, se puede valorar la pérdida de integridad de la membrana indicada mediante, por ejemplo, la captación de yoduro de propidio (PI), azul de tripano o 7AAD en relación al control. Se puede realizar un ensayo de captación de PI en ausencia de complemento y células efectoras inmunes. Las células tumorales que expresan el polipéptido TAHO se incuban con medio solo o medio que contiene anticuerpo anti-TAHO (por ejemplo, a aproximadamente 10 µg/ml), un oligopéptido de unión a TAHO o una molécula orgánica de unión a TAHO. Las células se incuban durante un periodo de 3 días. Tras cada tratamiento, las células se lavan y se fraccionan en tubos 12x 75 de tapón colador de 35 mm (1 ml por tubo, 3 tubos por grupo de tratamiento) para la eliminación de grupos de células. A continuación, los tubos reciben PI (10 µg/ml). Las muestras se pueden analizar utilizando un citómetro de flujo PACSCAN® y el software FACSCONVERT® CellQuest (Becton Dickinson). Los anticuerpos anti-TAHO, oligopéptidos de unión a TAHO o moléculas de unión a TAHO que inducen estadísticamente niveles significativos de la muerte celular determinada mediante la captación de PI se pueden seleccionar como anticuerpos anti-TAHO, oligopéptidos de unión a TAHO o moléculas orgánicas de unión a TAHO inductoras de la muerte celular.

[0177] Para cribar anticuerpos, oligopéptidos u otras moléculas orgánicas que se unen a un epítipo en un polipéptido TAHO unido por un anticuerpo de interés, se puede realizar un ensayo de bloqueo cruzado de rutina, tal como el descrito en Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988). Este ensayo se puede utilizar para determinar si un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica de prueba se une al mismo sitio o epítipo que un anticuerpo anti-TAHO conocido. Alternativa o adicionalmente, la localización del epítipo se realiza mediante métodos conocidos en el sector. Por ejemplo, la secuencia del anticuerpo se puede mutagenizar mediante, por ejemplo, rastreo de alanina, para identificar residuos de contacto. El anticuerpo mutante se analiza inicialmente por su unión con anticuerpo policlonal para asegurar el pliegue correcto. En un método diferente, se pueden utilizar péptidos correspondientes a diferentes regiones de un polipéptido TAHO en ensayos de competición con los anticuerpos de prueba o con un anticuerpo de prueba y un anticuerpo con un epítipo caracterizado o conocido.

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

[0178] Los anticuerpos también se pueden utilizar en ADEPT mediante la conjugación del anticuerpo a una enzima activadora de profármaco que convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico peptídico, véase WO 81/01145) en un fármaco anticanceroso activo. Véase, por ejemplo, WO 88/07378 y la Patente de Estados Unidos No. 4.975.278.

[0179] El componente enzimático del inmunoconjugado útil para ADEPT incluye cualquier enzima capaz de actuar en un profármaco de manera que lo convierte en su forma citotóxica más activa.

- 10 **[0180]** Entre las enzimas que son útiles en el procedimiento se incluyen, pero no se limitan a, fosfatasa alcalina útil para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasa útil para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina desaminasa útil para convertir 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco anticanceroso, 5-fluorouracilo; proteasas, tales como serratina proteasa, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y cathepsinas (tales como cathepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes de D-aminoácidos; enzimas que dividen los carbohidratos, tales como β -galactosidasa y neuraminidasa útiles para convertir profármacos glicosilados en fármacos libres; β -lactamasa útil para convertir fármacos derivatizados con β -lactamas en fármacos libres; y penicilin amidasa, tales como penicilin V amidasa o penicilin G amidasa, útiles para convertir fármacos derivatizados en sus nitrógenos amina con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Alternativamente, los anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la técnica como "abzimas" se pueden utilizar para convertir los profármacos de la solicitud en fármacos activos libres (véase, por ejemplo, Massey *Nature* 328: 457-458 (1987)). Los conjugados anticuerpo-abzima se pueden preparar tal y como se ha descrito en la presente invención para la liberación de la abzima a una población de células tumorales.
- 25 **[0181]** Las enzimas de la presente invención se pueden unir covalentemente a los anticuerpos anti-TAHO mediante técnicas bien conocidas en el sector, tal como la utilización de los reactivos de reticulación heterobifuncionales descritos anteriormente. Alternativamente, las proteínas de fusión que comprenden por lo menos la región de unión a antígeno de un anticuerpo de la presente solicitud unida a por lo menos una parte funcionalmente activa de una enzima de la solicitud se pueden construir utilizando técnicas de ADN recombinante bien conocidas en el sector
- 30 (véase, por ejemplo, Neuberger et al., *Nature* 312: 604-608 (1984)).

F. Polipéptidos TAHO de longitud completa

[0182] La presente solicitud también describe secuencias de nucleótidos recientemente identificadas y aisladas que codifican polipéptidos a los que se hace referencia en la presente solicitud como polipéptidos TAHO. En particular, se han identificado y aislado los ADNc (parciales y de longitud completa) que codifican varios polipéptidos TAHO, tal y como se describe con mayor detalle en los posteriores ejemplos.

[0183] Tal y como se describe en los Ejemplos posteriores, se han depositado clones de ADNc con el ATCC. Las secuencias de nucleótidos reales de los clones se pueden determinar fácilmente por un experto en la materia mediante la secuenciación del clon depositado utilizando procedimientos rutinarios en la técnica. Las secuencias de aminoácidos previstas se pueden determinar a partir de las secuencias de nucleótidos utilizando la técnica rutinaria. Para los polipéptidos TAHO y los ácidos nucleicos codificantes descritos en la presente invención, en algunos casos, los solicitantes han identificado lo que se cree que son los mejores marcos de lectura identificables con la información de la secuencia disponible en el momento.

G. Variantes de anticuerpo anti-TAHO y polipéptido TAHO

[0184] Además de los anticuerpos anti-TAHO y los polipéptidos TAHO de secuencia nativa y de longitud completa descritos en la presente invención, se contempla que se pueden preparar variantes de anticuerpo anti-TAHO y polipéptido TAHO. Las variantes de anticuerpo anti-TAHO y polipéptido TAHO se pueden preparar introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN codificante y/o mediante la síntesis del polipéptido o anticuerpo deseados. Los expertos en la materia entenderán que los cambios de aminoácidos pueden alterar los procesos post-traduccionales del anticuerpo anti-TAHO o el polipéptido TAHO, tales como el cambio del número o la posición de los sitios de glicosilación o la alteración de las características de anclamiento a la membrana.

[0185] Las variaciones en los anticuerpos anti-TAHO y polipéptidos TAHO descritos en la presente invención, se pueden realizar, por ejemplo, utilizando cualquiera de las técnicas y directrices para mutaciones conservativas y no conservativas establecidas, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos No. 5.364.934. Las variaciones pueden ser una sustitución, una eliminación o una inserción de uno o más codones que codifican el anticuerpo o el polipéptido que dan lugar a un cambio en la secuencia de aminoácidos en comparación con el anticuerpo o polipéptido de secuencia nativa. Opcionalmente, la variación es por sustitución de por lo menos un aminoácido por cualquier otro aminoácido en uno o más de los dominios del anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO. Al determinar qué residuo de aminoácido se puede insertar, sustituir o eliminar sin afectar de forma adversa la actividad deseada, se puede encontrar una guía mediante la comparación de la secuencia del anticuerpo anti-TAHO o el polipéptido TAHO con la de las moléculas de proteínas conocidas homólogas y minimizando el número de cambios

en la secuencia de aminoácidos realizados en regiones con elevada homología. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser el resultado de la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que tiene una estructura y/o propiedades químicas similares, tales como la sustitución de una leucina por una serina, es decir, sustituciones conservativas de aminoácidos. Las inserciones o eliminaciones pueden estar opcionalmente en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida se puede determinar realizando sistemáticamente inserciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia y probando en las variantes resultantes la actividad mostrada por la secuencia nativa de longitud completa o madura.

[0186] En la presente invención se proporcionan fragmentos de anticuerpo anti-TAHO y polipéptido TAHO. Dichos fragmentos pueden estar truncados en el extremo N-terminal o C-terminal, o pueden carecer de residuos internos, por ejemplo, cuando se comparan con un anticuerpo o proteína nativa de longitud completa. Ciertos fragmentos carecen de residuos de aminoácidos que no son esenciales para una actividad biológica deseada del anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO.

[0187] Los fragmentos del anticuerpo anti-TAHO y polipéptido TAHO se pueden preparar mediante cualquiera de un conjunto de técnicas convencionales. Los fragmentos de péptidos deseados se pueden sintetizar químicamente. Un enfoque alternativo implica la generación de fragmentos de anticuerpo o polipéptido mediante digestión enzimática, por ejemplo, tratando la proteína con una enzima conocida para dividir proteínas en los sitios definidos por residuos de aminoácidos concretos o mediante la digestión del ADN con enzimas de restricción adecuadas y el aislamiento del fragmento deseado. Otra técnica adecuada implica el aislamiento y la amplificación de un fragmento de ADN que codifica un fragmento de anticuerpo o polipéptido deseado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos que definen los extremos deseados del fragmento de ADN se utilizan en los cebadores de los extremos 5' y 3' en la PCR. Preferiblemente, los fragmentos de anticuerpo anti-TAHO y polipéptido TAHO comparten por lo menos una actividad biológica y/o inmunológica con el anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO nativos descritos aquí.

[0188] En realizaciones particulares, las sustituciones conservativas de interés se muestran en la Tabla 6 bajo el encabezamiento de "sustituciones preferidas". Si dichas sustituciones dan lugar a un cambio en la actividad biológica, entonces se introducen cambios más sustanciales denominados "ejemplos de sustituciones" en la Tabla 6 o, tal como se describe posteriormente en referencia a clases de aminoácidos, y se criban los productos.

Tabla 1

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

[0189] Las modificaciones sustanciales en la función o identidad inmunológica del anticuerpo anti-TAHO o el polipéptido TAHO se realizan mediante la selección de sustituciones que difieren significativamente en su efecto de mantener (a) la estructura del esqueleto del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación de hélice o lámina, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los residuos naturales se dividen en grupos basados en propiedades comunes de la cadena lateral:

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

[0190] Las sustituciones no conservativas comprenderán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase. Dichos residuos sustituidos también se pueden introducir en sitios de sustitución conservativa o, más preferiblemente, en los sitios restantes (no conservados).

5

[0191] Las variaciones se pueden realizar utilizando procedimientos conocidos en la técnica tales como la mutagénesis mediada por oligonucleótidos (dirigida de sitio), el rastreo de alanina, y mutagénesis por PCR. Para fabricar el ADN variante del anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO se puede llevar a cabo sobre el ADN clonado una mutagénesis dirigida de sitio [Carter et al., Nucl. Acids. Res., **13**: 4331 (1986); Zoller et al., Nucl. Acids. Res., **10**: 6487 (1987)], mutagénesis de cassette [Wells et al., Gene, **34** 315 (1985)], mutagénesis de selección de restricción [Wells et al., Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 (1986)] u otras técnicas conocidas.

[0192] El análisis de aminoácido por rastreo también se puede realizar para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua. Entre los aminoácidos de rastreo preferidos están los aminoácidos relativamente pequeños y neutros. Entre dichos aminoácidos se incluyen alanina, glicina, serina y cisteína. La alanina es habitualmente un aminoácido de rastreo preferido de este grupo ya que elimina la cadena lateral más allá del carbono beta y es menos probable que altere la conformación de la cadena principal de la variante [Cunningham y Wells, Science, 244:1081-1085 (1989)]. La alanina es también habitualmente preferida ya que es el aminoácido más habitual. Además, se encuentra frecuentemente tanto en posiciones escondidas como expuestas [Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman and Co., N.Y.), Chothia, J. Mol. Biol., 150:1 (1976)]. Si la sustitución de alanina no produce cantidades adecuadas de variante, se puede utilizar un aminoácido isotérico.

[0193] También se puede sustituir, generalmente por serina, cualquier residuo de cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación correcta del anticuerpo anti-TAHO o el polipéptido TAHO para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar la reticulación aberrante. En cambio, se pueden añadir el enlace o enlaces de cisteína al anticuerpo anti-TAHO o el polipéptido TAHO para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fv).

[0194] Un tipo particularmente preferido de variante por sustitución implica la sustitución de uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, la variante o variantes resultantes seleccionadas para el desarrollo posterior tendrán propiedades biológicas mejoradas en relación al anticuerpo parental del cual se generan. Una manera conveniente para generar dichas variantes por sustitución implica la maduración por afinidad utilizando la expresión en fagos. Brevemente, se mutan varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) para generar todas las posibles sustituciones amino en cada sitio. Las variantes de anticuerpo generadas de esta manera se expresan de manera monovalente a partir de partículas de fagos filamentosos como fusiones al producto del gen III de M13 empaquetados en cada partícula. A continuación, las variantes expresadas en el fago se criban por su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) tal como se describe en la presente invención. Con el fin de identificar los sitios candidatos de la región hipervariable para la modificación, se puede aplicar la mutagénesis por rastreo de alanina para identificar residuos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión a antígeno. Alternativamente, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura del cristal del complejo antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el polipéptido TAHO humano. Dichos residuos de contacto y residuos próximos son candidatos para la sustitución según las técnicas elaboradas en la presente invención. Una vez se generan dichas variantes, el panel de variantes se somete a cribado tal como se describe en la presente invención y se pueden seleccionar anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes para un desarrollo posterior.

[0195] Las moléculas de ácido nucleico que codifican las variantes en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-TAHO se preparan mediante una serie de procedimientos conocidos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, el aislamiento de una fuente natural (en el caso de variantes en las secuencias de aminoácidos naturales) o la preparación por mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida de sitio), la mutagénesis de PCR y la mutagénesis de cassette de una variante preparada anteriormente o una versión no variante del anticuerpo anti-TAHO.

H. Modificaciones de anticuerpos anti-TAHO y polipéptidos TAHO

55

[0196] Las modificaciones covalentes de los anticuerpos anti-TAHO están incluidas en la presente solicitud. Un tipo de modificación covalente incluye la reacción de residuos de aminoácidos marcados de un anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos N- o C-terminales del anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO. La derivatización con agentes bifuncionales es útil, por ejemplo, para reticular anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO con una matriz o superficie de soporte insoluble en agua para su utilización en el procedimiento para purificar anticuerpos anti-TAHO, y viceversa. Entre los agentes de reticulación utilizados habitualmente se incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azido salicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres disuccinimidílicos, tales como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), maleimidas bifuncionales, tales como bis-N-maleimido-1,8-octano y agentes, tales como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato.

[0197] Otras modificaciones incluyen la desamidación de residuos glutamilo y asparaginilo a los correspondientes residuos glutamilo y aspartilo, respectivamente, la hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de serilo o treonilo, metilación de los grupos α -amino de las cadenas laterales de lisina, arginina e histidina [T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, páginas 79-86 (1983)], acetilación de la amina N-terminal, y la amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

[0198] Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo anti-TAHO incluida en el alcance de la presente invención comprende la alteración del patrón de glicosilación nativo del anticuerpo o polipéptido. Por "alteración del patrón de glicosilación nativo" para los objetivos de la presente invención se pretende indicar la eliminación de uno o más grupos carbohidratos hallados en anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO de secuencia nativa (mediante la eliminación del sitio de glicosilación subyacente o mediante la eliminación de la glicosilación por medios químicos y/o enzimáticos), y/o la adición de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO de secuencia nativa. Además, la expresión incluye cambios cualitativos en la glicosilación de las proteínas nativas, implicando un cambio en la naturaleza y proporciones de los diversos grupos de carbohidrato presentes.

[0199] La glicosilación de anticuerpos y otros polipéptidos es habitualmente por unión a N o unión a O. La unión a N se refiere a la unión del grupo carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del grupo carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. De este modo, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripéptido en un polipéptido crea un potencial sitio de glicosilación. La glicosilación por unión a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un ácido hidroxiamino, más habitualmente serina o treonina, aunque también se pueden utilizar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

[0200] La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO se puede realizar convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos, de manera que contiene una o más de las secuencias tripéptido descritas anteriormente (para sitios de glicosilación unidos a N). La alteración se puede realizar, por ejemplo, mediante la adición de, o la sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO original (para sitios de glicosilación unidos a O). La secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO puede alterarse opcionalmente a través de los cambios a nivel de ADN, particularmente mediante la mutación del ADN que codifica el anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO en bases preseleccionadas, de manera que los codones que se generan se traducirán en los aminoácidos deseados.

[0201] Otros medios para aumentar el número de grupos carbohidrato en el anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO es mediante acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al polipéptido. Dichos procedimientos están descritos en la técnica, por ejemplo, en WO 87/05330 publicada el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 259-306 (1981).

[0202] La eliminación de grupos carbohidrato presentes en el anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO se puede realizar química o enzimáticamente o mediante sustitución mutacional de codones que codifican los residuos de aminoácidos que actúan como dianas para la glicosilación. Las técnicas de deglicosilación química son conocidas en la técnica y están descritas, por ejemplo, por Hakimuddin, et. al. *Arch. Biochem. Biophys.*, 259:52 (1987) y por Edge, et al. *Anal. Biochem.*, 118:131 (1981). La división enzimática de grupos carbohidrato en los polipéptidos se puede conseguir mediante la utilización de un conjunto de endo- y exoglicosidasas tal y como se describe en Thotakura et al. *Meth. Enzymol.*, 138:350 (1987).

[0203] Otro tipo de modificación covalente de anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO comprende la unión del anticuerpo o polipéptido a uno del conjunto de polímeros no proteináceos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la forma establecida en las Patentes de Estados Unidos Nos: 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 ó 4.179.337. El anticuerpo o polipéptido pueden también encapsularse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato) respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 16th edition, Osol, A. ed. (1980).

[0204] El anticuerpo anti-TAHO útil en la presente invención también se puede modificar de una manera que forme moléculas quiméricas que comprenden un anticuerpo anti-TAHO fusionado a otro polipéptido o secuencia de aminoácidos heterólogo.

[0205] En una realización, dicha molécula quimérica comprende una fusión del anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO con un polipéptido etiqueta que proporciona un epítipo al que se puede unir selectivamente un anticuerpo anti-etiqueta. El epítipo-etiqueta se sitúa generalmente en el extremo amino o carboxilo terminal del anticuerpo anti-

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

[0206] Alternativamente, la molécula quimérica puede comprender una fusión del anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula quimérica (también referida como "inmunoadhesina"), dicha fusión podría ser a la región Fc de una molécula de IgG. Las fusiones de Ig incluyen preferiblemente la sustitución de una forma soluble (dominio transmembrana eliminado o inactivado) de un anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO en lugar de por lo menos una región variable de una molécula de Ig. En una realización particularmente preferida, la fusión de inmunoglobulina incluye la bisagra, CH y CH₃, o la bisagra, regiones CH₁, CH₂ y CH₃ de una molécula de IgG1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulinas, véase también la Patente de Estados Unidos No. 5.428.130 concedida el 27 de junio de 1995.

25 I. Preparación de anticuerpos anti-TAHO y polipéptidos TAHO

[0207] La siguiente descripción se refiere principalmente a la producción de anticuerpos anti-TAHO y polipéptidos TAHO mediante el cultivo de células transformadas o transfectadas con un vector que contiene ácido nucleico codifica anticuerpo anti-TAHO y polipéptido TAHO. Naturalmente, se prevé que se puedan utilizar procedimientos alternativos, que se conocen bien en la técnica, para preparar los anticuerpos anti-TAHO y polipéptidos TAHO. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos apropiada, o partes de la misma, se pueden producir mediante síntesis directa de péptidos utilizando técnicas de fase sólida [véase, por ejemplo, Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2154 (1963)]. La síntesis de proteínas *in vitro* se puede realizar utilizando técnicas manuales o mediante automatización. La síntesis automatizada se puede realizar, por ejemplo, utilizando un Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA) utilizando las instrucciones del fabricante. Se pueden sintetizar químicamente por separado varias partes del anticuerpo anti-TAHO o el polipéptido TAHO y combinarse utilizando procedimientos químicos o enzimáticos para producir el anticuerpo anti-TAHO o el polipéptido TAHO deseado.

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

[0208] El ADN que codifica el anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO se puede obtener a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido que se cree que posee el ARNm del anticuerpo anti-TAHO o el polipéptido TAHO y lo expresa a un nivel detectable. Por consiguiente, el ADN del anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO humano se puede obtener convenientemente a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido humano. El gen que codifica el anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO también se puede obtener a partir de una biblioteca genómica o mediante métodos de síntesis conocidos (por ejemplo, síntesis de ácidos nucleicos automatizada).

[0209] Las bibliotecas se pueden cribar con sondas (tales como oligonucleótidos de por lo menos aproximadamente 20-80 bases) diseñados para identificar el gen de interés o la proteína codificada por el mismo. El cribado del ADNc o biblioteca genómica con la sonda seleccionada se puede realizar utilizando procedimientos estándar, tal como se describe en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Un medio alternativo para aislar el gen que codifica el anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO es utilizar la metodología de PCR [Sambrook et al., supra; Dieffenbach et al., PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

[0210] Los siguientes Ejemplos describen técnicas para cribar una biblioteca de ADNc. Las secuencias de oligonucleótidos seleccionadas como sondas deberían ser de longitud suficiente y suficientemente inequívoca que se minimizan los falsos positivos. El oligonucleótido está preferiblemente marcado de manera que se puede detectar tras la hibridación a ADN en la biblioteca que se criba. Los procedimientos de marcado son bien conocidos en la técnica, e incluyen la utilización de radiomarcadores como ATP marcado con ³²P, biotilación o marcaje enzimático. Las condiciones de hibridación, incluyendo la astringencia moderada y la astringencia elevada, se proporcionan en Sambrook et al., supra.

[0211] Las secuencias identificadas en dichos procedimientos de cribado de bibliotecas se pueden comparar y

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

5

[0212] El ácido nucleico que tiene la secuencia de codificación de la proteína se puede obtener mediante el cribado del ADNc seleccionado o las bibliotecas genómicas utilizando la secuencia de aminoácidos deducida descrita en la presente invención por primera vez, y, si es necesario, utilizando procedimientos convencionales de extensión con cebadores tal y como se describe en Sambrook et al., *supra*, para detectar precursores y procesando intermedios de

10 ARNm que no se han transcrito de forma inversa en ADNc.

2. Selección y transformación de células huésped

[0213] Las células huésped se transfectan o transforman con vectores de expresión o clonación descritos en la presente invención para la producción del anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados para que sean adecuados para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Las condiciones de cultivo, tales como el medio, la temperatura, el pH y similares, se pueden seleccionar por un experto en la materia sin una experimentación excesiva. En general, los principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de cultivos celulares se pueden encontrar en Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) y Sambrook et al., *supra*.

[0214] Los procedimientos de transfección de células eucariotas y transformación de células procariotas son conocidos por el experto en la materia, por ejemplo, CaCl_2 , CaPO_4 , mediados por liposomas y electroporación. Dependiendo de la célula huésped utilizada, la transformación se realiza utilizando técnicas estándar adecuadas a dichas células. El tratamiento con calcio que utiliza cloruro cálcico, tal y como se describe en Sambrook et al., *supra*, o la electroporación se utilizan generalmente para procariotas. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se utiliza para la transformación de ciertas células vegetales, tal como describe Shaw et al., Gene, 23:315 (1983) y WO 89/05859 publicada el 29 de junio de 1989. Para las células de mamíferos sin dichas paredes celulares, se puede utilizar el procedimiento de precipitación con fosfato cálcico de Graham y van der Eb, Virology, 52: 456-457 (1978). En la Patente de Estados Unidos No. 4.399.216 se han descrito aspectos generales de transfecciones de sistemas de células huésped de mamíferos. Las transformaciones en levadura se llevan a cabo habitualmente según el procedimiento de Van Solingen et al., J. Bact., 130: 946 (1977) y Hsiao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76: 3829 (1979). Sin embargo, también se pueden utilizar otros procedimientos para introducir ADN en células, tales como mediante microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplasto bacteriano con células intactas, o policones, por ejemplo, polibreno, poliornitina. Para varias técnicas para transformar células de mamífero, ver Keown et al., Methods in enzymology, 185:527-537 (1990) y Manssur et al., Nature, 336. 348-352 (1988).

[0215] Entre las células huésped adecuadas para la clonación o expresión del ADN en los vectores de la presente invención se incluyen células procariotas, levadura, o eucariotas superiores. Entre las procariotas adecuadas se incluyen, pero no se limitan a, eubacterias, tales como organismos Gram-negativo o Gram-positivo, por ejemplo, Enterobacteriaceae, tal como *E. coli*. Varias cepas de *E. coli* están disponibles públicamente, tales como la cepa de *E. coli* K12 MM294 (ATCC 31.446); *E. coli* X1776 (ATCC 31.537); cepa de *E. coli* W3110 (ATCC 27.325) y cepa de *E. coli* K5772 (ATCC 53.635). Entre otras células huésped procariotas adecuadas se incluyen Enterobacteriaceae, tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como *Bacilli*, tal como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P descrito en DD 266.710 publicada el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas*, tal como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Estos ejemplos son más ilustrativos que limitantes. La Cepa W3110 es un huésped o huésped parental particularmente preferible ya que es una cepa de huésped habitual para fermentaciones de productos de ADN recombinante. Preferiblemente, la célula huésped secreta cantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la cepa W3110 se puede modificar para realizar una mutación genética en los genes que codifican proteínas endógenas al huésped, con ejemplos de dichos huéspedes incluyendo la cepa de *E. coli* W3110 1A2, que tiene el genotipo completo *tonA*; la cepa de *E. coli* W3110 9E4, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3*; la cepa de *E. coli* W3110 27C7 (ATCC 55.244), que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT kon*; la cepa de *E. coli* W3110 37D6, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT rbs7 ilvG kan*; la cepa de *E. coli* W3110 40B4, que es una cepa 37D6 con una mutación de eliminación *degP* no resistente a kanamicina; y una cepa de *E. coli* que tiene proteasa periplásmica mutante descrita en la Patente de Estados Unidos No. 4.946.783 concedida el 7 de agosto de 1990. Alternativamente, son adecuados procedimientos de clonación *in vitro*, por ejemplo, PCR u otras reacciones de ácido nucleico polimerasa.

60

[0216] El anticuerpo de longitud completa, fragmentos de anticuerpo y proteínas de fusión de anticuerpos se pueden producir en bacterias, en particular cuando no son necesarias la glicosilación y la función efectora de Fc, tal como cuando el anticuerpo terapéutico se conjuga a un agente citotóxico (por ejemplo, una toxina) y el inmunoconjugado por sí mismo muestra eficacia en la destrucción de la célula tumoral. Los anticuerpos de longitud completa presentan una vida media mayor en la circulación. La producción en *E. coli* es más rápida y más rentable. Para la expresión de fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias, véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos 5,648,237

65

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

[0217] Además de los procariotas, los microbios eucariotas, tales como hongos filamentosos o levaduras, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican el anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO. El *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo huésped eucariótico inferior utilizado habitualmente. Otros incluyen *Schizosaccharomyces pombe* (Beach and Nurse, Nature, 290: 140 [1981]; EP 139.383 publicada el 2 de mayo de 1985); huéspedes *Kluyveromyces* (Patente de Estados Unidos No. 4.943.529; Fleer et al., Bio/Technology, 9:968-975 (1991)) tal como, por ejemplo, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS574; Louvencourt et al. J. Bacteriol., 737 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilae* (ATCC 36.906; Van den Berg et al., Bio/Technology, 8:135(1990)), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402.226); *Pichia pastoris* (EP 183.070; Sreekrishna et al., J. Basic. Microbiol. 28:265-278 [1988]); *Candida*; *Trichoderma reesei* (EP 244.234); *Neurospora crassa* (Case et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5259-5263 [1979]); *Schwanniomyces*, tales como *Schwanniomyces occidentalis* (EP 394.538, publicada el 31 de octubre de 1990); y hongos filamentosos, tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (WO 91/00357 publicada el 10 de enero de 1991), y huéspedes *Aspergillus*, tales como *A. nidulans* (Ballance et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 112:284-289 [1983]; Tilbum 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 metilótropas son adecuadas en la presente invención e incluyen, pero no se limitan a, levadura capaz del crecimiento en metanol seleccionada del género que consiste en *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, y *Rhodotorula*. Una lista de especies específicas que son ejemplos de esta clase de levaduras se puede encontrar en C. Anthony, The Biochemistry of Methylophilic, 269 (1982).

[0218] Las células huésped adecuadas para la expresión de anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO glicosilados se derivan de organismos multicelulares. Entre los ejemplos de células de invertebrados se incluyen células de insectos, tales como *Drosophila* S2 y *Spodoptera Sf9*, así como células vegetales, tales como cultivos celulares de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco. Se han modificado numerosas cepas baculovíricas y variantes y las correspondientes células huéspedes de insecto permisivas de huéspedes, tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), y *Bombyx mori*. Una serie de cepas víricas para la transfección están públicamente disponibles, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y dichos virus se pueden utilizar como el virus del presente documento según la presente invención, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

[0219] Sin embargo, el mayor interés ha estado en las células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrados en un cultivo (cultivo de tejidos) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Entre los ejemplos de líneas celulares de huéspedes mamíferos útiles están la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón de embrión humano (células 293 ó 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo de suspensión, Graham et al., J. Gen. Virol., 36:59 (1977)); células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10; células de ovario de hámster chino/DHFR (CHO. Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4 y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

[0220] Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción del anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO y se cultivan en un medio con nutrientes habituales modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

3. Selección e utilización de un vector replicable

[0221] El ácido nucleico (por ejemplo, ADNc o ADN genómico), que codifica el anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO se puede insertar en un vector replicable para la clonación (amplificación del ADN) o para la expresión. Existen varios vectores disponibles públicamente. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de plásmido, cósmido, partícula viral, o fago. La secuencia de ácidos nucleicos apropiada se puede insertar en el vector mediante una serie de procedimientos. En general, el ADN se inserta en un sitio o sitios de endonucleasa de restricción apropiados utilizando técnicas conocidas en el sector. Los componentes de los vectores incluyen generalmente, pero no se limitan a, una o más secuencias señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción. La construcción de vectores

adecuados que contienen uno o más de estos componentes utiliza técnicas de unión estándar que son conocidas por un experto en la materia.

[0222] El polipéptido TAHO se puede producir recombinantemente no sólo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de división específico en el extremo N-terminal de la proteína o polipéptido maduro. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN que codifica el anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO que se inserta en el vector. La secuencia señal puede ser una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de secuencias líderes de la fosfatasa alcalina, penicilinas, Ipp o enterotoxina II estable térmicamente. Para la secreción en levaduras, la secuencia señal puede ser, por ejemplo, la secuencia líder de invertasa de levadura, la secuencia líder del factor alfa (incluyendo las secuencias líder del factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, la última descrita en la Patente de Estados Unidos No. 5.010.182), o la secuencia líder de fosfatasa ácida, la secuencia líder de *C. Albicans* glucoamilasa (EP 362.179 publicada el 4 de abril de 1990) o la señal descrita en WO 90/13646, publicada el 15 de noviembre de 1990. En la expresión de células de mamíferos, las secuencias señal de mamíferos se pueden utilizar para dirigir la secreción de la proteína, tales como secuencias señal de polipéptidos secretados de la misma especie o especies relacionadas, así como secuencias líderes secretoras virales.

[0223] Ambos vectores de expresión y clonación contienen una secuencia de ácidos nucleicos que permite la replicación del vector en una o más células huésped seleccionadas. Dichas secuencias son conocidas para un conjunto de bacterias, levadura, y virus. El origen de la replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de bacterias gram-negativas, el origen del plásmido μ es adecuado para la levadura, y orígenes virales varios (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamíferos.

[0224] Los vectores de clonación y expresión contendrán habitualmente un gen de selección, también denominado como marcador seleccionable. Los genes de selección habituales codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan las deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles del medio complejo, por ejemplo, el gen que codifica D-alanina racemasa para *Bacilli*.

[0225] Un ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamíferos son aquéllos que permiten la identificación de células competentes para captar el ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-TAHO o el polipéptido TAHO, tal como DHFR o timidina quinasa. Una célula huésped apropiada cuando se utiliza DHFR de tipo salvaje es la línea de células CHO deficiente en actividad de DHFR, preparada y propagada tal y como se describe por Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980). Un gen de selección adecuado para su utilización en la levadura es el gen *trp1* presente en el plásmido de la levadura YRp7 [Stinchcomb et al., Nature, 282:39 (1979); Kingsman et al., Gene, 7:141 (1979); Tschemper et al., Gene, 10:157 (1980)]. El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC No. 44076 o PEP4-1 [Jones, Genetics, 85:12 (1977)].

[0226] Los vectores de clonación y expresión contienen habitualmente un promotor unido operativamente a la secuencia de ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-TAHO o el polipéptido TAHO para dirigir la síntesis de ARNm. Son conocidos promotores reconocidos por un conjunto de células huésped potenciales. Entre los promotores adecuados para utilizar con huéspedes procariotas se incluyen los sistemas de promotores de β -lactamasa y lactosa [Chang et al., Nature, 275:615 (1978); Goeddel et al., Nature, 281:544 (1979)], fosfatasa alcalina, un sistema de promotor de triptófano (*trp*) [Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); EP 36.776], y promotores híbridos, tales como el promotor *tac* [deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)]. Los promotores para utilizar en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) unida operativamente al ADN que codifica el anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO.

[0227] Entre los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para su utilización con huéspedes de levadura se incluyen promotores para 3-fosfoglicerato quinasa [Hitzeman et al., J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)] u otros enzimas glucolíticos [Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900 (1978)], tal como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucoisomerasa y glucoquinasa.

[0228] Otros promotores de levaduras, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de una transcripción controlada por las condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradativas asociadas con el metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Los vectores y promotores adecuados para la utilización en la expresión en levaduras se describen en detalle en EP 73.657.

[0229] La transcripción del anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO a partir de vectores en células huésped de mamíferos está controlada, por ejemplo, mediante promotores obtenidos de los genomas de virus, tales como virus

del poliovirus, virus de la viruela aviar (Patente UK 2.211.504 publicada el 5 de julio de 1989), adenovirus (tal como el Adenovirus 2), el virus de papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis-B y virus de simio 40 (SV40), a partir de promotores de mamíferos heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, y a partir de promotores de choque térmico, siempre y cuando dichos
5 promotores sean compatibles con los sistemas de células huésped.

[0230] Se puede incrementar la transcripción de un ADN que codifica el anticuerpo anti-TAHO o el polipéptido TAHO por eucariotas superiores mediante la inserción de una secuencia de potenciador en el vector. Los potenciadores son elementos que actúan en cis de ADN, habitualmente aproximadamente de 10 a 300 pb, que actúan en un
10 promotor para aumentar su transcripción. Actualmente se conocen muchas secuencias de potenciadores de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Habitualmente, sin embargo, se utilizará un potenciador de un virus de célula eucariota. Entre los ejemplos se incluyen el potenciador de SV40 en la cara tardía del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador de promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de poliovirus en la cara tardía del origen de replicación, y los potenciadores de adenovirus. El potenciador se puede
15 cortar y empalmar ("splice") en el vector en una posición 5' ó 3' con respecto a la secuencia codificante del anticuerpo anti-TAHO o el polipéptido TAHO, pero se sitúa preferiblemente en un sitio 5' con respecto al promotor.

[0231] Los vectores de expresión utilizados en células huéspedes eucariotas (levadura, hongos, insectos, plantas, animales, humanos, o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias
20 necesarias para la terminación de la transcripción y para la estabilización del ARNm. Dichas secuencias están disponibles habitualmente desde las regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente 3', de ADN's o ADN's eucariotas o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica el anticuerpo anti-TAHO o el polipéptido TAHO.

[0232] En Gething et al., *Nature*, 293:620-625 (1981); Mantei et al., *Nature*, 281:40-46 (1979); EP 117.060 y EP 117.058 se describen adicionalmente otros procedimientos, vectores, y células huésped adecuados para la adaptación a la síntesis del anticuerpo anti-TAHO o el polipéptido TAHO en cultivos de células de vertebrados recombinantes.

30 4. cultivo de células huésped

[0233] Las células huésped utilizadas para producir el anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO se pueden cultivar en un conjunto de medios. Los medios comercialmente disponibles, tales como F10 de Ham (Sigma), Medio Mínimo Esencial ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y Medio de Eagle Modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) son
35 adecuados para cultivar células huésped. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham et al., *Meth. Enz.*, 58: 44 (1979), Barnes et al., *Anal. Biochem.* 102: 255 (1980), Patente de Estados Unidos Nos. 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; o 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; o la Patente de Estados Unidos Re. 30,985 se pueden utilizar como medios de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios se puede complementar según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina
40 o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMICINATM), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos presentes normalmente a concentraciones finales en el rango micromolar) y la glucosa o una fuente de energía equivalente. También se puede incluir cualquier otro complemento necesario en las concentraciones apropiadas que serían conocidas por un
45 experto en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, el pH y similares, son las utilizadas previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión y será evidente para el experto en la materia.

5. Detección de la amplificación/expresión de los genes

[0234] La amplificación y/o expresión de los genes se puede medir en una muestra directamente, por ejemplo, mediante transferencia Southern convencional, transferencia Northern convencional para cuantificar la transcripción de ARNm [Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:5201-5205 (1980)], transferencia de puntos (análisis de ADN), o hibridación *in situ*, utilizando una sonda marcada apropiadamente, basada en las secuencias proporcionadas en la presente invención. Alternativamente, se pueden utilizar anticuerpos que pueden reconocer dobles cadenas
55 específicas, incluyendo dobles cadenas de ADN, dobles cadenas de ARN, dobles cadenas híbridas de ADN-ARN o dobles cadenas de ADN-proteína. Los anticuerpos a su vez se pueden marcar y el ensayo se puede llevar a cabo cuando la doble cadena está unida a una superficie, de manera que tras la formación de la doble cadena en la superficie, se puede detectar la presencia de anticuerpos unidos a la doble cadena.

[0235] La expresión génica, alternativamente, se puede medir mediante procedimientos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de células o secciones de tejido y el ensayo de cultivo de células o fluidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto génico. Los anticuerpos útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o el ensayo de fluidos de muestra pueden ser monoclonales o policlonales, y se pueden preparar en cualquier mamífero. Convenientemente, los anticuerpos se pueden preparar contra un polipéptido TAHO
65 de secuencia nativa o contra un péptido sintético basado en las secuencias de ADN proporcionadas en la presente invención o contra una secuencia exógena fusionada a ADN de TAHO que codifica un epítipo de anticuerpo

específico.

6. Purificación de anticuerpo anti-TAHO y polipéptido TAHO

5 **[0236]** Las formas de anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO se pueden recuperar del medio de cultivo o de los lisados de células huésped. Si está unido a membrana, se puede liberar de la membrana utilizando una solución de detergente adecuada (por ejemplo, Triton X-100) o mediante división enzimática. Las células utilizadas en la expresión del anticuerpo anti-TAHO y polipéptido TAHO se pueden romper mediante diversos medios físicos o químicos, tales como ciclos de congelación-descongelación, sonicación, destrucción mecánica, o agentes para lisar
10 células.

[0237] Se puede desear purificar el anticuerpo anti-TAHO y el polipéptido TAHO a partir de proteínas o polipéptidos de células recombinantes. Los siguientes procedimientos son ejemplos de procedimientos de purificación adecuados: mediante fraccionamiento en una columna de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase
15 inversa; cromatografía sobre sílice o una resina de intercambio catiónico, tal como DEAE; "cromatofocusing"; SDS-PAGE; precipitación con sulfato amónico; filtración en gel utilizando, por ejemplo, Sephadex G-75; columnas de proteína A sefrosa para eliminar contaminantes, tales como IgG, y columnas quelantes de metales para unir formas etiquetadas con epítipo del anticuerpo anti-TAHO y el polipéptido TAHO. Se pueden utilizar varios métodos de purificación de proteínas y dichos métodos son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Deutscher,
20 *Methods in Enzymology*, 182 (1990); Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, Nueva York (1982). La etapa o etapas de purificación seleccionadas dependerán, por ejemplo, de la naturaleza del proceso de producción utilizado y el anticuerpo anti-TAHO o polipéptido TAHO concreto producido.

[0238] Cuando se utilizan técnicas recombinantes, el anticuerpo se puede producir intracelularmente, en el espacio
25 periplásmico, o se secreta directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como primera etapa, se elimina el debris particulado, ya sean células huésped o fragmentos lisados, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter et al., *Bio/Technology* 10:163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E. coli*. Brevemente, la pasta celular se descongela en presencia de acetato sódico (pH 3,5), EDTA y fluoruro de fenilmetilsulfonil (PSMF) durante aproximadamente 30
30 minutos. La debris celular se puede eliminar mediante centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta en el medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión en general se concentran en primer lugar utilizando un filtrador de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de proteasa, tal como PMSF, en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para prevenir el crecimiento de contaminantes extraños.

[0239] La composición de anticuerpos preparada a partir de las células se puede purificar utilizando, por ejemplo, cromatografía de hidroxipatita, electroforesis en gel, diálisis, y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La adecuación de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier región Fc de inmunoglobulina que está presente en el anticuerpo. La proteína A se
40 puede utilizar para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ humanas (Lindmark et al., *J. Immunol. Meth.* 62: 1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humana (Guss et al., *EMBO J.* 5: 1565-1575 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad es frecuentemente agarosa, pero hay otras matrices disponibles. Las matrices mecánicamente estables, tales como vidrio de poro controlado o poli(estirenodivinil)benceno permiten velocidades de flujo más elevadas y tiempos de procesamiento más
45 cortos que los conseguidos con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio C_{H3} , la resina Bakerbond ABXTM (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas, tales como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de Fase Inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina SEPHAROSETM, cromatografía en una resina de intercambio aniónica o catiónica (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatofocusing ("chromatofocusing"), SDS-
50 PAGE y precipitación con sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo a recuperar.

[0240] Tras la etapa o etapas de purificación preliminar, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y contaminantes se puede someter a una cromatografía de interacción hidrofóbica de pH bajo utilizando un tampón de elución a un pH entre aproximadamente 2,5 y 4,5, preferiblemente se realiza a concentraciones bajas de sal (por
55 ejemplo, de aproximadamente 0-0,25 M de sal).

J. Formulaciones farmacéuticas

[0241] Las formulaciones terapéuticas de los anticuerpos anti-TAHO utilizados según la presente solicitud se
60 preparan para su almacenamiento mediante la mezcla del anticuerpo que tiene el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizantes opcionales farmacéuticamente aceptables (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16^a Edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizantes aceptables son no tóxicos para los receptores en las dosis y concentraciones utilizadas, e incluyen tampones, tales como acetato, Tris, fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos;
65 antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como, cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico;

alquil parabens, tales como metil o propil paraben; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de peso molecular bajo (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; tonificantes, tales como terhalosa y cloruro sódico; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; tensoactivos, tales como polisorbato; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos de metales (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensoactivos no iónicos, tales como TWEENTM, PLURONICSTM o polietilenglicol (PEG). El anticuerpo comprende preferiblemente el anticuerpo a una concentración entre 5 y 200 mg/ml, preferiblemente entre 10 y 100 mg/ml.

[0242] La formulación de la presente invención también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la enfermedad concreta a tratar, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no afectan de forma adversa entre sí. Por ejemplo, además del anticuerpo anti-TAHO puede ser deseable incluir en la formulación un anticuerpo adicional, por ejemplo, un segundo anticuerpo anti-TAHO que se une a un epítipo diferente en el polipéptido TAHO, o un anticuerpo para alguna otra diana, tal como un factor de crecimiento que afecta al crecimiento del cáncer concreto. Alternativamente, o adicionalmente, la composición puede comprender además un agente quimioterapéutico, un agente citotóxico, una citoquina, un agente inhibidor del crecimiento, un agente anti-hormonal, y/o un cardioprotector. Dichas moléculas están presentes de forma adecuada combinadas en cantidades que son eficaces para el objetivo pretendido.

[0243] Los principios activos también pueden estar contenidos en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización entre fases, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metilmacrilato), respectivamente, en sistemas de liberación de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se describen en *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16^a Edición, Osol, A. Ed. (1980).

[0244] Se pueden preparar preparaciones de liberación controlada. Entre los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación controlada se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Entre los ejemplos de matrices de liberación controlada se incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(vinilalcohol)), poliláctidos (Patente de Estados Unidos No. 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, copolímeros de etileno-acetato de vinilo no degradables, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables, tales como el LUPRON DEPOTTM (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolide) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

[0245] Las formulaciones a utilizar para la administración in vivo deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante la filtración a través de membranas de filtración estériles.

K. Tratamiento con anticuerpos Anti-TAHO, oligopéptidos de unión a TAHO y moléculas orgánicas de unión a TAHO

[0246] Para determinar la expresión de TAHO en el cáncer, están disponibles varios ensayos de detección. En una realización, la sobreexpresión del polipéptido TAHO puede analizarse mediante inmunohistoquímica (IHC). Las secciones de tejido bañadas en parafina de una biopsia de tumor pueden someterse al ensayo IHC y acordarse unos criterios de intensidad de tinción de la proteína TAHO tal y como se indica a continuación:

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

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

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

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

[0247] Los tumores con una valoración 0 ó 1+ para la expresión de polipéptido TAHO pueden caracterizarse como que no sobreexpresan TAHO, mientras que los tumores con resultados 2+ o 3+ pueden caracterizarse como que sobreexpresan TAHO.

[0248] Alternativamente, o adicionalmente, pueden realizarse ensayos FISH tal como el INFORM® (vendido por Ventana, Arizona) o PATHVISION® (Vysis, Illinois) en tejido tumoral fijado a formalina y bañado en parafina para determinar el grado (si la hay) de sobreexpresión de TAHO en el tumor.

[0249] Puede evaluarse la amplificación o la sobreexpresión de TAHO utilizando un ensayo de detección *in vivo*, por ejemplo, mediante la administración de una molécula (como un anticuerpo, un oligopéptido o una molécula orgánica) que une a la molécula a detectar y que está marcado con una etiqueta detectable (por ejemplo, un isótopo radioactivo o una marca fluorescente) y escaneando externamente el paciente para la localización de la marca.

[0250] Tal y como se describe anteriormente, los anticuerpos anti-TAHO, oligopéptidos y moléculas orgánicas tienen varias aplicaciones no terapéuticas. Los anticuerpos anti-TAHO, oligopéptidos y moléculas orgánicas pueden ser útiles para destacar los cánceres que expresan los polipéptidos TAHO (por ejemplo, en radioimagen). Los anticuerpos, oligopéptidos y moléculas orgánicas también son útiles para la purificación o la inmunoprecipitación de polipéptido TAHO a partir de células, para la detección y la cuantificación de polipéptido TAHO *in vitro*, por ejemplo, en un ELISA o una transferencia Western, para matar o eliminar células que expresan TAHO de una población de células mezcladas como una etapa en la purificación de las otras células.

[0251] Actualmente, dependiendo del estadio del cáncer, el tratamiento del cáncer implica una o una combinación de las siguientes terapias: cirugía para eliminar el tejido canceroso, radioterapia, y quimioterapia. La terapia con anticuerpo anti-TAHO, oligopéptido o molécula orgánica puede ser deseable especialmente en pacientes ancianos que no toleran bien la toxicidad y los efectos secundarios de la quimioterapia y en enfermedad metastásica donde la radioterapia tiene una utilidad limitada. Los anticuerpos anti-TAHO de la solicitud que reconocen el tumor son útiles para paliar los cánceres que expresan TAHO tras su diagnóstico inicial de la enfermedad o durante la recaída. Para aplicaciones terapéuticas, el anticuerpo anti-TAHO puede utilizarse solo, o en terapia de combinación con, por ejemplo, hormonas, antiangiogénicos, o compuestos radiomarcados, o con cirugía, crioterapia, y/o radioterapia. El tratamiento con anticuerpo anti-TAHO puede administrarse conjuntamente con otras formas de terapia convencional, ya sea consecutivamente con, terapia pre- o post-convencional. Se utilizan fármacos quimioterapéuticos como TAXOTERE® (docetaxel), TAXOL® (paclitaxel), estramustina y mitoxantrona en el tratamiento del cáncer, en concreto, en pacientes con riesgo. En los medicamentos actuales de la aplicación para tratar o paliar el cáncer, a los pacientes de cáncer se les puede administrar anticuerpo anti-TAHO conjuntamente con el tratamiento con uno o más de los agentes quimioterapéuticos anteriores. En concreto, se contempla la terapia de combinación con paclitaxel y derivados modificados (ver, por ejemplo, EP0600517). Se administrará el anticuerpo anti-TAHO con una dosis terapéuticamente efectiva del agente quimioterapéutico. En otra realización, se administra el anticuerpo anti-TAHO conjuntamente con quimioterapia para potenciar la actividad y la eficacia del agente quimioterapéutico, por ejemplo, paclitaxel. La Physicians' Desk Reference (PDR) describe dosis de estos agentes que han sido utilizados en el tratamiento de varios cánceres. El régimen de dosificación y la dosis de estos fármacos quimioterapéuticos anteriormente mencionados que son efectivos terapéuticamente dependerán del cáncer concreto que se trata, la extensión de la enfermedad y otros factores familiares para los médicos con experiencia y pueden ser determinados por el médico.

[0252] En una realización particular, se administra al paciente un conjugado que comprende un anticuerpo anti-TAHO conjugado con un agente citotóxico. El inmunoconjugado unido a la proteína TAHO es internalizado por la célula, dando lugar a una eficacia terapéutica incrementada del inmunoconjugado en matar la célula cancerosa a la que se une. En una realización preferente, el agente citotóxico reconoce o interfiere con el ácido nucleico en la célula cancerosa. Anteriormente se han descrito ejemplos de dichos agentes citotóxicos y se incluyen maitansinoides, caliqueamicinas, ribonucleasas y ADN endonucleasas.

[0253] Se administran los anticuerpos anti-TAHO a un paciente humano, según los procedimientos conocidos, tales como administración intravenosa, por ejemplo, como un bolo o mediante infusión continua durante un periodo de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, o inhalación. Se prefiere la administración intravenosa o subcutánea del anticuerpo.

[0254] Otros regímenes terapéuticos pueden combinarse con la administración del anticuerpo anti-TAHO. La administración combinada incluye co-administración, utilizando formulaciones separadas o una formulación farmacéutica única, y la administración consecutiva en cualquier orden, donde preferiblemente hay un periodo de tiempo a la vez que ambos (o todos) los agentes activos simultáneamente ejercen sus actividades biológicas. Preferiblemente dicha terapia combinada da lugar a un efecto terapéutico sinérgico.

[0255] También puede ser deseable combinar la administración del anticuerpo anti-TAHO o anticuerpos, con la administración de un anticuerpo dirigido contra otro antígeno de tumor asociado con el cáncer concreto.

[0256] En otra realización, los medicamentos terapéuticos para su uso en tratamientos de la presente solicitud implican la administración combinada de un anticuerpo anti-TAHO (o anticuerpos y uno o más agentes quimioterapéuticos o agentes inhibidores del crecimiento, incluyendo la coadministración de cócteles de diferentes agentes quimioterapéuticos). Entre los agentes quimioterapéuticos preferidos se incluyen fosfato de estramustina, prednimustina, cisplatino, 5-fluorouracilo, melfalano, ciclofosfamida, hidroxiaurea e hidroxiaureataxanos (tales como paclitaxel y doxetaxel) y/o antibióticos de antraciclina. La preparación y pautas de dosificación para dichos agentes quimioterapéuticos se pueden utilizar según las instrucciones de los fabricantes o tal como se determina empíricamente por el técnico en la materia. La preparación y pautas de dosificación para dicha quimioterapia también se describen en Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992).

[0257] El anticuerpo se puede combinar con un compuesto anti-hormonal, por ejemplo, un compuesto anti-estrógeno, tal como tamoxifeno; una anti-progesterona, tal como onapristona (véase, EP 616 812); o un anti-andrógeno, tal como flutamida, en dosis conocidas para dichas moléculas. Cuando el cáncer a tratar es un cáncer independiente de andrógeno, el paciente puede haber sido sometido previamente a terapia anti-andrógeno y,

después de que el cáncer se convierta en independiente de andrógeno, se puede administrar al paciente el anticuerpo anti-TAHO (y opcionalmente otros agentes tal como se describen en la presente invención).

[0258] A veces, puede ser beneficioso coadministrar también un cardioprotector (para evitar o reducir la disfunción miocárdica asociada con la terapia) o una o más citoquinas al paciente. Además de los regímenes terapéuticos anteriores, el paciente se puede someter a una extracción quirúrgica de células cancerosas y/o terapia de radiación, antes, simultáneamente o posteriormente a la terapia con anticuerpos. Las dosis adecuadas para cualquiera de los agentes coadministrados anteriores son aquellas utilizadas actualmente y pueden disminuir debido a la acción combinada (sinergia) del agente y el anticuerpo anti-TAHO.

[0259] Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosis y el modo de administración serán elegidos por el médico según criterios conocidos. La dosis apropiada de anticuerpo dependerá del tipo de enfermedad a tratar, tal y como se ha definido anteriormente, la gravedad y la evolución de la enfermedad, si el anticuerpo se administra con objetivos de prevención o terapéuticos, terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta al anticuerpo, y el criterio del médico responsable. El anticuerpo se administra de forma adecuada al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. Preferiblemente, el anticuerpo se administra mediante perfusión intravenosa o mediante inyecciones subcutáneas. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente de 1 µg/kg hasta 50 mg/kg (por ejemplo, 0,1-15 mg/kg/dosis) de anticuerpo puede ser una dosis candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, mediante, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Una pauta de dosificación puede comprender administrar una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguido de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg del anticuerpo anti-TAHO. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. Una dosis diaria habitual podría variar desde, aproximadamente, 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la enfermedad, el tratamiento se mantiene hasta que tiene lugar la desaparición deseada de los síntomas de la enfermedad. El progreso de esta terapia se puede monitorizar fácilmente mediante técnicas y ensayos convencionales y en base a criterios conocidos para el médico u otras personas expertas.

[0260] A parte de la administración de la proteína anticuerpo al paciente, la presente solicitud contempla la administración del anticuerpo mediante terapia génica. Dicha administración de ácido nucleico que codifica el anticuerpo esta comprendida por la expresión "administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo". Véase, por ejemplo, WO96/07321 publicada el 14 de marzo de 1996 que se refiere al uso de la terapia génica para generar anticuerpos intracelulares.

[0261] Existen dos estrategias principales para introducir el ácido nucleico (opcionalmente contenido en un vector) en las células del paciente; *in vivo* y *ex vivo*. Para la liberación *in vivo*, el ácido nucleico se inyecta directamente en el paciente, normalmente en el punto donde se necesita el anticuerpo. Para el tratamiento *ex vivo*, se extraen las células del paciente, el ácido nucleico se introduce en estas células aisladas y se administran las células modificadas al paciente, ya sea directamente o, por ejemplo, encapsuladas en membranas porosas que se implantan en el paciente (véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nos. 4.892.538 y 5.283.187). Existen una serie de técnicas disponibles para introducir ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas varían dependiendo de si el ácido nucleico se transfiere en células cultivadas *in vitro*, o *in vivo* en las células del huésped pretendido. Las técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico en células de mamíferos *in vitro* incluyen el uso de liposomas, electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano, el método de precipitación con fosfato de calcio, etc. Un vector utilizado normalmente para la liberación *ex vivo* del gen es un retrovirus.

[0262] Entre las técnicas actuales de transferencia de ácido nucleico *in vivo* preferidas se incluyen la transfección con vectores virales (tales como adenovirus, virus del herpes simplex I, o virus adenoasociados) y sistemas basados en lípidos (lípidos útiles para la transferencia mediada por lípidos del gen son, por ejemplo, DOTMA, DOPE y DC-Chol). Para una revisión de los protocolos de marcaje génico y terapia génica actualmente conocidos, véase Anderson et al., Science 256: 808-813 (1992). Véase también WO 93/25673 y las referencias citadas en la misma.

[0263] Los anticuerpos anti-TAHO útiles en la presente invención pueden estar en las diferentes formas comprendidas por la definición de "anticuerpo" de la presente invención. De este modo, los anticuerpos incluyen anticuerpos de longitud completa o intactos, fragmentos de anticuerpos, variantes de anticuerpo o aminoácidos de secuencia nativa, anticuerpos humanizados, quiméricos o de fusión, inmunoconjugados y fragmentos funcionales de los mismos. En los anticuerpos de fusión, se fusiona una secuencia de anticuerpo a una secuencia de polipéptido heterólogo. Los anticuerpos se pueden modificar en la región Fc para proporcionar las funciones efectoras deseadas. Tal como se describe en detalle en las secciones de la presente invención, con las regiones Fc apropiadas, el anticuerpo desnudo unido en la superficie celular puede inducir citotoxicidad, por ejemplo, a través de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o mediante el reclutamiento de complemento en citotoxicidad dependiente de complemento, o algún otro mecanismo. Alternativamente, se pueden utilizar algunas otras regiones Fc cuando es deseable eliminar o reducir la función efectora para minimizar los efectos secundarios o las complicaciones terapéuticas.

[0264] En una realización, el anticuepro compite por la unión o por unirse sustancialmente al mismo epítipo que los

anticuerpos de la solicitud. También se contemplan los anticuerpos que tienen características biológicas de los presentes anticuerpos anti-TAHO de la solicitud, específicamente incluyendo el reconocimiento de tumores in vivo y cualquier inhibición de proliferación celular o características citotóxicas.

5 **[0265]** Los métodos para producir los anticuerpos anteriores se describen en detalle aquí.

[0266] Los presentes anticuerpos anti-TAHO son útiles para tratar cáncer que expresa TAHO o aliviar uno o más síntomas del cáncer en un mamífero. Dicho cáncer incluye, pero sin limitación, cánceres hematopoyéticos o cánceres relacionados con la sangre, tales como linfoma, leucemia, mieloma o tumores linfoides, pero también
 10 cánceres del bazo y cánceres de los nódulos linfáticos. Ejemplos más particulares de dichos cánceres asociados a células B incluyen, por ejemplo, linfomas de grado alto, medio y bajo (incluyendo linfomas de células B, tales como, por ejemplo, linfoma de células B de tejido linfoide asociado a la mucosa y linfoma no de Hodgkin, linfoma de células del manto, linfoma de Burkitt, linfoma linfocítico pequeño, linfoma de la zona marginal, linfoma de células grandes difuso, linfoma folicular, y linfoma de Hodgkin y linfomas de células T), y leucemias (incluyendo leucemia secundario, leucemia linfocítica crónica, tal como leucemia de células B (linfocitos B CD5+), leucemia mieloide, tal como
 15 leucemia mieloide agudo, leucemia mieloide crónico, leucemia linfoide, tal como leucemia linfoblástico agudo y mielodisplasia), mieloma múltiple, tal como tumores de células plasmáticas, y otros cánceres hematológicos y/o asociados con células B o células T. Los cánceres comprenden cánceres metastáticos de cualquiera de los anteriores. Las presentes reivindicaciones se refieren al tratamiento del linfoma folicular, el linfoma de células de
 20 manto o el linfoma difuso de células grandes. El anticuerpo es capaz de unirse a por lo menos una parte de las células cancerosas que expresan el polipéptido TAHO en el mamífero. En una realización preferida, el anticuerpo es eficaz para destruir o matar células tumorales que expresan TAHO o para inhibir el crecimiento de dichas células tumorales, in vitro o in vivo, tras la unión al polipéptido TAHO en la célula. Los anticuerpos desnudos que tiene propiedades citotóxicas o de inhibición del crecimiento se pueden aprovechar con un agente citotóxico para hacerlos
 25 incluso más potentes en la destrucción de células tumorales. Las propiedades citotóxicas se pueden conferir a un anticuerpo anti-TAHO mediante, por ejemplo, la conjugación del anticuerpo con un agente citotóxico, para formar un inmunoconjugado tal como se describe aquí. El agente citotóxico o el agente inhibidor del crecimiento es preferiblemente una molécula pequeña. Son preferibles las toxinas tales como caliqueamicina o un maitansinoide y análogos o derivados de los mismos.

30 **[0267]** La composición que comprende un anticuerpo anti-TAHO y un portador son adecuados para el tratamiento. Para los objetivos del tratamiento del cáncer, las composiciones se pueden administrar al paciente con necesidad de dicho tratamiento, donde la composición puede comprender uno o más anticuerpos anti-TAHO presentes como un inmunoconjugado. En una realización adicional, las composiciones pueden comprender estos anticuerpos en
 35 combinación con otros agentes terapéuticos, tales como agentes citotóxicos o inhibidores del crecimiento, incluyendo agentes quimioterapéuticos. También se describen formulaciones que comprenden un anticuerpo anti-TAHO de la solicitud y un portador. En una realización, la formulación es una formulación terapéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable.

40 **[0268]** También se describe ácidos nucleicos aislados que codifican los anticuerpos anti-TAHO. Se comprenden ácidos nucleicos que codifican las cadenas H y L y especialmente los residuos de la región hipervariable, cadenas que codifican el anticuerpo de secuencia nativa, así como variantes, modificaciones y versiones humanizadas del anticuerpo.

45 **[0269]** También se describen métodos útiles para tratar un cáncer que expresa el polipéptido TAHO o que alivia uno o más síntomas del cáncer en un mamífero, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-TAHO, oligopéptido o molécula orgánica al mamífero. Las composiciones terapéuticas de anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica se pueden administrar a corto plazo (agudo) o crónico, o intermitente según indique el médico. Además, se proporcionan métodos de inhibición del crecimiento y citólisis de una célula que
 50 expresa el polipéptido TAHO.

[0270] También se describen kits y artículos de fabricación que comprenden por lo menos un anticuerpo anti-TAHO, oligopéptido o molécula orgánica. Los kits que contienen anticuerpos anti-TAHO, oligopéptidos o moléculas orgánicas son útiles, por ejemplo, para ensayos de citólisis de células TAHO, para la purificación o
 55 inmunoprecipitación de polipéptido TAHO a partir de las células. Por ejemplo, para el aislamiento y purificación de TAHO, el kit puede contener un anticuerpo anti-TAHO, oligopéptido o molécula orgánica acoplados a esferas (por ejemplo, esferas de sefarosa). Los kits se pueden disponer conteniendo anticuerpos, oligopéptidos o moléculas orgánicas para la detección y cuantificación de TAHO in vitro, por ejemplo, en un ELISA o una transferencia Western. Dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica útil para la detección se pueden disponer con un
 60 marcador, tal como un fluorescente o radiomarcador.

L. Artículos de fabricación y kits

65 **[0271]** También se describe un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento del cáncer que expresa anti-TAHO. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en el recipiente o asociado con el mismo. Entre los recipientes adecuados se incluyen, por ejemplo, botellas, viales,

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

[0272] También se proporcionan kits que son útiles para varios objetivos, por ejemplo, para ensayos para matar células que expresan TAHO, para la purificación o inmunoprecipitación de polipéptido TAHO a partir de células. Para el aislamiento y purificación de polipéptido TAHO, el kit puede contener un anticuerpo anti-TAHO, oligopéptido o molécula orgánica acoplada a esferas (por ejemplo, esferas de sefaroza). Los kits se pueden disponer conteniendo los anticuerpos, oligopéptidos o moléculas orgánicas para la detección y cuantificación de polipéptido TAHO in vitro, por ejemplo, en un ELISA o una transferencia Western. Como con el artículo de fabricación, el kit comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto en o asociados con el recipiente. El recipiente contiene una composición que comprende por lo menos un anticuerpo anti-TAHO, oligopéptido o molécula orgánica de la solicitud. Se pueden incluir recipientes adicionales que contienen, por ejemplo, diluyentes, tampones y anticuerpos de control. La etiqueta o prospecto pueden proporcionar una descripción de la composición, así como instrucciones para el uso in vitro pretendido o de uso.

25 M. Usos de polipéptidos TAHO y ácidos nucleicos que codifican polipéptidos TAHO

[0273] Las secuencias de nucleótidos (o sus complementos) que codifican los polipéptidos TAHO tienen diferentes aplicaciones en el campo de biología molecular, incluyendo usos tales como sondas de hibridación, en la localización en cromosomas y genes y en la generación de sondas de ARN y ADN no codificante. El ácido nucleico que codifica TAHO también será útil para la preparación de los polipéptidos TAHO mediante técnicas recombinantes descritas aquí, donde estos polipéptidos TAHO pueden ser útiles, por ejemplo, en la preparación de anticuerpos anti-TAHO tal como se describen aquí.

[0274] Se puede usar el gen de TAHO de secuencia nativa y longitud completa, o partes del mismo, como sondas de hibridación para una biblioteca de ADNc para aislar el ADNc de TAHO de longitud completa o para aislar otros ADNcs (por ejemplo, aquellos que codifican variantes naturales de TAHO o TAHO de otras especies) que tienen una identidad de secuencia deseada con la secuencia de TAHO nativa descrita aquí. Opcionalmente, la longitud de las sondas será de aproximadamente entre 20 y aproximadamente 50 bases. Las sondas de hibridación pueden derivar de regiones por lo menos parcialmente nuevas de la secuencia de nucleótidos nativa de longitud nativa, donde estas regiones pueden determinarse sin una experimentación excesiva o partir de las secuencias genómicas incluyendo promotores, elementos potenciadores e intrones de la secuencia nativa de TAHO. A modo de ejemplo, un método de cribado comprenderá aislar la región codificante del gen de TAHO usando la secuencia de ADN conocida para sintetizar una sonda seleccionada de aproximadamente 40 bases. Se puede marcar las sondas de hibridación con una variedad de marcadores, incluyendo radionucleótidos tales como ^{32}P o ^{35}S o marcadores enzimáticos, tales como fosfatasa alcalina acoplada a la sonda mediante sistemas de acoplamiento avidina/biotina. Las sondas marcadas que tienen una secuencia complementaria a la del gen de TAHO de la presente solicitud se pueden usar para cribar las bibliotecas de ADNc humano, ADN genómico o ANRM para determinar a qué miembros de estas bibliotecas se hibrida la sonda. Las técnicas de hibridación se describen detalladamente en los Ejemplos más abajo. De manera similar se puede emplear como sonda cualquiera de las secuencias EST descritas en la presente solicitud usando los métodos descritos aquí.

[0275] Otros fragmentos útiles de los ácidos nucleicos que codifican TAHO incluyen oligonucleótidos codificantes o no codificantes que comprenden una secuencia de ácido nucleico (o ARN o ADN) de cadena única capaz de unirse a las secuencias diana de ARNm de TAHO (codificante) o de ADN de TAHO (no codificante). Los oligonucleótidos no codificantes o codificantes, según la presente solicitud, comprenden un fragmento de la región codificante del ADN de TAHO. Dicho fragmento generalmente comprende por lo menos aproximadamente 14 nucleótidos, preferiblemente de aproximadamente entre 14 y 30 nucleótidos. La capacidad de derivar un oligonucleótido codificante o no codificante, en base a una secuencia de ADNc que codifica una proteína determinada se describe, por ejemplo, en Stein and Cohen (Cancer Res. 48:2659, 1988) y Van der Krol et al. (Bio Techniques 6:958, 1988).

[0276] La unión de oligonucleótidos codificantes o no codificantes a las secuencias de ácido nucleico diana da lugar a la formación de cadenas dobles que bloquean la transcripción o la traducción de la secuencia diana mediante uno de una serie de medios, incluyendo la mayor degradación de las cadenas dobles, la terminación prematura de la transcripción o la traducción, o mediante otros medios. Dichos métodos se describen en la presente solicitud. Los oligonucleótidos no codificantes se pueden usar por tanto para bloquear la expresión de proteínas TAHO, donde dichas proteínas TAHO pueden jugar un papel en la inducción del cáncer en mamíferos. Los oligonucleótidos

codificantes o no codificantes comprenden además oligonucleótidos que tienen esqueletos de azúcar-fosfodiéster modificados (u otras uniones a azúcares, tales como las descritos en WO 91/06629) y donde dichas uniones a azúcares son resistentes a nucleasas endógenas. Dichos oligonucleótidos con uniones a azúcares resistentes son estables *in vivo* (es decir, capaces de resistir la degradación enzimática), pero retienen la especificidad de secuencia para poder unirse a las secuencias de nucleótidos diana.

[0277] Las zonas intragénicas preferidas para la unión no codificante incluyen la región que incorpora el codón de inicio/comienzo de la traducción (5'-AUG, 5'-ATG) o el codón de terminación/parada (5'-UAA, 5'-UAG y 5'-UAG/5'-TAA, 5'-TAG y 5'-TGA) del marco de lectura abierto (ORF) del gen. Estas regiones se refieren a una parte del ANRm o gen que abarca aproximadamente entre 25 y aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir, 5' o 3') desde un codón de inicio o terminación de la traducción. Otras regiones preferidas para la unión no codificante incluyen: intrones; exones; uniones intrón-exón; el marco de lectura abierto (ORF) o "región codificante", que es la zona entre el codón de inicio de la traducción y el codón de terminación de la traducción; la caperuza ("cap") en 5' de un ANRm que comprende un residuo de guanosina de metilado en N7 unido al residuo 5' del ANRm a través de una unión de trifosfato 5'-5' e incluye la propia estructura de caperuza en 5', así como los primeros 50 nucleótidos adyacentes a la caperuza; la región 5' no traducida (5'UTC); la parte de un ANRm en la dirección 5' desde el codón de inicio de la traducción, y de este modo incluyendo nucleótidos entre el sitio de la caperuza en 5' y el codón de inicio de la traducción de un ANRm o los nucleótidos correspondientes en el gen; y la región 3' no traducida (3'UTR), la parte de un ANRm en la dirección 3' desde el codón de terminación de la traducción, y de este modo incluyendo los nucleótidos entre el codón de terminación de la traducción y el extremo 3' de un ANRm o los nucleótidos correspondientes en el gen.

[0278] Entre los ejemplos específicos de compuestos antisentido preferidos útiles para inhibir la expresión de proteínas TAHO se incluyen oligonucleótidos que contienen esqueletos modificados o uniones entre nucleósidos no naturales. Los oligonucleótidos que presentan esqueletos modificados incluyen aquellos que retienen un átomo de fósforo en el esqueleto y aquellos que no tienen un átomo de fósforo en el esqueleto. Para los objetivos de esta memoria, y tal como se hace referencia a veces en la técnica, los oligonucleótidos modificados que no tienen un átomo de fósforo en su esqueleto entre nucleósidos también pueden considerarse como oligonucleósidos. Entre los esqueletos de oligonucleótidos modificados preferidos se incluyen, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, fosfonatos de metilo y otros alquilo, incluyendo 3'-alquilo fosfonatos, 5'-alquilo fosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos incluyendo 3'-amino fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres, selenofosforatos y borano-fosforatos que tienen uniones normales 3'-5', análogos de estos unidos por 2'-5', y los que tienen una polaridad invertida, donde una o más uniones entre nucleótidos son una unión 3' a 3', 5' a 5' o 2' a 2'. Los oligonucleótidos preferidos que tienen polaridad invertida comprenden una única unión 3' a 3' en la unión entre nucleótidos en 3', es decir un residuo de nucleótido invertido único que puede ser abásico (falta la nucleobase o tiene un grupo hidroxilo en su lugar). También se incluyen varias sales, sales mixtas y formas ácidas libres. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de uniones que contienen fósforo incluyen, pero sin limitación, las patentes de Estados Unidos Nos. 3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5,177,196; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233; 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,306; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361; 5,194,599; 5,565,555; 5,527,899; 5,721,218; 5,672,697 y 5,625,050.

[0279] Los esqueletos de oligonucleótidos preferidos que no incluyen un átomo de fósforo en los mismos presentan esqueletos que están formados por uniones entre nucleósidos con alquilo de cadena corta o cicloalquilo, heteroátomos mezclados y uniones entre nucleósidos con alquilo o cicloalquilo, o una o más uniones entre nucleósidos heteroatómicas o heterocíclicas de cadena corta. Estas incluyen aquellas que tienen uniones morfolino (formadas en parte a partir de la parte de azúcar de un nucleótido); esqueletos de siloxano; esqueletos de sulfuro, sulfóxido y sulfona; esqueletos de formacetilo y tioformacetilo; esqueletos de metilenformacetilo y tioformacetilo; esqueletos de riboacetilo; esqueletos que contienen alqueno; esqueletos de sulfamato; esqueletos de metilenimino y metilenhidrazino; esqueletos de sulfonato y sulfonamida; esqueletos de amida; y otros que tienen partes con componentes N, O, S y CH₂ mezclados. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichos oligonucleótidos incluyen, pero sin limitación, las patentes de Estados Unidos Nos. 5,034,506; 5,166,315; 5,185,444; 5,214,134; 5,216,141; 5,235,033; 5,264,562; 5,264,564; 5,405,938; 5,434,257; 5,466,677; 5,470,967; 5,489,677; 5,541,307; 5,561,225; 5,596,086; 5,602,240; 5,610,289; 5,602,240; 5,608,046; 5,610,289; 5,618,704; 5,623,070; 5,663,312; 5,633,360; 5,677,437; 5,792,608; 5,646,269 y 5,677,439.

[0280] En otros oligonucleótidos no codificantes preferidos, la unión de tanto del azúcar como entre nucleósidos, es decir, el esqueleto, de las unidades de nucleótidos se sustituyen por grupos nuevos. Las unidades de las bases se mantienen para la hibridación con un compuesto de ácidos nucleicos diana apropiado. A uno de dichos compuestos oligoméricos, un oligonucleótido mimético que se ha observado que tiene propiedades de hibridación excelentes, se hace referencia como ácido nucleico de péptido (PNA). En los compuestos PNA, el esqueleto de azúcar de un oligonucleótido se sustituye por un esqueleto que contiene amida, en particular un esqueleto de aminoetilglicina. Las nucleobases se mantienen y están unidas directa o indirectamente a átomos de nitrógeno aza de la parte amida del esqueleto. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de compuestos PNA incluyen, pero sin limitación, las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,539,082; 5,714,331; y 5,719,262. Más sobre los

compuestos PNA se puede encontrar en Nielsen et al, Science, 1991, 254, 1497-1500.

[0281] Los oligonucleótidos no codificantes preferidos incorporan esqueletos de fosforotioato y/o esqueletos de heteroátomos, y en particular, $-\text{CH}_2\text{-NH-O-CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-O-CH}_2-$ [conocido como esqueleto metilen (metilimino) o MMI], $-\text{CHO-N(CH}_3\text{)-CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-N(CH}_3\text{)-CH}_2-$ y $-\text{O-N(CH}_3\text{)-CH}_2\text{-CH}_2-$ [donde el esqueleto de fosfodiéster nativo está representado como $-\text{O-P-O-CH}_2-$] descrito en la Patente de Estados Unidos No. 5,489,677 indicada anteriormente, y los esqueletos de amida de la Patente de Estados Unidos No. 5,602,240 indicada anteriormente. También se prefieren oligonucleótidos no codificantes que tienen estructuras de esqueleto de morfolino de la Patente de Estados Unidos No. 5,034,506 indicada anteriormente.

10

[0282] los oligonucleótidos modificados también pueden contener uno o más grupos azúcar sustituidos. Los oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-alquil, S-alquil, o N-alquil; O-alquenil, S-alquenil, o N-alquenil; O-alquinil, S-alquinil o N-alquinil; o O-alquil-O-alquil, donde el alquil, alquenil y alquinil pueden ser alquilo C_1 a C_{10} o alquenilo y alquinilo C_2 a C_{10} sustituidos o no sustituidos. Particularmente preferidos son $\text{O}[(\text{CH}_2)_n\text{O}]_m\text{CH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ONH}_2$, y $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ON}[(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3]_2$, donde n y m son de 1 a aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos no codificantes preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': alquilo inferior de C_1 a C_{10} , alquilo inferior sustituido, alquenilo, alquinilo, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo u O-aralquilo, SH, SCH_3 , OCN, Cl, Br, CN, CF_3 , OCF_3 , SOCH_3 , SO_2CH_3 , ONO_2 , NO_2 , N_3 , NH_2 , heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, siliil sustituido, un grupo divisor de ARN, un grupo informador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida incluye 2'-metoxietoxi (2'- $\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE) (Martin et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504) es decir, un grupo alcoxialcoxi group. Una modificación adicional incluye 2'-dimetilaminooxietoxi, es decir un grupo $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{ON}(\text{CH}_3)_2$, también conocido como 2'-DMAOE, tal como se describe en los ejemplos siguientes, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'- $\text{O-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-N}(\text{CH}_3)_2$.

15

20

25

[0283] Una modificación preferida adicional incluye Ácidos Nucleicos Cerrados (LNAs) en los que el grupo 2'-hidroxilo se une al átomo de carbono 3' ó 4' del anillo de azúcar formando así un grupo de azúcares bicíclicos. La unión es preferiblemente un grupo metileno ($-\text{CH}_2-$)_n que une el átomo de oxígeno 2' y el átomo de carbono 4', donde n es 1 ó 2. Los LNAs y la preparación de los mismos se describen en WO 98/39352 y WO 99/14226.

30

[0284] Otras modificaciones preferidas incluyen 2'-metoxi (2'- O-CH_3), 2'-aminopropoxi (2'- $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$), 2'-alil (2'- $\text{CH}_2\text{-CH=CH}_2$), 2'-O-alil (2'- $\text{O-CH}_2\text{-CH=CH}_2$) y 2'-fluoro (2'-F). La modificación en 2' puede ser en la posición arábica (arriba) o la posición riba (abajo). Una modificación 2'-arabino preferida es 2'-F. También se pueden realizar modificaciones similares en otras posiciones en el oligonucleótido, particularmente en la posición 3' del azúcar en el nucleótido 3' terminal o en oligonucleótidos unidos 2'-5' y la posición 5' del nucleótido terminal 5'. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcares, tales como grupos ciclobutilo en lugar de azúcares pentofuranosilo. Las patentes representativas de Estados Unidos que enseñan la preparación de dichas estructuras de azúcares modificados incluyen, pero sin limitación, las patentes de Estados Unidos Nos. 4,981,957; 5,118,800; 5,319,080; 5,359,044; 5,393,878; 5,446,137; 5,466,786; 5,514,785; 5,519,134; 5,567,811; 5,576,427; 5,591,722; 5,597,909; 5,610,300; 5,627,053; 5,639,873; 5,646,265; 5,658,873; 5,670,633; 5,792,747; y 5,700,920.

35

40

[0285] Los oligonucleótidos también pueden incluir modificaciones o sustituciones de nucleobases (a menudo referidos en la técnica simplemente como "bases"). Tal como se utiliza aquí, las nucleobases "no modificadas" o "naturales" incluyen las bases purínicas adenina (A) y guanina (G) y las bases pirimidínicas timina (T), citosina (C) y uracil (U). Las nucleobases modificadas incluyen otras nucleobases sintéticas y naturales, tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propil y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracil, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracil y citosina, 5-propinil ($-\text{C}\equiv\text{C-CH}_3$ o $-\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$) uracil y citosine y otros derivados alquinilo de bases pirimidínicas, 6-azo uracil, citosina y timina, 5-uracil (pseudouracil), 4-tiouracil, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquil, 8-hidroxil y otras adeninas y guaninas 8-sustituidas, 5-halo particularmente 5-bromo, 5-trifluorometil y otros uraciles y citosinas 5-sustituidos, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-amino-adenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-desazaguanina y 7-desazaadenina y 3-desazaguanina y 3-desazaadenina. Nucleobases modificadas adicionales incluyen pirimidinas tricíclicas, tales como fenoxazin citidina (1H-pirímido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), fenotiazin citidina (1H-pirímido[5,4-b][1,4]benzotiazin-2(3H)-ona), abrazaderas G, tales como una fenoxazin citidina sustituida (por ejemplo, 9-(2-aminoetoxi)-H-pirímido [5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), carbazol citidina (2H-pirímido[4,5-b]indol-2-ona), piridindol citidina (H-pirido[3',2':4,5]pirrol[2,3-d]pirimidin-2-ona). Las nucleobases modificadas también pueden incluir aquellas en las que la base purínica o pirimidínica se sustituye por otros heterociclos, por ejemplo, 7-desaza-adenina, 7-desazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Más nucleobases incluyen las descritas en la patente de Estados Unidos No. 3,687,808, las descritas en The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990, y las descritas por Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613. Algunas de estas nucleobases son particularmente útiles para incrementar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la solicitud. Entre éstas se incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas, incluyendo 2-

45

50

55

60

65

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

10

[0286] Otra modificación de oligonucleótidos no codificantes que se unen químicamente a uno o más grupos del oligonucleótido o conjugados que aumentan la actividad, la distribución celular o la captación celular del oligonucleótido. Los compuestos de la solicitud pueden incluir grupos conjugados unidos covalentemente a grupos funcionales, tales como grupos hidroxilo primarios o secundarios. Los grupos conjugados de la solicitud incluyen intercaladores, moléculas informadoras, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, poliéteres, grupos que aumentan las propiedades farmacodinámicas de oligómeros y grupos que aumentan las propiedades farmacocinéticas de los oligómeros. Los grupos conjugados típicos incluyen colesterol, lípidos, lípidos catiónicos, fosfolípidos, fosfolípidos catiónicos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, coumarinas y colorantes. Los grupos que aumentan las propiedades farmacodinámicas, en este contexto de la solicitud, incluye grupos que mejoran la captación del oligómero, aumentan la resistencia del oligómero a la degradación y/o fortalecen la hibridación específica de secuencia con ARN. Los grupos que aumentan las propiedades farmacocinéticas, en este contexto de la solicitud, incluyen grupos que mejoran la captación, distribución, metabolismo o excreción de oligómero. Los grupos conjugados incluyen, pero sin limitación, grupos lipídicos, tales como un grupo colesterol (Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553-6556), ácido cólico (Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4, 1053-1060), un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilol (Manoharan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306-309; Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3, 2765-2770), un tiocolesterol (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538), una cadena alifática, por ejemplo, dodecandiol o residuos undecilo (Saison-Behmoaras et al., EMBO J., 1991, 10, 1111-1118; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259, 327-330; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75, 49-54), un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicerol-3-H-fosfonato de trietil-amonio (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783), una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973), o ácido acético adamantano (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654), un grupo palmitil (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237), o un grupo octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol. Los oligonucleótidos de la solicitud también se pueden conjugar a sustancias farmacológica activas, por ejemplo, aspirina, warfarin, fenilbutazona, ibuprofeno, suprofeno, fenbufeno, cetoprofeno, (S)-(+)-pranoprofeno, carprofeno, dansilsarcosina, ácido 2,3,5-triyodobenzoico, ácido flufenámico, ácido folínico, una benzotiadiazida, clorotiazida, una diazepina, indometicina, un barbiturato, una cefalosporina, un fármaco sulfa, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico. Los conjugados oligonucleótido-fármaco y su preparación se describen en la solicitud de Patente de Estados Unidos Ser. No. 09/334,130 (presentada el 15 Junio de 1999) y las patentes de Estados Unidos Nos.: 4,828,979; 4,948,882; 5,218,105; 5,525,465; 5,541,313; 5,545,730; 5,552,538; 5,578,717; 5,580,731; 5,580,731; 5,591,584; 5,109,124; 5,118,802; 5,138,045; 5,414,077; 5,486,603; 5,512,439; 5,578,718; 5,608,046; 4,587,044; 4,605,735; 4,667,025; 4,762,779; 4,789,737; 4,824,941; 4,835,263; 4,876,335; 4,904,582; 4,958,013; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,243,022; 5,254,469; 3,258,506; 5,262,536; 5,272,250; 3,292,873; 5,317,098; 3,371,241; 5,391,723; 5,416,203; 5,451,463; 5,510,475; 5,512,667; 5,514,785; 5,565,552; 5,567,810; 5,574,142; 5,585,481; 5,587,371; 5,595,726; 5,597,696; 5,599,923; 5,599,928 y 5,688,941, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia.

[0287] No es necesario que todas las posiciones de un compuesto determinado se modifiquen uniformemente, y de hecho, se pueden incorporar más de una de las modificaciones mencionadas anteriormente en un único compuesto o incluso en un único nucleósido en un oligonucleótido. La presente solicitud también describe compuestos no codificantes que con compuestos quiméricos. Los compuestos no codificantes "quiméricos" o "quimeras", en el contexto de esta solicitud, son compuestos no codificantes, particularmente oligonucleótidos, que contiene dos o más regiones químicamente distintas, cada una formada por por lo menos una unidad monomérica, es decir, un nucleótidos en el caso de un compuesto oligonucleótido. Estos oligonucleótidos contienen habitualmente por lo menos una región en la que se modifica el oligonucleótido para conferir al oligonucleótido una mayor resistencia a la degradación por nucleasa, una mayor captación celular y/o una mayor afinidad de unión por el ácido nucleico diana. Una región adicional del oligonucleótido puede servir como sustrato para enzimas capaces de dividir los híbridos ARN:ADN o ARN:ARN. A modo de ejemplo, la ARNasa H es una endonucleasa celular que divide la cadena de ARN de la cadena doble ARN:ADN. La activación de ARNasa H, por tanto, da lugar a la división del ARN diana, aumentando ampliamente así la eficacia de la inhibición de oligonucleótidos de la expresión génica. Consecuentemente, se pueden obtener a menudo resultados comparables con oligonucleótidos más cortos cuando se utilizan oligonucleótidos quiméricos, en comparación con desoxioligonucleótidos fosforotioato que se hibridan a la misma región diana. Los compuestos no codificantes quiméricos se pueden formar como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, miméticos de oligonucleósidos y/o oligonucleótidos tal como se han descrito anteriormente. Los oligonucleótidos no codificantes quiméricos preferidos incorporan por lo

menos una azúcar modificado en 2' (preferiblemente 2'-O-(CH₂)₂-O-CH₃) en el extremo 3' terminal para conferir resistencia a la nucleasa y una región con por lo menos 4 azúcares 2'-H contiguas para conferir la actividad de ARNasa H. Dichos compuestos también se refieren en la técnica como híbridos o espaciómeros ("gapmers"). Los "gapmers" preferidos tienen una región de azúcares modificados en 2' (2'-O-(CH₂)₂-O-CH₃) en el extremo 3' terminal y el extremo 5' terminal separados por por lo menos una región que tiene por lo menos 4 azúcares 2'-H contiguos y preferiblemente incorporan uniones de la estructura de fosforotioato. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichas estructuras híbridas incluyen, pero sin limitación, las patentes de Estados Unidos Nos. 5,013,830; 5,149,797; 5,220,007; 5,256,775; 5,366,978; 5,403,711; 5,491,133; 5,565,350; 5,623,065; S, 652,355; 5,652,356; y 5,700,922.

10

[0288] Los compuestos no codificantes se pueden fabricar convenientemente y rutinariamente a través de la técnica conocida de la síntesis de fase sólida. El equipo para dicha síntesis es comercializado por varios vendedores incluyendo, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, Calif.). Se puede utilizar, adicional o alternativamente, cualquier otro medio para dicha síntesis conocida en la técnica. Se conoce que se utilizan técnicas similares para preparar oligonucleótidos, tales como los fosforotioatos y derivados alquilados. Los compuestos también se pueden mezclar, encapsular, conjugar o en cualquier caso asociarse con otras moléculas, estructurales moleculares o mezclas de compuestos, tales como, por ejemplo, liposomas, moléculas dirigidas a receptor, formulaciones orales, rectales, tópicas u otras, para ayudar a la captación, distribución, y/o absorción. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichas formulaciones auxiliares de captación, distribución y/o absorción incluyen, pero sin limitación, las Patentes de Estados Unidos Nos. 5,108,921; 5,354,844; 5,416,016; 5,459,127; 5,321,291; 5,543,158; 5,547,932; 5,583,020; 5,591,721; 4,426,330; 4,534,899; 5,013,556; 5,108,921; 5,213,804; 5,227,170; 5,264,221; 5,356,633; 5,395,619; 5,416,016; 5,417,978; 5,462,854; 5,469,854; S, S 12,295; 5,527,528; 5,534,259; 5,543,152; 5,556,948; 5,580,575; y 5,595,756.

[0289] Otros ejemplos de oligonucleótidos codificante o no codificantes incluyen aquellos oligonucleótidos que están unidos covalentemente a grupos orgánicos, tales como los descritos en WO 90/10048, y otros grupos que aumentan la afinidad del oligonucleótido por una secuencia de ácido nucleico diana, tal como poli-(L-lisina). Además, agentes intercalantes, tales como elipticina, y agentes alquilantes o complejos metálicos, se pueden unir a oligonucleótidos codificantes o no codificantes para modificar las especificidades de unión del oligonucleótido codificante o no codificante por la secuencia de nucleótidos diana.

[0290] Los oligonucleótidos no codificantes o codificante se pueden introducir en una célula que contiene la secuencia de ácidos nucleicos diana mediante cualquier método de transferencia génica, incluyendo, por ejemplo, la electroporación de transfección de ADN mediada por CaPO₄, o mediante la utilización de vectores de transferencia génica, tales como el virus Epstein-Barr. En un procedimiento preferido, se inserta un oligonucleótido no codificante o codificante en un vector retroviral adecuado. Se pone en contacto una célula que contiene la secuencia de ácidos nucleicos diana con el vector retroviral recombinante, in vivo o ex vivo. Entre los vectores retrovirales adecuados se incluyen, pero sin limitación, los derivados de los retrovirus murinos M-MuLV, N2 (un retrovirus derivado de M-MuLV), o los vectores de la doble copia designados como DCT5A, DCT5B y DCT5C (véase WO 90/13641).

40

[0291] Los oligonucleótidos codificante o no codificantes también se pueden introducir en una célula que contiene la secuencia de nucleótidos diana mediante la formación de un conjugado con una molécula de unión a ligando, tal como se describe en WO 91/04753. Las moléculas de unión a ligando adecuadas incluyen, pero sin limitación, receptores de la superficie celular, factores de crecimiento, otras citoquinas u otros ligandos que se unen a receptores de la superficie celular. Preferiblemente, la conjugación de la molécula de unión a ligando no interfiere sustancialmente con la capacidad de la molécula de unión a ligando de unirse a su molécula o receptor correspondiente, o de bloquear la entrada del oligonucleótido codificante o no codificante o su conjugado en la célula.

[0292] Alternativamente, un oligonucleótido codificante o no codificante se puede introducir en una célula que contiene la secuencia de ácido nucleico diana mediante la formación de un complejo oligonucleótido-lípido, tal como se describe en WO 90/10448. El complejo de oligonucleótido codificante o no codificante-lípido se disocia preferiblemente en la célula mediante una lipasa endógena.

[0293] Las moléculas ARN o ADN no codificante o codificantes tienen generalmente por lo menos aproximadamente 5 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, ó 1000 nucleótidos de longitud, donde en este contexto el término "aproximadamente" significa la longitud de la secuencia de nucleótidos de referencia más o menos 10% de esa longitud de referencia.

60

[0294] Las sondas se pueden emplear en técnicas de PCR para generar un grupo de secuencias para identificar

secuencias codificantes de TAHO estrechamente relacionadas.

[0295] Las secuencias de nucleótidos que codifican TAHO se pueden usar además para construir sondas de hibridación para la localización del gen que codifica este polipéptido TAHO y para el análisis genético de individuos con alteraciones genéticas. Las secuencias de nucleótidos proporcionadas en la presente invención se pueden usar para la localización de un cromosoma y regiones específicas del cromosoma usando técnicas conocidas como la hibridación *in situ*, análisis de unión frente marcadores cromosómicos conocidos y cribado de genotecas por hibridación.

[0296] Cuando las secuencias codificantes para TAHO codifican una proteína que se une a otra proteína (ejemplo, cuando el TAHO es un receptor), los TAHO se pueden usar en análisis para identificar las otras proteínas o moléculas implicadas en la interacción de unión. Mediante dichos métodos, se pueden identificar los inhibidores de la interacción de unión receptor/ligando. Las proteínas implicadas en dichas interacciones de unión se pueden usar además para cribar péptidos o pequeñas moléculas inhibitoras o agonistas de la interacción de unión. Además, el receptor TAHO se puede utilizar para aislar el ligando o ligandos correlativos. Se pueden diseñar ensayos de cribado para encontrar compuestos guía que mimeticen la actividad biológica del polipéptido TAHO nativo o un receptor para TAHO. Dichos ensayos de cribado incluirán ensayos susceptibles para un cribado de alto rendimiento de bibliotecas químicas, haciéndolas particularmente adecuadas para identificar candidatos farmacológicos de molécula pequeña. Las moléculas pequeñas contempladas incluyen compuestos orgánicos o inorgánicos sintéticos. Los ensayos se pueden realizar en varios formatos, incluyendo los ensayos de unión proteína-proteína, ensayos de cribado bioquímico, inmunoensayos y ensayos celulares, caracterizados en la técnica.

[0297] Los ácidos nucleicos que codifican un polipéptido TAHO o sus formas modificadas se pueden usar además para generar animales transgénicos o animales "knock out" (sin un determinado gen) que a su vez, son útiles en el desarrollo y cribado de reactivos terapéuticamente útiles. Un animal transgénico (por ejemplo, un ratón o una rata) es un animal que tiene células que contienen un transgén, el cual fue introducido en el animal o un ancestro del animal en una etapa prenatal, por ejemplo, en una etapa embrionaria. Un transgén es un ADN que se integra en el genoma de una célula a partir del cual se desarrolla un animal. En una realización, el ADNc que codifica un polipéptido TAHO se puede utilizar para clonar ADN genómico que codifique el polipéptido TAHO según las técnicas establecidas y las secuencias genómicas usadas para generar los animales transgénicos que contienen las células que expresan el ADN que codifica el polipéptido TAHO. Los procedimientos para generar animales transgénicos, particularmente animales como ratones o ratas, se han convertido en convencionales en la técnica y se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 4.736.866 y 4.870.009. Habitualmente, las células particulares serán las dianas para la incorporación de un transgén del polipéptido TAHO con potenciadores específicos de tejido. Los animales transgénicos que incluyen una copia de un transgén que codifica un polipéptido TAHO introducido en la línea germinal del animal en una etapa embrionaria se pueden usar para examinar el efecto de la expresión aumentada del ADN que codifica el polipéptido TAHO. Dichos animales se pueden usar como animales de prueba para reactivos que se cree que confieren protección frente, por ejemplo, a estados patológicos asociados con su sobreexpresión. Se trata un animal con el reactivo y una incidencia reducida del estado patológico en comparación con los animales sin tratar que lleven el transgén, indicaría una intervención terapéutica potencial para el estado patológico.

[0298] Alternativamente, se pueden usar homólogos no humanos de los polipéptidos TAHO para construir un animal "knock out" para el polipéptido TAHO que tiene un gen defectuoso o alterado que codifica el polipéptido TAHO como resultado de una recombinación homóloga entre el gen endógeno que codifica el polipéptido TAHO y un ADN genómico alterado que codifica el polipéptido TAHO introducido en una célula madre embrionaria del animal. Por ejemplo, se puede utilizar ADNc que codifica un polipéptido TAHO para clonar ADN genómico que codifica el polipéptido TAHO según las técnicas establecidas. Se puede eliminar o reemplazar una porción del ADN genómico que codifica un polipéptido TAHO por otro gen, tal como un gen que codifica un marcador de selección que se usa para controlar la integración. Habitualmente, se incluyen en el vector varias kilobases de ADN flanqueante no alterado (tanto en el extremo 5' como en el 3') [ver, por ejemplo, Thomas y Capecchi, *Cell*, 51: 503 (1987) para una descripción de vectores de recombinación homóloga]. El vector se introduce en una línea celular madre embrionaria (por ejemplo por electroporación) y se seleccionan las células en las que el ADN introducido se ha recombinado homológamente con el ADN endógeno [ver por ejemplo, Li y col., *Cell*, 69: 915 (1992)]. Las células seleccionadas se inyectan entonces en un blastocito de un animal (por ejemplo, ratón o rata) para formar quimeras de agregación [ver por ejemplo, Bradley, en *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, (Teratocarcinomas y células troncales embrionarias: Un enfoque práctico), E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), págs 113-125]. Un embrión quimérico se puede después implantar en un animal de cría hembra pseudopreñada adecuada y el embrión nace para crear un animal "knock out". La progenie que porta el ADN recombinado homológamente en sus células germinales se puede identificar mediante técnicas habituales y se puede usar para criar animales en los que todas las células del animal contengan el ADN recombinado homológamente. Los animales "knock out" se pueden caracterizar por ejemplo, por su capacidad de defenderse frente ciertos estados patológicos y por su desarrollo de estados patológicos debido a la ausencia del polipéptido TAHO.

[0299] EL ácido nucleico que codifica los polipéptidos TAHO también se pueden utilizar en terapia génica. En las aplicaciones de terapia génica, se introducen los genes en células con el fin de conseguir la síntesis *in vivo* de un producto genético terapéuticamente eficaz, por ejemplo, para la sustitución de un gen defectuoso. "Terapia génica" incluye tanto la terapia génica convencionales en la que se consigue un efecto duradero mediante un único

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

- 10 **[0300]** Existen una serie de técnicas disponibles para introducir ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas varían dependiendo de si el ácido nucleico se transfiere en células cultivadas *in vitro*, o *in vivo* en las células del huésped pretendido. Las técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico en células de mamíferos *in vitro* incluyen el uso de liposomas, electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano, el método de precipitación con fosfato de calcio, etc. Entre las técnicas actuales de transferencia de genes *in vivo* preferidas se incluyen la transfección con vectores virales (habitualmente retrovirales) y transfección mediada por liposomas recubiertos de proteína viral (Dzau et al., Trends in Biotechnology 11, 205-210 [1993]). En algunas situaciones, es deseable proporcionar la fuente de ácido nucleico con un agente que reconoce las células diana, tales como un anticuerpo específico para una proteína de membrana de la superficie celular o la célula diana, un ligando para un receptor en la célula diana, etc. Cuando se utilizan liposomas, se pueden utilizar proteínas que se unen a una proteína de membrana de la superficie celular asociada con endocitosis para el reconocimiento y/o facilitar la captación de, por ejemplo, proteínas cápside o fragmentos de las mismas trópicas para un tipo de célula concreta, anticuerpos para proteínas que experimentan la internalización en el ciclo, y proteínas que dirigen la localización intracelular y aumentan la vida media intracelular. La técnica de endocitosis mediada por receptor es descrita, por ejemplo, por Wu et al., J. Biol. Chem. 262: 4429-4432 (1987); y Wagner et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 3410-3414 (1990). Para una revisión de los protocolos de marcaje génico y terapia génica, véase Anderson et al., Science 256: 808-813 (1992).

- [0301]** Las moléculas de ácido nucleico que codifican los polipéptidos TAHO o fragmentos de los mismos descritos en la presente invención son útiles para la identificación de cromosomas. En este aspecto, existe una necesidad actual para identificar nuevos marcadores cromosómicos, ya que, en base a los datos de secuencias reales, existen actualmente relativamente pocos reactivos marcadores cromosómicos. Cada molécula de ácido nucleico de TAHO de la presente invención se puede utilizar como marcador cromosómico.

- [0302]** Los polipéptidos TAHO y las moléculas de ácido nucleico de la presente solicitud también se pueden utilizar para el diagnóstico de la tipificación del tejido, donde los polipéptidos TAHO de la presente solicitud se pueden expresar diferencialmente en un tejido en comparación con otro, preferiblemente en un tejido enfermo en comparación con tejido normal del mismo tipo de tejido. Las moléculas de ácido nucleico de TAHO serán útiles para generar sondas para PCR, análisis Northern, análisis Southern y análisis Western.

- [0303]** Esta solicitud describe métodos de cribado de compuestos para identificar aquellos compuestos que mimetizan el polipéptido TAHO (agonistas) o prevenir el efecto del polipéptido TAHO (antagonistas). Los ensayos de cribado de fármacos candidatos antagonistas están diseñados para identificar compuestos que se unen o forman complejos con los polipéptidos TAHO codificados por los genes identificados aquí, o de otro modo interfieren con la interacción de los polipéptidos codificados con otras proteínas celulares, incluyendo, por ejemplo, la inhibición de la expresión de polipéptido TAHO a partir de células. Dichos ensayos de cribado incluirán ensayos susceptibles de cribado de alto rendimiento de bibliotecas químicas, haciéndolos particularmente adecuados para la identificación de pequeñas moléculas como fármacos candidatos.

- [0304]** Los ensayos pueden realizarse en una variedad de formatos, incluyendo ensayos de unión de proteína-proteína, ensayos de cribado bioquímicos, inmunoensayos y ensayos basados en células, que están bien caracterizados en la técnica.

- [0305]** Todos los ensayos tienen en común que requieren el contacto del fármaco candidato con un polipéptido TAHO codificado por un ácido nucleico aquí identificado en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que estos dos componentes interactúen.

- [0306]** En ensayos de unión, la interacción es la unión y el complejo formado puede aislarse o detectarse en la mezcla de reacción. En una realización particular, el polipéptido TAHO codificado por el gen identificado aquí o el fármaco candidato se inmovilizan sobre una fase sólida, por ejemplo, en una placa de microtitulación, mediante uniones covalentes o no covalentes. La unión no covalente generalmente se realiza mediante el recubrimiento de la superficie sólida con una solución del polipéptido TAHO y dejándolo secar. Alternativamente, puede utilizarse un anticuerpo inmovilizado, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, específico para el polipéptido TAHO a ser inmovilizado para fijarlo a una superficie sólida. El ensayo se realiza añadiendo el componente no inmovilizado, que puede estar marcado con un marcador detectable, al componente inmovilizado, por ejemplo, la superficie recubierta que contiene el componente fijado. Cuando la reacción se ha completado, se eliminan los componentes que no han reaccionado, por ejemplo, mediante lavado, y se detectan los complejos fijados en la superficie sólida. Cuando el

componente originalmente no inmovilizado transporta un marcador detectable, la detección del marcador inmovilizado en la superficie indica que el complejo se ha formado. Cuando el componente originalmente no inmovilizado no transporta un marcador, se puede detectar la formación del complejo, por ejemplo, usando un anticuerpo marcado que se une específicamente al complejo inmovilizado.

5

[0307] Si el compuesto candidato interacciona pero no se une a un polipéptido TAHO particular codificado por un gen identificado aquí, su interacción con este polipéptido puede ser analizada mediante procedimientos bien conocidos para detectar interacciones proteína-proteína. Dichos ensayos incluyen estrategias tradicionales, tales como el entrecruzamiento, la coimmunoprecipitación, y la copurificación a través de gradientes o en columnas cromatográficas. Además, las interacciones proteína-proteína pueden controlarse utilizando un sistema genético basado en levaduras descrito por Fields y colaboradores [Fields and Song, *Nature*, 340:245-246 (1989); Chien et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:9578-9582 (1991)] como se describe en Chevray y Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5789-5793 (1991)]. Muchos activadores transcripcionales, tales como GAL4 de levadura, consisten en dos dominios modulares físicamente discretos, uno que actúa como el dominio de unión a ADN, mientras que el otro funciona como el dominio de activación de la transcripción. El sistema de expresión en levaduras descrito en las publicaciones antes mencionadas (generalmente denominados como "sistema del doble híbrido") aprovecha esta propiedad, y utiliza dos proteínas híbridas, una en la que la proteína diana se fusiona al dominio de unión a ADN de GAL4, y otra en la que las proteínas activadoras candidatas se fusionan al dominio de activación. La expresión de un gen informador GAL1//lacZ bajo el control de un promotor activado por GAL4, depende de la reconstitución de la actividad GAL4 a través de la interacción proteína-proteína. Las colonias que contienen polipéptidos que interaccionan se detectan con un sustrato cromogénico para la β -galactosidasa. Existe un kit completo (MATCHMAKER™) disponible comercialmente por Clontech para la identificación de interacciones proteína-proteína entre dos proteínas específicas usando la técnica del doble híbrido. Este sistema también puede extenderse para localizar dominios proteicos implicados en interacciones proteicas específicas, así como para señalar los residuos de aminoácidos que son cruciales para estas interacciones.

[0308] Los compuestos que interfieren con la interacción de un gen que codifica un polipéptido TAHO identificado aquí y otros componentes intra o extracelulares pueden ser analizados tal como se indica a continuación: habitualmente se prepara una mezcla de reacción que contiene el producto del gen y el componente intra o extracelular en condiciones y durante un tiempo para permitir la interacción y la unión de los dos productos. Para analizar la capacidad de un compuesto candidato para inhibir la unión, la reacción se realiza en ausencia y en presencia del compuesto a analizar. Además, puede añadirse un placebo a una tercera mezcla de reacción para utilizarse como control positivo. La unión (formación del complejo) entre el compuesto a analizar y el componente intra o extracelular presente en la mezcla se controla tal como se describió anteriormente. La formación de un complejo en la reacción o reacciones de control, pero no en la mezcla de reacción, que contiene el compuesto a analizar indica que el compuesto a analizar interfiere con la interacción del compuesto a analizar y su pareja de reacción.

[0309] Para analizar antagonistas, el polipéptido TAHO puede añadirse a una célula junto con el compuesto a cribar por una actividad particular y la capacidad del compuesto para inhibir la actividad de interés en presencia del polipéptido TAHO indica que el compuesto es un antagonista del polipéptido PRO. Alternativamente, se pueden detectar antagonistas mediante la combinación del polipéptido TAHO y un potencial antagonista con receptores del polipéptido TAHO unidos a membrana o receptores recombinantes bajo condiciones adecuadas para un ensayo de inhibición competitiva. El polipéptido TAHO puede marcarse, mediante, por ejemplo, radioactividad, de manera que el número de moléculas del polipéptido TAHO unidas al receptor pueden usarse para determinar la eficacia del potencial antagonista. El gen que codifica el receptor puede identificarse mediante numerosos procedimientos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, "panning" de ligandos y separación por FACS. Coligan et al., *Current Protocols in Immun.*, 1(2): capítulo 5(1991). Preferiblemente, se emplea la clonación de expresión donde se prepara ARN poliadenilado a partir de una célula sensible al polipéptido TAHO y una biblioteca de ADNc creada a partir de este ARN se divide en grupos y se usa para transfectar células COS u otras células que no son sensibles al polipéptido PRO. Las células transfectadas que crecen en portaobjetos de cristal se exponen al polipéptido TAHO marcado. El polipéptido TAHO puede marcarse mediante distintos medios incluyendo la yodación o la inclusión de un sitio de reconocimiento para una proteína quinasa específica para un sitio. Tras la fijación e incubación, los portaobjetos se someten a un análisis autorradiográfico. Los grupos positivos se identifican y se preparan subgrupos y se retransfectan usando un proceso interactivo de subagrupamiento y recribado, que finalmente producen un único clon que codifica el receptor putativo.

[0310] Como estrategia alternativa para la identificación de un receptor, el polipéptido TAHO marcado puede unirse por fotoafinidad con preparaciones de membrana o extractos celulares que expresan la molécula receptora. El material entrecruzado se resuelve por PAGE y se expone a una película de rayos X. El complejo marcado que contiene el receptor puede cortarse, separarse en pequeños fragmentos y someterse a microsecuenciación de proteínas. La secuencia de aminoácidos obtenida por microsecuenciación se utilizaría para diseñar un conjunto de sondas de oligonucleótidos degenerados para cribar una biblioteca de ADNc para identificar el gen que codifica el posible receptor.

65

[0311] En otro ensayo para antagonistas, se incubarían células de mamífero o una preparación de membrana que

expresan el receptor con el polipéptido TAHO marcado en presencia del compuesto candidato. A continuación, se podría medir la capacidad del compuesto de aumentar o bloquear esta interacción.

[0312] Ejemplos más específicos de potenciales antagonistas incluyen un oligonucleótido que se une a las fusiones de inmunoglobulina con el polipéptido TAHO y, en particular, anticuerpos que incluyen, sin limitación, anticuerpos policlonales y monoclonales y fragmentos de anticuerpos, anticuerpos de cadena única, anticuerpos antiidiotípicos, y versiones quiméricas o humanizadas de dichos anticuerpos o fragmentos, así como anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos. Alternativamente, un potencial antagonista puede ser una proteína estrechamente relacionada, por ejemplo, una forma mutada del polipéptido TAHO que reconozca el receptor, pero que no ejerza ningún efecto, inhibiendo así competitivamente la acción del polipéptido TAHO.

[0313] Otro antagonista potencial del polipéptido TAHO es una construcción de ARN o ADN no codificante preparada usando la tecnología no codificante, donde, por ejemplo, una molécula de ADN o ARN no codificante actúa bloqueando directamente la traducción de ARNm mediante la hibridación con el ARNm diana y evitando la transcripción y la producción del polipéptido TAHO. La tecnología no codificante puede usarse para controlar la expresión génica a través de la formación de una triple hélice o del ADN o ARN no codificante, ambos procedimientos basados en la unión de un polinucleótido al ADN o al ARN. Por ejemplo, la región codificante 5' de la secuencia de polinucleótidos, que codifica el polipéptido TAHO maduro de la presente invención se usa para diseñar un oligonucleótido de ARN no codificante de aproximadamente 10 a 40 pares de bases de longitud. Se diseña un oligonucleótido de ADN que sea complementario a una región del gen implicado en la transcripción (triple hélice- véase, Lee et al., Nucl. Acids Res., 6: 3073 (1979); Cooney et al., Science, 241:456 (1988); Dervan et al., Science, 251:1360 (1991)], evitando así la transcripción y la producción del polipéptido TAHO. El oligonucleótido de ARN no codificante se hibrida con el ARNm *in vivo* y bloquea la traducción de la molécula de ARNm en el polipéptido TAHO (no codificante-Okano, Neurochem., 56:560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expresión (CRC Press: Boca Raton, FL, 1988). Los oligonucleótidos descritos anteriormente pueden también liberarse a células, de manera que el ARN o ADN no codificante puede ser expresado *in vivo* para inhibir la producción del polipéptido TAHO. Cuando se usa un ADN no codificante, se prefieren oligodesoxirribonucleótidos derivados del la región de inicio de la traducción, por ejemplo, entre las posiciones de aproximadamente -10 a +10 de la secuencia de nucleótidos del gen diana.

[0314] Los antagonistas potenciales incluyen moléculas pequeñas que se unen al sitio activo, el sitio de unión del receptor, o el factor de crecimiento u otro sitio de unión relevante del polipéptido TAHO, bloqueando de este modo la actividad biológica normal del polipéptido TAHO. Entre los ejemplos de moléculas pequeñas se incluyen, pero sin limitación, péptidos o moléculas de tipo péptido pequeñas, preferiblemente péptidos solubles, y compuestos orgánicos o inorgánicos no peptídicos sintéticos.

[0315] Los ribozimas son moléculas de ARN enzimático capaces de catalizar la escisión específica del ARN. Las ribozimas actúan mediante hibridación específica de secuencia con el ARN diana complementario, seguido de escisión endonucleolítica. Los sitios de escisión específicos de ribozimas en un ARN diana potencial se pueden identificar mediante técnicas conocidas. Para más detalles, véase, por ejemplo, Rossi, Current Biology, 4: 469-471 (1994), y la publicación PCT No. WO 97/33551 (publicada el 18 de septiembre 1997).

[0316] Las moléculas de ácido nucleico en formación de triple hélice utilizadas para inhibir la transcripción deberían ser de cadena sencilla y compuestas de desoxinucleótidos. La composición de bases de estos oligonucleótidos se diseña de manera que provoca la formación de una triple hélice a través de las reglas de emparejamiento de bases de Hoogsteen, lo cual requiere generalmente tramos ajustables de purinas o pirimidinas en una cadena de una cadena doble. Para más detalles, véase, por ejemplo, la publicación PCT No. WO 97/33551, *supra*.

[0317] estas moléculas pequeñas se pueden identificar mediante uno o más de los ensayos de cribado descritos anteriormente y/o mediante cualquiera otra técnica de cribado conocida para los expertos en la materia.

[0318] El ácido nucleico codifica el polipéptido TAHO se puede utilizar aquí para la producción recombinante de polipéptido TAHO utilizando técnicas conocidas en el sector y tal como se describen aquí. A su vez, los polipéptidos TAHO producidos se pueden utilizar para generar anticuerpos anti-TAHO utilizando técnicas conocidas en el sector y tal como se describen aquí

[0319] Los anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido TAHO identificados aquí, así como otras moléculas identificadas mediante los ensayos de cribado descritos anteriormente aquí, se pueden administrar para el tratamiento de varios trastornos, incluyendo cáncer, en forma de composiciones farmacéuticas.

[0320] Si el polipéptido TAHO es intracelular y los anticuerpos completos se utilizan como inhibidores, se prefieren anticuerpos internalizantes. Sin embargo, también se pueden utilizar lipofecciones o liposomas para liberar el anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo, en las células. Cuando se utilizan fragmentos de anticuerpos, se prefiere el fragmento inhibidor más pequeño se une específicamente al dominio de unión de la proteína diana. Por ejemplo, en base a las secuencias de la región variable de un anticuerpo, se pueden diseñar moléculas peptídicas que retienen la capacidad de unirse a la secuencia de la proteína diana. Dichos péptidos se pueden sintetizar químicamente y/o producirse mediante tecnología de ADN recombinante. Véase, por ejemplo, Marasco et al., Proc,

Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993).

- [0321]** La formulación de la presente invención también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular a tratar, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no afectan de manera adversa entre sí. Alternativamente, o adicionalmente, la composición puede comprender un agente que potencia su función, tal como, por ejemplo, un agente citotóxico, citoquina, agente quimioterapéutico, o agente inhibidor del crecimiento. Dichas moléculas se presentan de manera adecuada en combinación en cantidades que son eficaces para el objetivo determinado.
- 10 **[0322]** Los siguientes ejemplos se ofrecen con sólo objetivos ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera.

EJEMPLOS Y EJEMPLOS COMPARATIVOS

- 15 **[0323]** Se utilizaron reactivos disponibles comercialmente en los ejemplos según las instrucciones del fabricante a menos que se indique lo contrario. Los anticuerpos utilizados en los ejemplos son anticuerpos disponibles comercialmente e incluyen, pero sin limitación, anti-CD180 (eBioscience MRH73-11, BD Pharmingen G28-8) y Serotec MHR73), anti-CD20 (Ansell 2H7 y BD Pharmingen 2H7), anti-CD72 (BD Pharmingen J4-117), anti-CXCR5 (R&D Systems 51505), anti-CD22 (Ansell RFB4, DAKO To15, Diatec 157, Sigma HIB-22 y Monosan BL-BC34), anti-CD22 (Leinco RFB-4 y NeoMarkers 22C04), anti-CD21 (ATCC HB-135 y ATCC HB5), anti-HLA-DOB (BD Pharmingen DOB.L1), anti-CD79a (Caltag ZL7-4 y Serotec ZL7-4), anti-CD79b (BiomedaSN8 y BD Pharmingen CB-3), anti-CD19 (Biomeda CB-19), anti-FCER2 (Ansell BU38 y Serotec D3.6 y BD Pharmingen M-L233). El origen de estas células identificadas en los siguientes ejemplos, y a lo largo de la memoria, por los números de acceso ATCC es la American Type Culture Collection, Manassas, VA.

EJEMPLO 1: Análisis de datos por microarray de la expresión de TAHO

- [0324]** Los datos de microarray implican el análisis de la expresión de TAHO por la acción del análisis de microarray de ADN en una amplia variedad de muestras de ARN de tejidos y células cultivados. Las muestras incluyen tejido humano normal y canceroso y varios tipos de células inmunes purificadas ambas en reposo y posterior a la estimulación externa. Estas muestras de ARN se pueden analizar según los protocolos de microarray regular en microarrays Agilent.

- [0325]** En este experimento, se aisló ARN de células y se generaron sondas de ARNc marcadas con cianina-3 y cianina-5 mediante transcripción in vitro utilizando el kit de amplificación lineal fluorescente de ARN de input bajo Agilent (Agilent). Se utilizó cianina-5 para marcar las muestras a analizar para la expresión del polipéptido PRO, por ejemplo, el mieloma y las células plasmáticas, y se utilizó cianina-3 para marcar la referencia universal (el grupo de líneas celulares de Stratagene) con la que se comparó la expresión de las muestras de prueba. Se hibridaron 0,1 µg-0,2 mg la sonda de ARNc marcada con cianina-3 y cianina-5 con chips de grupos de oligonucleótidos de 60 unidades Agilent utilizando el Kit de Hibridación in situ plus (Agilent). Estas sondas se hibridaron a microarrays. Para el análisis del mieloma múltiple, las sondas se hibridaron a microarrays de oligonucleótidos de Genoma Humano Completo Agilent utilizando las condiciones y tampones estándar (Agilent) recomendadas por Agilent

- [0326]** Las sondas de ARNc se hibridaron a los microarrays a 60°C durante 17 horas en un centrifugador para hibridación fijado a 4 RPM. Después del lavado, se rastrearon con el escáner de microarrays Agilent que era capaz de excitar y detectar la fluorescencia de las moléculas fluorescentes de cianina-3 y cianina-5 (líneas láser a 532 y 633 nm). Los datos para cada gen en el grupo de oligonucleótidos de 60 unidades se extrajeron de la imagen del microarray rastreado utilizando el software de extracción de características de Agilent que representa el reconocimiento de características, la sustracción del fondo y la normalización y los datos resultantes se cargaron en el paquete de software conocido como Rosetta Resolver Gene Expression Data Analysis System (Rosetta Inpharmatics, Inc.). Rosetta Resolver incluye una base de datos de relación y numerosas herramientas analíticas para guardar, extraer y analizar grandes cantidades de datos de intensidad o proporción de expresión de genes.

- [0327]** En este ejemplo, se obtuvieron células B y células T (control) para el análisis por microarray. Para el aislamiento de células B intactas y células B de memoria y célula plasmáticas, se separaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de cualquiera de los paquetes leucocitarios proporcionados por cuatro donantes masculinos sanos o de toda la sangre de varios donantes normales. Se aislaron células plasmáticas CD138+ de PBMC utilizando el sistema de separación magnética de células MACS (Miltenyi Biotec) y esferas anti-CD138. Alternativamente, se seleccionaron las células B CD19+ totales con esferas anti-CD19 y separación MACS. Después del enriquecimiento de CD19+ (pureza del alrededor del 90%), se realizó una separación FACS (Moflo) para separar células b intactas y células B de memoria. Las células separadas se recogieron sometiendo las muestras a centrifugación. Las células separadas se lisaron inmediatamente en tampón LTR y se homogeneizaron con una columna de centrifugación QIAshredder (Qiagen), seguido por mini kit RNeasy para la purificación de ARN. El rendimiento de ARN fue variable de 0,4 a 10 µg y dependía del número de células.

- [0328]** Como control, se aislaron células T para análisis por microarray. Se aislaron células CD8 de sangre periférica

de paquetes leucocitarios mediante selección negativa utilizando el kit de aislamiento de células CD8 de Stem Cell Technologies (Rosette Separation) y se purificó adicionalmente mediante el sistema de separación magnética de células MACS utilizando el kit de aislamiento de células CD8 y se añadieron microesferas CD45RO para extraer las células CD45RO (Miltenyi Biotec). Las células T CD8 se dividieron en 3 muestras con cada muestra sometida a la estimulación que se indica a continuación: (1) anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, más IL-12 y anti-IL4, (2) anti-CD3 y anti-CD29 sin añadir citoquinas o anticuerpos neutralizantes y (3) anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, más IL-4, anticuerpos anti-IL12 y anticuerpo anti-IFN- γ . 48 horas después de la estimulación, se recogió el ARN. Después de 72 horas, las células se expandieron mediante la adición de una dilución de 8 veces con medio fresco. 7 días después de recoger el ARN, se recogieron las células Cd8, se lavaron y se estimularon por anti-CD3 y anti-CD28. 16 horas más tarde, se realizó una segunda recogida de ARN. 48 horas después de la reestimulación, se realizó una tercera recogida de ARN. Se recogió el ARN utilizando preparaciones Qiagen Midi según las instrucciones del manual con la adición de una digestión con ADNsA en columna después de la primera etapa de lavado RW1. Se eluyó el ARN en agua libre de ARNsA y posteriormente se concentró mediante precipitación con etanol. El ARN precipitado se tomó en agua libre de nucleasa hasta una concentración mínima final de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

[0329] Los microarrays de control adicionales se realizaron en ARN aislado de células T CD4+, células T auxiliares, células asesinas naturales (NK), neutrófilos (N ϕ il), monocitos CD14+, CD16+ y CD16- y células dendríticas (DC).

[0330] Se realizaron microarrays adicionales en ARN aislado de tejido canceroso, tal como Linfoma no de Hodgkin (NHL), linfoma folicular (FL) y mieloma múltiple (MM). Se realizaron microarrays adicionales en ARN aislado de células normales, tales como de nódulo linfático normal (NLN), células B normales, tales como Células B de centroblastos, centrocitos y manto folicular, células B de memoria, y células plasmáticas normales (PC), que son del linaje de células B y son equivalentes normales de la célula de mieloma, tal como células plasmáticas de amígdala, células plasmáticas de médula ósea (BM PC), células plasmáticas CD19+ (CD19+ PC), células plasmáticas CD19- (CD19- PC). Se realizaron microarrays adicionales en tejido normal, tal como cerebelo, corazón, próstata, glándula adrenal, vejiga, intestino delgado, colon, hígado fetal, útero, riñón, placenta, pulmón, páncreas, músculo, cerebro, glándula salivar, médula ósea, sangre, timo, amígdala, bazo, testículos, y glándula mamaria.

[0331] Las moléculas indicadas a continuación se han identificado por expresarse de manera significativa en células B en comparación con células no B. Específicamente, las moléculas se expresan de manera diferencial en células B intactas, células B de memoria que son IgGA+ o IgM+ y células plasmáticas de PBMC o médula ósea, en comparación con Células no B, por ejemplo células T. Por consiguiente, estas moléculas representan dianas excelentes para la terapia de tumores en mamíferos.

Molécula	Expresión específica en:	en comparación con:
35 DNA105250 (TAHO1)	Células B	células no B
DNA150004 (TAHO2)	Células B	células no B
DNA182432 (TAHO3)	Células B	células no B
DNA225785 (TAHO4)	Células B	células no B
DNA225786 (TAHO5)	Células B	células no B
40 DNA225875 (TAHO6)	Células B	células no B
DNA226179 (TAHO7)	Células B	células no B
DNA226239 (TAHO8)	Células B	células no B
DNA226394 (TAHO9)	Células B	células no B
DNA226423 (TAHO10)	Células B	células no B
45 DNA227781 (TAHO11)	Células B	células no B
DNA227879 (TAHO12)	Células B	células no B
DNA256363 (TAHO13)	Células B	células no B
DNA332467 (TAHO14)	Células B	células no B
DNA58721 (TAHO15)	Células B	células no B
50 DNA335924 (TAHO16)	Células B	células no B
DNA340394 (TAHO17)	Células B	células no B
DNA56041 (TAHO18)	Células B	células no B
DNA59607 (TAHO19)	Células B	células no B
DNA257955 (TAHO20)	Células B	células no B
55 DNA329863 (TAHO21)	Células B	células no B
DNA346528 (TAHO22)	Células B	células no B
DNA212930 (TAHO23)	Células B	células no B
DNA335918 (TAHO24)	Células B	células no B
DNA225820 (TAHO25)	Células B	células no B
60 DNA88116 (TAHO26)	Células B	células no B
DNA227752 (TAHO27)	Células B	células no B
DNA119476 (TAHO28)	Células B	células no B
DNA254890 (TAHO29)	Células B	células no B
DNA219240 (TAHO30)	Células B	células no B
65 DNA37151 (TAHO31)	Células B	células no B
DNA210233 (TAHO32)	Células B	células no B

DNA35918 (TAH033)	Células B	células no B
DNA260038 (TAH034)	Células B	células no B
DNA334818 (TAH035)	Células B	células no B
DNA257501 (TAH036)	Células B	células no B

5

Resumen

- [0332]** La expresión de ARNm significativa se indicó en general como un valor de la proporción superior a 2. Cualquier expresión aparente en células no B, tales como en próstata, bazo, etc. puede representar un artefacto, una infiltración de tejido normal por linfocitos o una pérdida de la integridad de la muestra por el proveedor.
- (1) TAH01 (también referido como LY64 y CD180) se expresó significativamente en muestras de linfoma no de Hodgkin (NHL) y células B normales (NB).
- (2) TAH02 (también referido como MS4A1 y CD20) se expresó significativamente en linfoma no de Hodgkin (NHL), linfoma folicular (FL), nódulo linfático normal (NLN) y células B normales (NB). Además, TAH02 se expresó significativamente en amígdala y bazo normales.
- (3) TAH03 (también referido como SPAP1 y FcRH2) se expresó significativamente en linfoma no de Hodgkin (NHL) y linfoma folicular (FL) y células B de memoria (mem B). Además TAH03 se expresó significativamente en sangre y bazo. Sin embargo, tal como se ha indicado anteriormente, cualquier expresión aparente en células no B, tales como en próstata, bazo, sangre etc. puede representar un artefacto, una infiltración de tejido normal por linfocitos o pérdida de la integridad de la muestra por el proveedor.
- (4) TAH04 (también referido como CD79a) se expresó significativamente en muestras de linfoma no de Hodgkin (NHL), mieloma múltiple (MM) y cerebelo normal y sangre normal. Además TAH04 se expresó significativamente en cerebelo, sangre y bazo. Sin embargo, tal como se ha indicado anteriormente, cualquier expresión aparente en células no B, tales como en próstata, bazo, sangre etc. puede representar un artefacto, una infiltración de tejido normal por linfocitos o pérdida de la integridad de la muestra por el proveedor.
- (5) TAH05 (también referido como CD79b) se expresó significativamente en linfoma no de Hodgkin (NHL).
- (6) TAH06 (también referido como CR2 y CD21) se expresó significativamente en linfoma no de Hodgkin (NHL) y nódulo linfático normal (NLN). Además, TAH06 se expresó significativamente en bazo.
- (7) TAH08 (también referido como CD72) se expresó significativamente en linfoma no de Hodgkin (NHL), mieloma múltiple (MM) y linfoma folicular (FL) y amígdala normal. Sin embargo, tal como se ha indicado anteriormente, cualquier expresión aparente en células no B, tales como en próstata, bazo, sangre, amígdala etc. puede representar un artefacto, una infiltración de tejido normal por linfocitos o pérdida de la integridad de la muestra por el proveedor.
- (8) TAH09 (también referido como P2RX5) se expresó significativamente en células B normales (células B circulantes y células B derivadas de nódulos linfáticos) y no se expresó significativamente en células no B. Además, TAH09 se expresó significativamente en células plasmáticas normales y en mieloma múltiple. En tejidos normales, la expresión de TAH09 es relativamente baja, pero con una expresión significativa en órganos linfoides, tales como bazo y timo.
- (9) TAH010 (también referido como HLA-DOB) se expresó significativamente en mieloma múltiple (MM), linfoma no de Hodgkin (NHL).
- (10) TAH011 (también referido como CXCR5 y BLR1) se expresó significativamente en linfoma no de Hodgkin (NHL), linfoma folicular (FL), nódulo linfático normal (NLN), células B normales (NB), centroblastos y células del manto folicular, y bazo normal y amígdala normal. Sin embargo, tal como se ha indicado anteriormente, cualquier expresión aparente en células no B, tales como en próstata, bazo, sangre, amígdala, etc. puede representar un artefacto, una infiltración de tejido normal por linfocitos o pérdida de la integridad de la muestra por el proveedor.
- (11) TAH012 (también referido como FCER2) se expresó significativamente en células B normales (NB), mieloma múltiple (MM) y próstata. Sin embargo, tal como se ha indicado anteriormente, cualquier expresión aparente en células no B, tales como en próstata, bazo, sangre, amígdala, etc. puede representar un artefacto, una infiltración de tejido normal por linfocitos o pérdida de la integridad de la muestra por el proveedor.
- (12) TAH013 (también referido como GPR2) se expresó significativamente en mieloma múltiple (MM), y sangre normal.
- (13) TAH015 (también referido como LRRC4 y NAG14) se expresó significativamente en linfoma no de Hodgkin (NHL). PRO1111 (TAH015) se expresó significativamente y favoreció la expresión en células plasmáticas de médula ósea y mieloma múltiple en comparación con la expresión baja de células no B, incluyendo neutrófilos, células T y células asesinas naturales (NK). PRO1111 también se expresó significativamente en algunas células de linfoma no de Hodgkin.
- (14) TAH017 (también referido como FcRH1) se expresó significativamente en células B normales (NB), y células B de memoria.
- (15) TAH018 (también referido como IRTA2) se expresó significativamente en linfoma no de Hodgkin (NHL).
- (16) TAH020 (también referido como FcRH3) se expresó significativamente en células B normales (NB) y mieloma múltiple (MM). Además, TAH020 se detectó que se expresaba en colon, placenta, pulmón y bazo. Sin embargo, tal como se ha indicado anteriormente, cualquier expresión aparente en células no B, tales como en próstata, bazo, sangre, amígdala, etc. puede representar un artefacto, una infiltración de tejido normal por linfocitos o pérdida de la integridad de la muestra por el proveedor.
- (17) TAH021 (también referido como IRTA1) se expresó significativamente en linfoma no de Hodgkin (NHL), centrocitos y células B de memoria.

- (18) TAHO25 (también referido como CD19) se expresó significativamente en linfoma no de Hodgkin (NHL), nódulo linfático normal (NLN), linfoma folicular (FL), centroblastos, centrocitos, células B de memoria y células del manto folicular. Además TAHO25 se expresó significativamente en amígdala y bazo. Sin embargo, tal como se ha indicado anteriormente, cualquier expresión aparente en células no B, tales como en próstata, bazo, sangre, amígdala, etc. puede representar un artefacto, una infiltración de tejido normal por linfocitos o pérdida de la integridad de la muestra por el proveedor.
- (19) TAHO26 (también referido como CD22) se expresó significativamente en células B normales (NB).
- (20) TAHO27 (también referido como CXCR3) se expresó significativamente en células de mieloma múltiple.
- (21) TAHO28 (también referido como SILV1) se expresó significativamente en células plasmáticas normales, y se expresó más significativamente en células de mieloma múltiple.
- (22) TAHO29 (también referido como KCNK4) se expresó significativamente en células plasmáticas normales y en células de mieloma múltiple. En tejidos normales, la expresión de TAHO29 se expresa significativamente en testículos normales.
- (23) TAHO30 (también referido como CXorf1) se expresó significativamente en células plasmáticas normales, y se expresó más significativamente en células de mieloma múltiple. En tejidos normales, la expresión de TAHO30 se expresa significativamente en testículos normales.
- (24) TAHO31 (también referido como LRRN5) se expresó significativamente en células plasmáticas normales, y se expresó más significativamente en células de mieloma múltiple. En tejidos normales, la expresión de TAHO31 se expresa significativamente en cerebelo.
- (25) TAHO32 (también referido como UNQ9308) se expresó significativamente en células plasmáticas normales, y se expresó de manera significativa en células de mieloma múltiple. TAHO32 también se expresó significativamente en próstata normal.
- (26) TAHO33 (también referido como IGSF4B) se expresó significativamente en células de mieloma múltiple.
- (27) TAHO34 (también referido como UNQ13267) se expresó significativamente en células plasmáticas normales, y se expresó más significativamente en células de mieloma múltiple. TAHO34 también se expresó significativamente en sangre normal.
- (28) TAHO35 (también referido como FLJ12681) se expresó significativamente en células plasmáticas normales, y se expresó más significativamente en células de mieloma múltiple.
- (29) TAHO36 (también referido como UNQ12376) se expresó significativamente en células plasmáticas normales, y se expresó más significativamente en células de mieloma múltiple.

[0333] Como TAHO1-36 se ha identificado por expresarse significativamente en células B y en muestras de enfermedades asociadas a células B, tales como el linfoma no de Hodgkin, linfoma folicular y mieloma múltiple en comparación con las células no B detectado mediante análisis por microarray, las moléculas son excelentes dianas para la terapia de tumores en mamíferos, incluyendo cánceres asociados a células B, tales como linfomas, leucemias, mielomas y otros cánceres de células hematopoyéticas.

EJEMPLO 2: Análisis cuantitativa de la expresión de ARNm de TAHO

[0334] En este ensayo, se utilizaron un ensayo de 5' nucleasa (por ejemplo, TaqMan®) y PCR cuantitativa a tiempo real (por ejemplo, Mx3000P™ Real-Time PCR System (Stratagene, La Jolla, CA)), para encontrar genes que se sobreexpresan significativamente en un tipo de tejido específico, tal como células B, en comparación con un tipo de célula diferente, tal como otros tipos de glóbulos blancos primarios, y que además se pueden sobreexpresar en células cancerosas del tipo de tejido específico en comparación con células no cancerosas del tipo de tejido específico. La reacción del ensayo de 5' nucleasa es una técnica basada en PCR fluorescente que utiliza la actividad de 5' exonucleasa de la enzima Taq ADN polimerasa para controlar la expresión génica a tiempo real. Se utilizan dos cebadores de oligonucleótidos (cuyas secuencias se basan en el gen o la secuencia EST de interés) para generar un amplicón típico de una reacción de PCR. Se diseña un tercer oligonucleótidos, o sonda, para detectar la secuencia de nucleótidos localizada entre los dos cebadores de PCR. La sonda no es extendible por la enzima Taq ADN polimerasa, y se marca con un colorante fluorescente informador y un colorante fluorescente desactivador. Cualquier emisión inducida por láser del colorante informador es desactivado por el colorante desactivador cuando los dos colorantes se encuentran próximos al estar en la sonda. Durante la reacción de amplificación con PCR, la enzima Taq ADN polimerasa divide la sonda de una forma dependiente de la plantilla. Los fragmentos de la sonda resultantes se disocian en solución y la señal del colorante informador liberado está libre del efecto desactivador del segundo fluoróforo. Se libera una molécula del colorante informador para cada nueva molécula sintetizada y la detección del colorante informador no desactivado proporciona la base para la interpretación cuantitativa de los datos.

[0335] El procedimiento de 5' nucleasa se desarrolla en un dispositivo de PCR cuantitativo a tiempo real, tal como el Mx3000™ Real-Time PCR System. El sistema consiste en un termociclador, una lámpara de cuarzo-tungsteno, un tubo fotomultiplicador (PMT) para la detección y un ordenador. El sistema amplifica muestras en un formato de 96 pocillos en un termociclador. Durante la amplificación, la señal fluorescente inducida por láser se recoge a tiempo real a través de cables de fibra óptica para los 96 pocillos y se detecta en el PMT. El sistema incluye software para desarrollar el instrumento y para analizar los datos. El material de partida para el cribado fue ARNm (50 ng/pocillo desarrollado por duplicado) aislado de una variedad de diferentes tipos de glóbulos blancos (Neturophil (Neutr), células asesinas naturales (NK), Células dendríticas (Dend.), Monocitos (Mono), células T (subgrupos CD4+ y

CD8+), células madre (CD34+), así como 20 donantes de células B separados (donantes lds 310, 330, 357, 362, 597, 635, 816, 1012, 1013, 1020, 1072, 1074, 1075, 1076, 1077, 1086, 1096, 1098, 1109, 1112) para analizar la viabilidad del donante. Todo el ARN se adquirió comercialmente (AllCells, LLC, Berkeley, CA) y la concentración de cada uno se midió con exactitud siguiendo instrucciones. El ARNm se cuantifica de manera exacta, por ejemplo, 5 fluorimétricamente.

[0336] Los datos del ensayo de la 5' nucleasa se expresan inicialmente como Ct, o ciclo umbral. Éste se define como el ciclo en el que la señal informadora se acumula por encima del nivel base de fluorescencia. Los valores ΔCt se utilizan como medida cuantitativa del número relativo de copias de partida de una secuencia diana particular en una muestra de ácido nucleico. Como una unidad Ct corresponde a 1 ciclo de PCR o aproximadamente a un incremento relativo de 2 veces en relación al normal. Dos unidades corresponde a un incremento relativo de 4 veces, 3 unidades corresponde a un incremento relativo de 8 veces y así sucesivamente, se puede medir cuantitativamente el incremento relativo de veces en la expresión de ARNm entre dos o más tejidos diferentes. Cuanto más bajo es el valor de ct en una muestra, mayor es el número de copias de partida de ese gen en concreto. Si se incluye una curva estándar en el ensayo, la cantidad relativa de cada diana se puede extrapolar y facilita la visión de los datos ya que un número elevado de copias también presenta cantidades relativas (en oposición a un número de copias elevadas que tiene valores Ct inferiores) y también corrige cualquier variación de la regla generalizada de que 1Ct es igual a un incremento de 2 veces. Utilizando esta técnica, se han identificado las moléculas indicadas a continuación por sobreexpresarse de manera significativa (es decir, por lo menos 2 veces) en un único (o número limitado) de tejidos específicos o tipos de células específicos en comparación con un tejido o tipo de células diferente (del mismo y diferentes donantes de tejido), identificándose también algunas por sobreexpresarse significativamente (es decir, por lo menos 2 veces) en células cancerosas cuando se compara con células normales del tejido o tipo de célula particular y, de este modo, representan polipéptidos diana excelentes para la terapia contra el cáncer en mamíferos.

Molécula	expresión específica en:	en comparación con:
DNA105250 (TAHO1)	Células B	Células no B
DNA150004 (TAHO2)	Células B	Células no B
DNA182432 (TAHO3)	Células B	Células no B
30 DNA225785 (TAHO4)	Células B	Células no B
DNA225786 (TAHO5)	Células B/célulasCD34+	Células no B
DNA225875 (TAHO6)	Células B	Células no B
DNA226239 (TAHO8)	Células B	Células no B
DNA226394 (TAHO9)	Células B	Células no B
35 DNA226423 (TAHO10)	Células B	Células no B
DNA227781 (TAHO11)	Células B	Células no B
DNA227879 (TAHO12)	Células B	Células no B
DNA260953 (TAHO13)	Células B	Células no B
DNA335924 (TAHO 16)	Células B	Células no B
40 DNA340394 (TAHO17)	Células B	Células no B
DNA225820 (TAHO25)	Células B	Células no B
DNA8816 (TAHO26)	Células B	Células no B

Resumen

[0337] Los niveles de expresión TAHO1-TAHO6, TAHO8-TAHO13, TAHO16-TAHO17 y TAHO25-TAHO26 en ARN total aislado de células B purificadas o de células B de 20 donantes de células B (310-1112) (AllCell) y promedio (Avg. B) fue significativamente superior que los respectivos niveles de expresión de TAHO1-TAHO6, TAHO8-TAHO13, TAHO16-17 y TAHO25-TAHO26 en ARN total aislado de varios tipos de glóbulos blancos, neutrófilos (Neutr), células asesinas naturales (NK) (un subgrupo de células T), células dendríticas (Dend), monocitos (Mono), células T CD4+, células T CD8+, células madre CD34+ (datos no mostrados).

[0338] Por consiguiente, como TAHO1-TAHO6, TAHO8-TAHO13, TAHO16-TAHO17 y TAHO25-TAHO26 se expresan significativamente en células B en comparación con células no B según se detecta mediante análisis TaqMan, las moléculas son excelentes dianas para la terapia de tumores en mamíferos, incluyendo cánceres asociados a células B, tales como linfomas (es decir, Linfoma no de Hodgkin), leucemias (es decir, leucemia linfocítica crónica), mielomas (es decir, mieloma múltiple) y otros cánceres de células hematopoyéticas.

EJEMPLO 3: Hibridación *in situ*

[0339] La hibridación *in situ* es una técnica potente y versátil para la detección y localización de secuencias de ácidos nucleicos en preparaciones de células o tejido. Puede ser útil, por ejemplo, para identificar sitios de expresión génica, analizar la distribución en el tejido de la transcripción, identificar y localizar la infección viral, seguir los cambios en la síntesis de ARNm específico y ayudar en la localización de los cromosomas.

[0340] La hibridación *in situ* se llevó a cabo siguiendo una versión optimizada del protocolo por Lu y Gillett, Cell

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

Síntesis de ribosondas con ^{33}P

- 10 **[0341]** Se secaron con concentradores centrífugos de tipo Speed-Vac 6,0 μl (125 mCi) de ^{33}P -UTP (Amersham BF 1002, SA < 2000 Ci/mol). A cada tubo que contenía ^{33}P -UTP secado, se añadieron los siguientes ingredientes:
- 2,0 μl 5x de tampón de transcripción
 - 1,0 μl de DTT (100 mM)
 - 2,0 μl de mezcla de NTP (2,5 mM: 10 μl ; cada uno de 10 mM de GTP, CTP y ATP + 10 μl de H_2O)
 - 15 1,0 μl de UTP (50 μM)
 - 1,0 μl RNAsina
 - 1,0 μl de molde de ADN (1 μg)
 - 1,0 μl de H_2O
 - 1,0 μl de ARN polimerasa (para productos de PCR T3 = AS, T7 = S, normalmente)
 - 20
- [0342]** Los tubos se incubaron a 37°C durante una hora. Se añadió un total de 1,0 μl de RQ1 ADNasa, seguido de incubación a 37°C durante 15 minutos. Se añadieron un total de 90 μl de TE (Tris 10 mM pH 7,6/1 mM EDTA pH 8,0), y la mezcla se pipeteó sobre papel DE81. La solución remanente se cargó en una unidad de ultrafiltración MICROCON-50TM, y se centrifugó utilizando el programa 10 (6 minutos). La unidad de filtración se invirtió sobre un
- 25 segundo tubo y se centrifugó utilizando el programa 2 (3 minutos). Después de la centrifugación final de recuperación, se añadieron un total de 100 μl de TE. A continuación, se pipeteó 1 μl del producto final sobre papel DE81 y se contaron en 6 ml de Biofluor II.

- [0343]** La sonda se extendió sobre un gel de TBE/urea. Se añadieron un total de 1-3 μl de la sonda o 5 μl de ARN MrkII a 3 μl de solución tampón de carga. Después de calentar sobre un bloque de calor a 95°C durante 3 minutos, el gel se colocó inmediatamente sobre hielo. Los pocillos del gel se nivelaron, se cargó la muestra y se operó a 180-245 voltios durante 45 minutos. El gel se envolvió en un envoltorio de plástico y se expuso a una película XAR con una pantalla intensificadora en un congelador a -70°C desde una hora hasta toda la noche.

35 Hibridación de ^{33}P

A. Pretratamiento de las secciones congeladas.

- [0344]** Los portaobjetos se extrajeron del congelador, se colocaron sobre bandejas de aluminio y se descongelaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Las bandejas se colocaron en una incubadora a 55°C durante cinco minutos para reducir la condensación. Los portaobjetos se fijaron durante 10 minutos en paraformaldehído al 4% sobre hielo en la campana de extracción, y se lavaron en 0,5 x SSC durante 5 minutos a temperatura ambiente (25 ml 20 x SSC + 975 ml H_2O SQ). Después de la desproteinación en 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteinasa K durante 10 minutos a 37°C (12,5 μl de 10 mg/ml de reserva en 250 ml de tampón de ARNasa sin ARNasa precalentado), las secciones se lavaron en 0,5 x SSC durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las secciones se deshidrataron en etanol al 70%, 95%, 100% durante 2 minutos cada una.

B. Pretratamiento de las secciones bañadas en parafina.

- 50 **[0345]** Los portaobjetos se desparafinaron, se colocaron en H_2O SQ, y se enjuagaron dos veces en 2 x SSC a temperatura ambiente, durante 5 minutos cada vez. Las secciones se desproteinaron en 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteinasa K (500 μl de 10 mg/ml en 250 ml de tampón de ARNasa sin ARNasa; 37°C , 15 minutos) para tejido de embrión humano, u 8 x proteinasa K (100 μl en 250 ml de tampón de ARNasa, 37°C , 30 minutos) para tejidos en formalina. El posterior enjuague en 0,5 x SSC y deshidratación se llevaron a cabo tal y como se ha descrito anteriormente.

C. Prehibridación.

[0346] Los portaobjetos se dispusieron en una caja de plástico recubierta por tampón de Caja (4 x SSC, formamida al 50%). El papel de filtro se saturó.

D. Hibridación.

[0347] Se calentaron a 95°C durante 3 minutos 1,0 x 10^6 cpm de sonda y 1,0 μl de ARNt (50 mg/ml reserva) por portaobjeto. Los portaobjetos se enfriaron sobre hielo, y se añadieron 48 μl de tampón de hibridación por

portaobjeto. Después de centrifugar, se añadieron 50 µl de una mezcla de ³³P a 50 µl de prehibridación en el portaobjetos. Los portaobjetos se incubaron durante toda la noche a 55°C.

E. Lavados.

5 [0348] El lavado se realizó 2 veces durante 10 minutos con 2 x SSC, EDTA a temperatura ambiente (400 ml de 20 x SSC + 16 ml de EDTA 0,25 M, V_f=4 L), seguido de un tratamiento con ARNasaA a 37°C durante 30 minutos (500 µl de 10 mg/ml en 250 ml de tampón de ARNasa = 20 µg/ml). Los portaobjetos se lavaron 2 veces durante 10 minutos con 2 x SSC, EDTA a temperatura ambiente. Las condiciones de lavado de astringencia fueron las siguientes: 2
10 horas a 55°C, 0,1 x SSC, EDTA (20 ml 20 x SSC + 16 ml de EDTA, V_f=4 L).

F. Oligonucleótidos

15 [0349] Se realizó un análisis in situ sobre un conjunto de secuencias de ADN descritas en la presente invención. Los oligonucleótidos utilizados para estos análisis se obtuvieron para que fueran complementarios a los ácidos nucleicos (o los complementos de los mismos) tal como se muestra en las figuras que se acompañan.

(1) DNA225785 (TAHO4)

20 [0350]

p1 5'-GGGCACCAAGAACCGAATCAT-3' (SEC ID No. 72)
p2 5'-CCTAGAGGCAGCGATTAAGGG-3' (SEC ID No. 73)

(2) DNA257955 (TAHO20)

25

[0351]

p1 5'-TCAGCACGTGGATTCGAGTCA-3' (SEC ID No. 74)
p2 5'-GTGAGGACGGGGCGAGAC-3' (SEC ID No. 75)

30 G. Resultados

[0352] Se realizó un análisis in situ sobre un conjunto de secuencias de ADN descritas en la presente invención. Los resultados de estos análisis son los siguientes.

35 (1) DNA225785 (TAHO4)

[0353] La expresión se observó en células linfoides. Específicamente, en tejidos normales, se observó la expresión en bazo y nódulos linfáticos y coincide con las áreas de células B, tales como centros germinales, manto y zonas marginales. También se observó una expresión significativa en secciones de tejido de una variedad de linfomas malignos, incluyendo el linfoma de Hodgkin, el linfoma folicular, el linfoma de células grandes difuso, el linfoma linfocítico pequeño y el linfoma no de Hodgkin. Estos datos concuerdan con el potencial papel de esta molécula en los tumores hematopoyéticos, específicamente tumores de células B.

(2) DNA257955 (TAHO20)

45

[0354] Se observó expresión en células linfoides benignas y neoplásicas. Específicamente, en tejidos normales, se observó expresión en áreas de células B, tales como centros germinales, manto y zonas marginales y en tejido de pulpa blanca del bazo. Estos datos concuerdan con el potencial papel de esta molécula en los tumores hematopoyéticos, específicamente tumores de células B.

50

EJEMPLO 4: Utilización de TAHO como sonda de hibridación

[0355] El siguiente procedimiento describe el uso de una secuencia de nucleótidos que codifica TAHO como sonda de hibridación para, por ejemplo, la detección de la presencia de TAHO en un mamífero.

55

[0356] El ADN que comprende la secuencia codificante del TAHO de longitud completa o maduro tal como se describe aquí, también se puede utilizar como sonda para cribar los ADNs homólogos (tales como aquéllos que codifican variantes naturales de TAHO) en bibliotecas de ADNc de tejido humano o bibliotecas genómicas de tejido humano.

60

[0357] La hibridación y el lavado de filtros que contienen cualquier ADN de biblioteca se realizan según las siguientes condiciones de elevada astringencia. La hibridación de la sonda derivada de TAHO radiomarcada a los filtros se realiza en una solución al 50% de formamida, 5x SSC, SDS al 0,1%, pirofosfato de sodio al 0,1%, 50 mM de fosfato de sodio, pH 6,8, 2x de solución de Denhardt, y sulfato de dextrano al 10% a 42°C durante 20 horas. El
65 lavado de los filtros se realiza en una solución acuosa de 0,1x SSC y SDS al 0,1% a 42°C.

[0358] A continuación, se pueden identificar los ADNs que tienen una identidad secuencial deseada con el ADN que codifica TAHO de secuencia nativa y longitud completa utilizando las técnicas estándar conocidas en el sector.

EJEMPLO 5: Expresión de polipéptido de TAHO en *E.coli*

5

[0359] Este ejemplo ilustra la preparación de una forma no glicosilada de TAHO mediante la expresión recombinante en *E. coli*.

[0360] La secuencia de ADN que codifica TAHO se amplifica inicialmente utilizando cebadores de PCR
10 seleccionados. Los cebadores deberían contener sitios para las enzimas de restricción que se correspondan con los sitios para enzimas de restricción en el vector de expresión seleccionado. Se puede utilizar una variedad de vectores de expresión. Un ejemplo de vector adecuado es el pBR322 (derivado del *E. coli*, véase Bolivar et.al., *Gene*, 2:95 (1977)) que contiene genes para la resistencia a la ampicilina y la tetraciclina. El vector se digiere con una enzima de restricción y se desfosforila. A continuación, las secuencias amplificadas por PCR se unen en el vector. El vector
15 preferiblemente incluirá secuencias que codifican un gen resistente a un antibiótico, un promotor trp, una secuencia líder poli-His (incluyendo los primeros seis codones STII, secuencia poli-His, y sitio de división para la enterocinasa), la región codificante de TAHO, el terminador transcripcional lambda, y un gen argU.

[0361] A continuación, la mezcla de unión se utiliza para transformar una cepa seleccionada de *E. coli* utilizando los
20 procedimientos descritos en Sambrook et. al., *supra*. Los transformantes se identifican por su capacidad para crecer en placas de LB y, a continuación, se seleccionan las colonias resistentes a los antibióticos. El ADN plasmídico se puede aislar y confirmar mediante el análisis de restricción y la secuenciación del ADN.

[0362] Los clones seleccionados se pueden desarrollar durante toda la noche en un medio de cultivo líquido tal
25 como el caldo LB suplementado con antibióticos. El cultivo de toda la noche se puede utilizar posteriormente para inocular un cultivo a mayor escala. A continuación, las células se desarrollan hasta una densidad óptica deseada, durante la cual el promotor de la expresión se activa.

[0363] Después de cultivar las células durante muchas más horas, las células se pueden recoger mediante
30 centrifugación. El residuo de células obtenido mediante la centrifugación se puede solubilizar utilizando diversos agentes conocidos en la técnica, y la proteína TAHO solubilizada se puede a continuación purificar utilizando una columna quelante de metal en condiciones que permiten la unión fuerte de la proteína.

[0364] El TAHO se puede expresar en *E. coli* en una forma etiquetada con poli-His según el procedimiento siguiente.
35 El ADN que codifica TAHO se amplifica inicialmente utilizando cebadores de PCR seleccionados. Los cebadores contienen sitios para enzimas de restricción que corresponden con los sitios de enzimas de restricción en el vector de expresión seleccionado, y otras secuencias útiles que proporcionan un inicio de traducción eficiente y fiable, una purificación rápida en una columna quelante de metales y la eliminación proteolítica con enterocinasa. Las secuencias etiquetadas con poli-His amplificadas por PCR se ligan a continuación en un vector de expresión, que se
40 utiliza para transformar un huésped *E. coli* basado en la cepa 52 (W3110 fuhA(tonA)lon galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq). Los transformantes se desarrollan en primer lugar en LB que contiene carbenicilina 50 mg/ml a 30°C con agitación hasta alcanzar una D.O. de 3-5 a 600 nm. Los cultivos se diluyen entonces 50-100 veces en medio CRAP (preparado mezclando 3,57 g de (NH₄)₂SO₄, 0,71 g de citrato sódico-2H₂O, 1,07 g de KCl, 5,36 g de extracto de levadura Difco, 5,36 g de Sheffield hycase SF en 500 ml de agua, así como MPOS 110 mM, pH 7,3, glucosa al
45 0,55% (p/v) y MgSO₄ 7 mM) y se desarrollan durante aproximadamente 20-30 horas a 30°C con agitación. Se toman muestras para verificar la expresión mediante análisis de SDS-PAGE, y se centrifuga todo el cultivo para sedimentar las células. Los sedimentos celulares se congelan hasta la purificación y renaturalización.

[0365] La pasta de *E. coli* de fermentaciones de 0,5-1 l (6-10 g de sedimentos) se resuspende en 10 volúmenes (p/v)
50 en guanidina 7 M, Tris 20 mM, tampón pH 8. Se añaden sulfito sódico sólido y tetratiónato sódico hasta concentraciones finales de 0,1 M y 0,02M, respectivamente, y la solución se agita durante toda la noche a 4°C. Esta etapa da como resultado una proteína desnaturalizada con todos los residuos de cisteína bloqueados por la sulfitolización. La solución se centrifuga a 40.000 rpm en una ultracentrífuga Beckman durante 30 min. El sobrenadante se diluye con 3-5 volúmenes de tampón de columna quelante de metales (guanidina 6M, Tris 20 mM,
55 pH 7,4) y se filtra a través de filtros de 0,22 micras para purificar. El extracto purificado se carga en una columna quelante Qiagen de Ni²⁺-NTA de 5 ml equilibrada en el tampón de la columna quelante de metal. La columna se lava con tampón adicional que contiene imidazol 50 mM (Calbiochem, grado Utrol), pH 7,4. La proteína se eluye con tampón que contiene imidazol 250 mM. Las fracciones que contienen la proteína deseada se agrupan y guardan a 4°C. La concentración de proteínas se estima por su absorbancia a 280 nm utilizando el coeficiente de extinción
60 calculado en base a su secuencia de aminoácidos.

[0366] Las proteína se renaturalizan diluyendo la muestra lentamente en tampón de renaturalización preparado fresco que consiste en: Tris 20 mM, pH 8,6; NaCl 0,3 M; urea 2,5 M; cisteína 5 mM, glicina 20 mM y EDTA 1 mM. Los volúmenes de renaturalización se eligen para que la concentración final se encuentre entre 50 y 100
65 microgramos/ml. La solución de renaturalización se agita suavemente a 4°C durante 12-36 horas. La reacción de renaturalización se desactiva mediante la adición de TFA hasta una concentración final de 0,4% (pH de

aproximadamente 3). Antes de una purificación adicional de la proteína, la solución se filtra a través de un filtro de 0,22 micras y se añade acetonitrilo hasta una concentración final de 2-10%. La proteína renaturalizada se cromatografía en una columna de fase inversa Poros R1/H con un tampón móvil de TFA al 0,1% con elución con un gradiente de acetonitrilo del 10 al 80%. Se analizan alícuotas de fracciones con una absorbancia A_{280} en geles de poliacrilamida-SDS y se agrupan las fracciones que contienen la proteína renaturalizada homogénea. En general, las muestras renaturalizadas de manera adecuada de la mayoría de proteínas se eluyen a las concentraciones más bajas de acetonitrilo, ya que estas muestras son las más compactas con sus interiores hidrofóbicos resguardados de la interacción con la resina de fase inversa. Las muestras agregadas se eluyen normalmente a concentraciones de acetonitrilo superiores. Además de separar las formas mal plegadas de las proteínas de la forma deseada, la etapa de fase inversa también elimina la endotoxina de las muestras.

[0367] Las fracciones que contienen el polipéptido TAHO plegada deseada se agrupan y se elimina el acetonitrilo con una corriente suave de nitrógeno dirigida a la solución. Las proteínas se formulan en Hepes 20 mM, pH 6,8 con cloruro sódico 0,14 M y manitol al 4% mediante diálisis o mediante filtración en gel utilizando resinas Superfine G25 (Pharmacia) equilibradas en el tampón de formulación y filtradas de forma estéril.

[0368] Algunos de los polipéptidos TAHO descritos aquí se han expresado de manera satisfactoria y purificado utilizando esta o estas técnicas.

20 EJEMPLO 6: Expresión de TAHO en células de mamíferos

[0369] Este ejemplo ilustra la preparación de una forma potencialmente glicosilada de TAHO mediante la expresión recombinante en células de mamíferos.

[0370] El vector pRK5 (véase, EP 307.247 publicada el 15 de marzo de 1989) se utiliza como vector de expresión. Opcionalmente, el ADN de TAHO se liga en el pRK5 con enzimas de restricción seleccionadas para permitir la inserción del ADN de TAHO utilizando procedimientos de unión tales como los descritos en Sambrook et. al., *supra*. El vector resultante se denomina pRK5-TAHO.

[0371] En una realización, las células huésped seleccionadas pueden ser células 293. Las células 293 humanas (ATCC CCL 1573) se desarrollan hasta la confluencia en placas de cultivo de tejidos en un medio tal como DMEM suplementado con suero de ternera fetal y opcionalmente, componentes nutricionales y/o antibióticos. Se mezclan aproximadamente 10 µg de ADN de pRK5-[TAHO] con aproximadamente 1 µg de ADN que codifica el gen de ARN VA [Thimmapaya et. al., *Cell*, 31:543 (1982)] y se disuelve en 500 µl de 1 mM de Tris-HCl, 0,1 mM de EDTA, 0,227 M de CaCl_2 . A esta mezcla se le añade, gota a gota, 500 µl de 50 mM de HEPES (pH 7,35), 280 mM de NaCl, 1,5 mM de NaPO_4 , y se deja formar un precipitado durante 10 minutos a 25°C. El precipitado se suspende y se añade a las células 293 y se deja reposar durante aproximadamente cuatro horas a 37°C. El medio de cultivo se aspira y se añaden 2 ml de glicerol al 20% en PBS durante 30 segundos. A continuación, las células 293 se lavan con medio sin suero, se añade medio fresco y las células se incuban durante aproximadamente 5 días.

[0372] Aproximadamente 24 horas después de las transfecciones, el medio de cultivo se extrae y se reemplaza por medio de cultivo (solo) o medio de cultivo que contiene 200 µCi/ml de ^{35}S -cisteína y 200 µCi/ml de ^{35}S - metionina. Tras una incubación de 12 horas, se recoge el medio condicionado, se concentra en un filtro de centrifugación y se carga en un gel SDS al 15%. El gel procesado puede secarse y exponerse a una película durante un período de tiempo concreto para revelar la presencia del polipéptido TAHO. Los cultivos que contienen células transfectadas pueden experimentar una incubación adicional (en medio sin suero) y el medio se examina en bioensayos concretos.

[0373] En una técnica alternativa, se puede introducir el ADN de TAHO en células 293 transitoriamente utilizando el procedimiento del sulfato de dextrano descrito por Somparyrac et. al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 12: 1575 (1981). Las células 293 se desarrollan hasta la máxima densidad en un matraz giratorio y se añaden 700 µg de ADN de pRK5-TAHO. En primer lugar, las células se concentran a partir del matraz giratorio mediante centrifugación y se lavan con PBS. El precipitado de ADN-dextrano es incubado en el residuo celular durante cuatro horas. Las células se tratan con glicerol al 20% durante 90 segundos, se lavan con medio de cultivo de tejido, y se reintroducen en el matraz giratorio que contiene el medio de cultivo de tejidos, 5 µg/ml de insulina bovina y 0,1 µg/ml de transferrina bovina. Después de aproximadamente cuatro días, el medio condicionado se centrifuga y se filtra para eliminar las células y restos celulares. La muestra que contiene el TAHO expresado se puede concentrar a continuación y purificar mediante cualquier procedimiento seleccionado, tal como la diálisis y/o cromatografía en columna.

[0374] En otra realización, puede expresarse TAHO en células CHO. El vector pRK5-TAHO puede transfectarse en células CHO utilizando reactivos conocidos, tales como CaPO_4 o DEAE-dextrano. Tal y como se ha descrito anteriormente, los cultivos celulares pueden incubarse, y el medio puede sustituirse por medio de cultivo (solo) o medio que contiene un radiomarcador, tal como ^{35}S -metionina. Después de determinar la presencia del polipéptido TAHO, el medio de cultivo puede sustituirse por medio sin suero. Preferiblemente, los cultivos se incuban durante aproximadamente 6 días y, a continuación, se recoge el medio condicionado. A continuación, el medio que contiene el TAHO expresado puede concentrarse y purificarse mediante cualquier procedimiento seleccionado.

[0375] El TAHO etiquetado con epítipo puede expresarse también en células CHO huéspedes. El TAHO puede subclonarse fuera del vector pRK5. El inserto del subclón puede someterse a PCR para fusionarse en el marco con una etiqueta epítipo seleccionada, tal como una etiqueta de poli-His en un vector de expresión de Baculovirus. El inserto de TAHO etiquetado con poli-His puede subclonarse a continuación en un vector dirigido por SV40 que contiene un marcador de selección, tal como DHFR, para seleccionar clones estables. Finalmente, las células CHO pueden transfectarse (tal como se ha descrito anteriormente) con el vector dirigido por SV40. El marcaje puede realizarse, tal como se ha descrito anteriormente, para verificar la expresión. El medio de cultivo que contiene el TAHO etiquetado con poli-His expresado puede a continuación concentrarse y purificarse mediante cualquier procedimiento seleccionado, tal como mediante cromatografía de afinidad de quelato con Ni^{2+} .

[0376] TAHO se puede expresar en células CHO y/o COS mediante un procedimiento transitorio o en células CHO mediante otro procedimiento de expresión estable.

[0377] La expresión estable en células CHO se realiza utilizando el siguiente procedimiento. Las proteínas se expresan como una construcción IgG (inmoadhesina), en la que las secuencias codificantes de las formas solubles (por ejemplo, los dominios extracelulares) de las proteínas respectivas se fusionan a una secuencia de región constante de IgG1 que contiene la bisagra, CH2 y los dominios de CH2 y/o es una forma etiquetada de poli-his.

[0378] Tras la amplificación por PCR, los ADNs respectivos se subclonan en un vector de expresión de CHO utilizando técnicas estándar descritas en Ausubel et. al., Current Protocols of Molecular Biology, Unidad 3.16, John Wiley and Sons (1997). Los vectores de expresión de CHO se construyen para tener sitios de restricción 5' y 3' compatibles del ADN de interés para permitir el traslado adecuado de los de ADNc. El vector utilizado para la expresión en las células CHO es tal y como se describe en Lucas et. al., Nucl. Acid Res. 24:9 (1774-1779 (1996), y utiliza el promotor/potenciador temprano de SV40 para dirigir la expresión del ADNc de interés y la dihidrofolato reductasa (DHFR). La expresión de DHFR permite la selección para el mantenimiento estable del plásmido tras la transfección.

[0379] Se introducen doce microgramos del ADN plasmídico deseado en aproximadamente 10 millones de células CHO utilizando reactivos de transfección Superfect® (Quiagen), Dosper® o Eugene® (Boehringer Mannheim) disponibles comercialmente. Las células se desarrollan tal y como se describe en Lucas et. al., supra. Se congelan aproximadamente 3×10^7 células en una ampolla para el crecimiento y producción posterior tal y como se describe a continuación.

[0380] Las ampollas que contienen el ADN plasmídico se descongelan mediante la colocación en un baño de agua y se mezclan mediante agitación. El contenido se pipetea en un tubo de centrífuga que contiene 10 mL de medio y se centrifuga a 1000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se aspira y las células se resuspenden en 10 ml de medio selectivo (PS20 filtrado a 0,2 μm con suero bovino fetal al 5% dialfiltrado a 0,2 μm). A continuación, las células se fraccionan en un agitador de 100 mL que contiene 90 mL de medio selectivo. Después de 1-2 días, las células se transfieren a un agitador de 250 mL lleno con 150 mL de medio de crecimiento selectivo y se incuban a 37°C. Después de otros 2-3 días, se siembran 3×10^5 células/mL en agitadores de 250 mL, 500 mL y 2000 mL. El medio celular se cambia por medio fresco mediante centrifugación y resuspensión en el medio de producción. Aunque se puede utilizar cualquier medio de CHO adecuado, en realidad se utiliza un medio de producción descrito en la patente de Estados Unidos No. 5.122.469, concedida el 16 de junio de 1992. En un agitador de producción de 3L se siembra a razón de $1,2 \times 10^6$ células/ml. En el día 0, se determina el número de células y el pH. En el día 1, se toman muestras del agitador y se inicia el burbujeo con aire filtrado. En el día 2, se toman muestras del agitador, la temperatura se cambia a 33°C, y se añaden 30 mL de glucosa 500g/L y 0,6 mL de antiespuma al 10% (por ejemplo 35% de emulsión de polidimetilsiloxano, Dow Corning 365 Medical Grade Emulsion). Durante toda la producción, el pH se ajusta según la necesidad manteniéndose en valores alrededor de 7,2. Después de 10 días, o hasta que la viabilidad cae por debajo del 70%, el cultivo celular se recoge mediante centrifugación y se filtra a través de un filtro de 0,22 μm . El filtrado se guarda a 4°C o se carga inmediatamente en columnas para la purificación.

[0381] Para las construcciones etiquetadas de poli-his, las proteínas se purifican utilizando una columna de Ni^{2+} -NTA (Qiagen). Antes de la purificación, se añade imidazol al medio condicionado hasta una concentración de 5 mM. El medio condicionado se bombea en una columna de 6 ml de Ni^{2+} -NTA equilibrada en 20 mM Hepes, pH 7,4, tampón que contiene 0,3 M de NaCl y 5 mM de imidazol a una velocidad de flujo de 4-5 ml/min. a 4°C. Tras cargarse, la columna se lava con un tampón de equilibrio adicional y la proteína se eluye con tampón de equilibrio que contiene 0,25 M de imidazol. La proteína altamente purificada se desala posteriormente en un tampón de almacenamiento que contiene 10 mM Hepes, 0,14 M de NaCl y manitol al 4%, pH 6,8, con una columna G25 Superfine (Pharmacia) de 25 ml y se guarda a -80°C.

[0382] Las construcciones de inmoadhesina (que contiene Fc) se purifican a partir del medio condicionado tal y como se indica a continuación. El medio condicionado se bombea en una columna de Proteína A (Pharmacia) de 5 ml que ha sido equilibrada en un tampón de 20 mM de fosfato sódico, pH 6,8. Después de cargarse, la columna se lava ampliamente con tampón de equilibrio antes de la elución con ácido cítrico 100 mM, pH 3,5. La proteína eluída se neutraliza inmediatamente recogiendo fracciones de 1 ml en tubos que contienen 275 μL de tampón Tris 1M, pH

9. La proteína altamente purificada se desala posteriormente en un tampón de almacenamiento, tal como el descrito anteriormente para las proteínas etiquetadas con poli-his. La homogeneidad se calcula mediante geles de poliacrilamida SDS y mediante la secuenciación de los aminoácidos N-terminales mediante degradación Edman.

- 5 **[0383]** Algunos de los polipéptidos TAHO descritos aquí se han expresado de manera satisfactoria y purificado utilizando esta o estas técnicas.

EJEMPLO 7: Expresión de TAHO en levadura

- 10 **[0384]** El siguiente procedimiento describe la expresión recombinante de TAHO en levadura.

[0385] En primer lugar, los vectores de expresión de levadura se construyen para la producción o secreción intracelular de TAHO a partir del promotor ADH2/GAPDH. El ADN que codifica TAHO y el promotor se insertan en los sitios para enzimas de restricción adecuados en el plásmido seleccionado para dirigir la expresión intracelular de TAHO. Para la secreción, el ADN que codifica TAHO puede clonarse en el plásmido seleccionado, junto con el ADN que codifica el promotor ADH2/GAPDH, un péptido señal TAHO nativo u otro péptido señal de mamífero, o, por ejemplo, una secuencia señal/líder secretora del factor alfa o invertasa de levadura, y secuencias enlazadoras (si se necesitan) para la expresión de TAHO.

- 20 **[0386]** Las células de levadura, tales como la cepa AB110 de la levadura, pueden a continuación transformarse con los plásmidos de expresión descritos anteriormente y cultivarse en medios de fermentación seleccionados. Los sobrenadantes de levadura transformados pueden analizarse mediante precipitación con ácido tricloroacético al 10% y una separación mediante SDS-PAGE, seguido de la tinción de los geles con azul de Coomassie.

- 25 **[0387]** El TAHO recombinante puede aislarse posteriormente y purificarse mediante la extracción de las células de levadura del medio de fermentación por centrifugación y, a continuación, la concentración del medio utilizando filtros de cartucho específicos. El concentrado que contiene TAHO puede purificarse adicionalmente utilizando resinas de cromatografía en columna seleccionadas.

- 30 **[0388]** Algunos de los polipéptidos TAHO descritos aquí se han expresado de manera satisfactoria y purificado utilizando esta o estas técnicas.

EJEMPLO 8: Expresión de TAHO en células de insectos infectadas de Baculovirus

- 35 **[0389]** El siguiente procedimiento describe la expresión recombinante en células de insectos infectadas de Baculovirus.

[0390] La secuencia que codifica para TAHO se fusiona en dirección 5' de un epítipo etiqueta contenido en un vector de expresión de baculovirus. Dichas epítipo etiquetas incluyen etiquetas de poli-His y etiquetas de inmunoglobulina (como las regiones Fc de IgG). Pueden utilizarse una variedad de plásmidos, incluyendo plásmidos derivados de los plásmidos disponibles comercialmente, tales como pVL1393 (Novagen). Brevemente, la secuencia que codifica TAHO o la parte deseada de la secuencia codificante de TAHO, tal como la secuencia que codifica el dominio extracelular de una proteína transmembrana o la secuencia que codifica la proteína madura si la proteína es extracelular, se amplifica mediante PCR con cebadores complementarios a las regiones 5' y 3'. El cebador 5' puede incorporar sitios para enzimas de restricción flanqueantes (seleccionados). El producto se digiere a continuación con todas esas enzimas de restricción seleccionadas y se subclona en el vector de expresión.

- [0391]** El baculovirus recombinante se genera mediante la cotransfección del plásmido anterior y el ADN del virus BaculoGold™ (Pharmingen) en células de *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") (ATCC CRL 1711) utilizando lipofectina (disponible comercialmente de GIBCO-BRL). Después de 4-5 días de incubación a 28°C, los virus liberados se recogen y se utilizan para amplificaciones adicionales. La infección viral y la expresión de la proteína se realizan tal y como se describe en O'Reilley et. al., Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994).

- 55 **[0392]** A continuación, TAHO etiquetado con poli-His expresados puede purificarse, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad de Ni²⁺-quelato tal y como se indica a continuación. Los extractos se preparan a partir de las células recombinantes Sf9 infectadas del virus tal y como se ha descrito por Rupert et. al., *Nature*, **362**: 175-179 (1993). Brevemente, las células Sf9 se lavan, se resuspenden en el tampón de sonicación (25 ml de HEPES, pH 7,9; 12,5 mM de MgCl₂; 0,1 mM de EDTA; glicerol al 10%; NP-40 al 0,1%; 0,4 M de KCl), y se sonicán dos veces durante 20 segundos en hielo. Los sonicados se depuran por centrifugación, y el sobrenadante se diluye 50 veces en el tampón de carga (50 mM de fosfato, 300 mM de NaCl, glicerol al 10%, pH 7,8) y se filtra a través de un filtro de 0,45 µm. Se prepara una columna de agarosa Ni²⁺-NTA (comercialmente disponible de Qiagen) con un volumen de lecho de 5 ml, se lava con 25 ml de agua y se equilibra con 25 ml del tampón de carga. El extracto celular filtrado se carga en la columna a 0,5 ml por minuto. La columna se lava hasta la línea base a A₂₈₀ con el tampón de carga, en cuyo punto se inicia la recogida de la fracción. A continuación, la columna se lava con un tampón de lavado secundario (50 mM fosfato: 300 mM de NaCl, glicerol al 10%, pH 6,0), que eluye la proteína no unidas específicamente.

Después de alcanzar la línea base a A_{280} de nuevo, la columna se desarrolla con un gradiente de 0 a 500 mM de imidazol en el tampón de lavado secundario. Se recogen fracciones de un ml y se analizan mediante SDS-PAGE y tinción con plata o transferencia Western con Ni^{2+} -NTA-conjugado a fosfatasa alcalina (Qiagen). Las fracciones que contienen el TAHO etiquetado con His_{10} eluido, respectivamente, se agrupan y se dializan contra el tampón de carga.

[0393] Alternativamente, la purificación del TAHO etiquetado con IgG (o con Fc) puede realizarse usando técnicas de cromatografía conocidas, incluyendo, por ejemplo, cromatografía en columna con Proteína A o proteína G.

- 10 **[0394]** Algunos de los polipéptidos TAHO descritos aquí se han expresado de manera satisfactoria y purificado utilizando esta o estas técnicas.

EJEMPLO 9: Preparación de anticuerpos que se unen a TAHO

- 15 **[0395]** Este ejemplo ilustra la preparación de anticuerpos monoclonales que pueden unirse específicamente a TAHO.

[0396] Las técnicas para producir los anticuerpos monoclonales son conocidas en el sector y están descritas, por ejemplo, en Coding, *supra*. Entre los inmunógenos que se pueden utilizar se incluyen TAHO purificado, proteínas de fusión que contienen TAHO y células que expresan TAHO recombinante en la superficie celular. La selección del inmunógeno puede realizarse según el técnico en la materia sin una gran experimentación.

- [0397]** Los ratones, tal como Balb/c, se inmunizan con el inmunógeno de TAHO emulsionado en adyuvante completo de Freund y se inyecta subcutáneamente o intraperitonealmente en una cantidad de 1–100 microgramos. Alternativamente, el inmunógeno se emulsiona en el adyuvante de MPL-TDM (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) y se inyecta en las bases de las patas traseras del animal. A continuación, los ratones inmunizados se refuerzan 10 a 12 días después con inmunógeno adicional emulsionado en el adyuvante seleccionado. A continuación, durante diversas semanas, los ratones también se pueden reforzar con inyecciones de inmunización adicionales. Las muestras de suero se pueden obtener periódicamente de los ratones mediante muestras de sangre retro-orbitales para ser analizadas en ensayos ELISA para detectar anticuerpos anti-TAHO.

[0398] Después de detectar un título de anticuerpo adecuado, a los animales “positivos” para anticuerpos se les puede inyectar una inyección intravenosa final de TAHO. De tres a cuatro días más tarde, los ratones se sacrifican y se recogen las células del bazo. A continuación, las células del bazo se fusionan (usando polietilenglicol al 35%) a una línea celular de mieloma murino seleccionado, tal como la P3X63AgU.1, disponible de ATCC, No. CRL 1597. Las fusiones generan células de hibridoma que se pueden colocar a continuación en placas de cultivo de tejido de 96 pocillos que contienen un medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) para inhibir la proliferación de células no fusionadas, híbridos de mieloma e híbridos de células de bazo.

- 40 **[0399]** Las células de hibridomas se cribarán en un ELISA para la reactividad contra inmunógeno. La determinación de células de hibridomas “positivas” que secretan los anticuerpos monoclonales deseados contra inmunógeno está dentro de la técnica.

[0400] Las células de hibridomas positivas se pueden inyectar intraperitonealmente en ratones singeneicos Balb/c para producir fluidos ascíticos que contienen los anticuerpos monoclonales anti-inmunógeno. Alternativamente, las células de hibridomas pueden desarrollarse en matraces o en botellas en rodillo de cultivos de tejidos. La purificación de los anticuerpos monoclonales producidos en los fluidos ascíticos se puede realizar usando precipitación con sulfato de amonio, seguido por cromatografía de exclusión en gel. Alternativamente, puede usarse la cromatografía por afinidad basada en la unión del anticuerpo a la proteína A o la proteína G.

- 50 **[0401]** Los anticuerpos dirigidos contra ciertos polipéptidos TAHO descritos aquí se pueden producir satisfactoriamente utilizando esta técnica o técnicas. Más específicamente, los anticuerpos monoclonales funcionales que son capaces de reconocer y unirse a la proteína TAHO (medido mediante ELISA estándar, análisis se parados FACS y/o análisis por inmunohistoquímica) se pueden generar satisfactoriamente contra las proteínas TAHO descritas aquí: TAHO1 (DNA105250), TAHO2 (DNA150004), TAHO3 (DNA182432), TAHO4 (DNA225785), TAHO5 (DNA225786), TAHO6 (DNA225875), TAHO7 (DNA226179), TAHO8 (DNA226239), TAHO9 (DNA226239), TAHO10 (DNA226423), TAHO11 (DNA227781), TAHO12 (DNA227879), TAHO13 (DNA256363), TAHO14 (DNA332467), TAHO15 (DNA58721), TAHO16 (DNA335924), TAHO17 (DNA340394), TAHO18 (DNA56041), TAHO19 (DNA59607), TAHO20 (DNA257955), TAHO21 (DNA329863), TAHO22 (DNA346528), TAHO23 (DNA212930) y TAHO24 (DNA335918), TAHO 25 (DNA225820), TAHO26 (DNA88116), y TAHO27 (DNA227752), TAHO28 (DNA119476), TAHO29 (DNA254890), TAHO30 (DNA219240), TAHO31 (DNA37151), TAHO32 (DNA210233), TAHO33 (DNA35918), TAHO34 (DNA260038), TAHO35 (DNA334818) y TAHO36 (DNA257501).

- 65 **[0402]** Además de la preparación de anticuerpos monoclonales dirigidos contra los polipéptidos TAHO descritos aquí, muchos de los anticuerpos monoclonales se pueden conjugar satisfactoriamente a una toxina celular para su uso en el direccionamiento de la toxina celular a una célula (o tejido) que expresa un polipéptido TAHO de interés

(tanto in vitro como in vivo). Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales derivados de la toxina (por ejemplo, DM1) se pueden generar satisfactoriamente contra los siguientes polipéptidos TAHO descritos aquí: TAHO1 (DNA105250), TAHO2 (DNA150004), TAHO3 (DNA182432), TAHO4 (DNA225785), TAHO5 (DNA225786), TAHO6 (DNA225875), TAHO7 (DNA226179), TAHO8 (DNA226239), TAHO9 (DNA226239), TAHO10 (DNA226423), TAHO11 (DNA227781), TAHO12 (DNA227879), TAHO13 (DNA256363), TAHO14 (DNA332467), TAHO15 (DNA58721), TAHO16 (DNA335924), TAHO17 (DNA340394), TAHO18 (DNA56041), TAHO19 (DNA59607), TAHO20 (DNA257955), TAHO21 (DNA329863), TAHO22 (DNA346528), TAHO23 (DNA212930) y TAHO24 (DNA335918), TAHO 25 (DNA225820), TAHO26 (DNA88116), TAHO27 (DNA227752), TAHO28 (DNA119476), TAHO29 (DNA254890), TAHO30 (DNA219240), TAHO31 (DNA37151), TAHO32 (DNA210233), TAHO33 (DNA35918), TAHO34 (DNA260038), TAHO35 (DNA334818) y TAHO36 (DNA257501).

EJEMPLO 10: Purificación de polipéptidos TAHO utilizando anticuerpos específicos

[0403] Los polipéptidos TAHO nativos o recombinantes se pueden purificar mediante una variedad de técnicas estándar en las técnicas de purificación de proteínas. Por ejemplo, se purifica el polipéptido pro-TAHO, el polipéptido TAHO maduro, o el polipéptido pre-TAHO mediante cromatografía de inmutafinidad usando anticuerpos específicos para el polipéptido TAHO de interés. En general, una columna de inmutafinidad está construida por acoplamiento covalente de anticuerpos anti-polipéptido TAHO a una resina de cromatografía activada.

[0404] Las inmutoglobulinas policlonales se preparan a partir de sueros inmutes mediante precipitación con sulfato de amonio o mediante purificación en la Proteína A inmutilizada (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J.). Así mismo, los anticuerpos monoclonales se preparan a partir de los fluidos ascíticos de ratón mediante la precipitación con sulfato de amonio o cromatografía en Proteína A inmutilizada. La inmutoglobulina parcialmente purificada se une covalentemente a una resina cromatográfica, tal como la SEPHAROSE™ activada con CnBr (Pharmacia LKB Biotechnology). El anticuerpo se acopla a la resina, la resina se bloquea y la resina derivada se lava de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

[0405] Dicha columna de inmutafinidad se utiliza en la purificación del polipéptido TAHO mediante la preparación de una fracción a partir de células que contienen polipéptido TAHO en una forma soluble. Esta preparación se deriva por solubilización de toda la célula o de una fracción subcelular obtenida mediante centrifugación diferencial por adición de detergente o mediante otros procedimientos conocidos en la técnica. Alternativamente, el polipéptido TAHO soluble que contiene una secuencia señal podría secretarse en una cantidad útil en el medio en el que las células crecen.

[0406] Una preparación que contiene polipéptido TAHO soluble se pasa por la columna de inmutafinidad, y la columna se lava en condiciones que permiten la absorbancia preferencial del polipéptido TAHO (por ejemplo, tampones de fuerza iónica elevada en presencia de detergente). A continuación, la columna se eluye en condiciones que interrumpen la unión anticuerpo/polipéptido TAHO (por ejemplo, un tampón de pH bajo, tal como aproximadamente un pH de 2-3, o una alta concentración de caótropro, tal como urea o ión tiocianato), y se recoge el polipéptido TAHO.

EJEMPLO 11: Ensayo de citólisis de células tumorales in Vitro

[0407] Se pueden obtener células de mamífero que expresan el polipéptido TAHO de interés utilizando el vector de expresión estándar y técnicas de clonación. Alternativamente, muchas líneas celulares tumorales que expresan polipéptidos TAHO de interés están públicamente disponibles, por ejemplo, a través de la ATCC y se pueden identificar de manera rutinaria utilizando un análisis ELISA o FACS estándar. A continuación, los anticuerpos monoclonales anti-polipéptido TAHO (disponibles comercialmente y derivados conjugados a toxina de los mismos) se pueden emplear en ensayos para determinar la capacidad del anticuerpo para matar las células in vitro que expresan el polipéptido TAHO.

[0408] Por ejemplo, las células que expresan el polipéptido TAHO de interés se obtienen tal como se ha descrito anteriormente y se emplacan en placas de 96 pocillos. En un análisis, el conjugado anticuerpo/toxina (o anticuerpo desnudo) se incluye en la incubación celular durante un periodo de 4 días. En un segundo análisis independiente, las células se incuban durante 1 hora con el conjugado anticuerpo/toxina (o anticuerpo desnudo) y, a continuación, se lavaron e incubaron en ausencia del conjugado anticuerpo/toxina durante un periodo de 4 días. A continuación se mide la viabilidad celular utilizando el Ensayo de viabilidad Celular Luminiscente CellTiter-Glo de Promega (Cat# G7571). Las células no tratadas sirven como control negativo.

[0409] Las líneas de células B (ARH-77, BJAB, Daudi, DOHH-2, Su-DHL-4, Raji y Ramos) se prepararon a 5000 células/pocillo en placas de 96 pocillos de base plana estériles separadas y tratadas con cultivo de tejido (Cellstar 650 185). Las células se introdujeron en un medio de ensayo (RPMI 1460, 1% L-Glutamina, 10% de suero fetal bovino (FBS; de Hyclone) y 10 mM HEPES). Las células se colocaron inmediatamente en un incubador a 37°C durante toda la noche. Se diluyeron conjugados de fármacos de anticuerpos (utilizando anti-CD19, anti-CD20, anti-CD21, anti-CD79A, anti-CD79B disponibles comercialmente) a 2 x 10 µg/ml en medio de ensayo. Los conjugados se unieron con reticuladores SMCC o enlazador disulfuro SPP a la toxina DM1. Además, los conjugados se pueden unir

con Vc-PAB a la toxina MMAE. Los conjugados basados en herceptina (SMCC-DM1 o SPP-DM1) se utilizaron como controles negativos. Se utilizó L-DM1 libre equivalente a la dosis de carga de conjugado como control positivo. Las muestras se centrifugaron para asegurar una mezcla homogénea antes de la dilución. Los conjugados de fármacos de anticuerpos se diluyeron posteriormente en serie 1:3. Las líneas celulares se cargaron con 50 µl de cada muestra por fila utilizando un sistema de automatización Rapidplate® 96/384 Zymark. Cuando se cargó la placa completa, las placas se reincubaron durante 3 días para permitir que toxinas tuvieran efecto. Las reacciones se detuvieron mediante la aplicación de 100 µl/pocillo de Cell Glo (Promega, Cat. #G7571/2/3) a todos los pocillos durante 10 minutos. Los 100 µl del pocillo inactivado se transfirieron a placas de 96 pocillos tratadas con cultivo de tejido blanco, base clara (Costar 3610) y se leyó la luminiscencia y se registró como unidades de luz relativa (RLU). Los anticuerpos TAHO para este experimento incluían anticuerpos disponibles comercialmente, incluyendo anti-TAHO4/CD79a (Caltag ZL7-4), anti-TAHO5/CD79b (Biomedica SN8), anti-TAHO6/CD21 (ATCC HB5), anti-TAHO26/CD22 (Leinco RFB-4) y anti-TAHO25/CD19 (Biomedica CB-19).

Resumen

15

[0410]

- (1) Anticuerpo anti-TAHO26/CD22 conjugado a toxina DM1 (CD22-SPP-DM1 y CD22-SMCC-DM1) mostró una citólisis de células tumorales significativa cuando se comparó con anticuerpo anti-TAHO26/CD22 solo o anti-HER2 conjugado a toxina DM1 de control negativo (anti-HER2-SMCC-DM1) en células RAJI o RAMOS. Además, se observó una mayor citólisis de células tumorales con CD22-SPP-DM1 en comparación con CD22-SMCC-DM1.
- (2) Anticuerpo anti-TAHO25/CD19 conjugado a la toxina DM1 (CD19-SPP-DM1 y CD19-SMCC-DM1) mostró una citólisis de células tumorales significativa cuando se comparó con anticuerpo anti-TAHO25/CD19 solo o anti-HER2 conjugado con toxina DM1 como control negativo (anti-HER2-SMCC-DM1) en células RAJI o RAMOS. Además, se observó una mayor citólisis de células tumorales con CD19-SMCC-DM1 en comparación con CD19-SPP-DM1.
- (3) Anticuerpo anti-TAHO6/CD21 conjugado con la toxina DM1 (CD21-SPP-DM1 y CD21-SMCC-DM1) mostró una citólisis de células tumorales débil cuando se comparó con anticuerpo anti-TAHO6/CD21 solo o anti-HER2 conjugado a la toxina DM1 como control negativo (anti-HER2-SMCC-DM1) en células RAJI o RAMOS. Además, se observó una mayor citólisis de células tumorales con CD21-SPP-DM1 en comparación con CD21-SMCC-DM1.
- (4) Anticuerpo anti-TAHO4/CD79A conjugado a la toxina DM1 (CD79A-SMCC-DM 1) mostró una citólisis de células tumorales significativa cuando se comparó con anticuerpo anti-TAHO4/CD79A solo o anti-HER2 conjugado a la toxina DM1 como control negativo (anti-HER2-SMCC-DM1) en células RAMOS.
- (5) Anticuerpo anti-TAHO5/CD79B conjugado a la toxina DM1 (CD79BSMCC-DM1) mostró una citólisis de células tumorales significativa cuando se comparó con anticuerpo anti-TAHO5/CD79B solo o anti-HER2 conjugado a la toxina DM1 como control negativo (anti-HER2-SMCC-DM1) en células RAJI o RAMOS.

35

[0411] Los anticuerpo monoclonales anti-polipéptido TAHO son útiles para reducir el crecimiento tumoral in vitro de tumores, incluyendo cánceres asociados a células B, tales como linfomas (es decir, Linfoma no de Hodgkin), leucemias (es decir, leucemia linfocítica crónica), mielomas (es decir, mieloma múltiple) y otros cánceres de células hematopoyéticas.

40

EJEMPLO 12: Ensayo de citólisis de células tumorales in vivo

- [0412]** Para verificar la eficacia de los anticuerpos monoclonales anti-polipéptido TAHO conjugados o no conjugados, se analizó el efecto del anticuerpo anti-TAHO en tumores en ratones. Se inocularon subcutáneamente ratones hembra CB 17 ICR SCID (6-8 semanas de vida de Charles Rivers Laboratories; Hollister, CA) con 5×10^6 células RAJI cells o 2×10^7 células BJAB-luciferasa. Se calculó el volumen del tumor en base a dos dimensiones, medido utilizando calibradores, y se expresó en mm^3 según la fórmula: $V = 0,5a \times b^2$, donde a y b son los diámetros cortos y largos del tumor, respectivamente. Los datos recogidos de cada grupo experimental se expresaron como la media $\pm$ SE. Los ratones se separaron en grupos de 8-10 ratones con volumen de tumor promedio entre 100-200 mm^3 , en cuyo punto empezó el tratamiento intravenoso (i.v.) a la dosis de anticuerpo de 5 mg/kg semanalmente durante dos a tres semanas. Los tumores se midieron una vez o dos veces por semana a lo largo del experimento. Los ratones se sacrificaron antes de que los volúmenes del tumor alcanzasen los 3000 mm^3 o cuando los tumores mostraban signos de ulceración inminente. Todos los protocolos sobre animales fueron aprobados por el Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC). Los enlazadores entre el anticuerpo y la toxina que se utilizaron fueron SPP, SMCC o cys-MC-vc-PAB (un reactivo enlazador dipéptido de valina-citrulina (vc) que tiene un componente maleimida y un componente auto-inmolador para-aminobencilcarbamoilo (PAB). Las toxinas utilizadas fueron DM1 o MMAE. Los anticuerpo TAHO para este experimento incluían anticuerpos disponibles comercialmente, incluyendo anti-TAHO4/CD79a (Caltag ZL7-4), anti-TAHO5/CD79b (Biomedica SN8), anti-TAHO6/CD21 (ATCC HB135) y anti-TAHO25/CD19 (Biomedica CB-19).

60

Resumen

[0413]

- (1) Anticuerpo anti-TAHO6/CD21 conjugado con la toxina DM1 (anti-CD21-SPP-DM1) mostró una inhibición del crecimiento del tumor en ratones SCID con tumores RAJI cuando se trató semanalmente con 5 mg/kg de anticuerpo en comparación con anticuerpos anti-CD21 y anticuerpos herceptina conjugados con la toxina DM1 (anti-Herceptin-

SMCC-DM1 y anti-Herceptin-SPP-DM1). Específicamente, en el día 19, 8 de 8 ratones tratados con anti-CD21-SPP-DM1 mostraron una regresión completa de los tumores. En el día 19, 8 de 8 ratones tratados con anti-CD21, anti-herceptin-SPP-DM 1, anti-herceptin-SMCC-DM1 o anti-CD21-SMCC-DM1 mostraron incidencia tumoral. En el día 19, 7 de 8 ratones tratados con anticuerpo anti-CD20-SMCC-DM1 mostraron incidencia tumoral.

- 5 (2) Anticuerpo anti-TAH06/CD21 conjugado con toxina MMAE (anti-CD21-cys-Mc-vc-PAB-MMAE) mostró una inhibición del crecimiento tumoral en ratones SCID con tumores RAJI cuando se trataron con 5 mg/kg de anticuerpo en comparación con anticuerpo anti-CD1 o anticuerpo anti-herceptina como control negativo. Específicamente, en el día 14, 5 de 9 ratones tratados con anti-CD21-cys-MC-vc-PAB-MMAE mostraron una regresión parcial de tumores y 4 de 9 ratones tratados con anti-CD21-cys-MC-vc-PAB-MMAE mostraron una regresión completa de tumores. En el día 14, 10 de 10 ratones tratados con anticuerpo anti-herceptina o anti-CD21 mostraron incidencia tumoral

- 10 (3) Anticuerpo anti-TAH025/CD19 conjugado con la toxina DM1 (anti-CD 19-SPP-DM1) mostró una inhibición del crecimiento tumoral en ratones SCID con tumores RAJI cuando se trataron con 5 mg/kg de anticuerpo en comparación con anticuerpo anti-CD19 conjugado con DM1 (anti-CD19-SMCC-DM1), anticuerpo anti-CD22 conjugado con DM1 (anti-CD23-SMCC-DM1) y anticuerpo anti-herceptina conjugado con DM1 (anti-herceptin-smcc-DM1 o anti-herceptin-spp-DM1). Específicamente, en el día 14, 2 de 6 ratones tratados con anti-CD19-SPP-DM1 mostraron una regresión parcial de los tumores y 3 de 6 ratones tratados con anti-CD19-SPP-DM1 mostraron una regresión completa de los tumores. En el día 14, 8 de 8 ratones tratados con anti-herceptin-SPP-DM1, anti-herceptin-SMCC-DM 1, anti-CD 19-SMCC-DM1 o anti-CD22-SMCCDM1 mostraron incidencia tumoral.

- 15 (4) Anticuerpo anti-TAH04/CD79A conjugado con DM1 (anti-CD79A-SMCC-DM1) mostró una inhibición del crecimiento tumoral en ratones SCID con tumores RAMOS en comparación con anti-herceptin-SMCC-DM1 como control negativo.

- 20 (5) Anticuerpo anti-TAH05/CD79B conjugado con DM1 (anti-CD79B-SMCC-DM1) mostró una inhibición del crecimiento tumoral en ratones SCID con tumores RAMOS en comparación con anti-herceptin-SMCC-DMA como control negativo. Anticuerpo anti-TAH05/CD79B conjugado con DM1 (anti-CD79B-SMCC-DM1) mostró una inhibición del crecimiento tumoral en ratones SCID con tumores BJAB-luciferasa en comparación con anticuerpo anti-herceptin-SMCC-DM1 o anti-herceptin como control negativo. El nivel de inhibición de los anticuerpos anti-CD79B-SMCC-DM1 fue similar al nivel de inhibición por anticuerpos anti-CD20. Específicamente, en el día 15, 1 de 10 ratones tratados con anti-CD79B-SMCC-DM1 mostraron una regresión parcial de tumores y 9 de 10 ratones tratados con anti-CD79B-SMCC-DM1 mostraron una regresión completa de los tumores. En el día 15, 10 de 10 ratones tratados con anticuerpo anti-herceptin-SMCC-DM1, anti-herceptin mostraron incidencia tumoral. En el día 15, 5 de 10 ratones tratados con anticuerpos anti-CD20 mostraron una regresión parcial de los tumores.

- [0414] Los anticuerpos monoclonales anti-polipéptido TAHO son útiles para reducir in vivo el crecimiento tumoral de tumores en mamíferos, incluyendo cánceres asociados a células B, tales como linfomas (es decir, Linfoma no de Hodgkin), leucemias (es decir, leucemia linfocítica crónica), mielomas (es decir, mieloma múltiple) y otros cánceres de células hematopoyéticas.

EJEMPLO 13: Immunohistoquímica

- 40 [0415] Para determinar la expresión en tejido de polipéptido TAHO y para confirmar los resultados de microarray del ejemplo 1, se examinó la detección inmunohistoquímica de la expresión del polipéptido TAHO en tejidos linfoides congelados bruscamente y fijados en formalina e insertados en parafina (FFPE), incluyendo amígdalas palatina, bazo, nódulo linfático y parches de Peyer del Banco de Tejidos Humanos de Genentech.

- 45 [0416] La prevalencia de la expresión de TAHO diana se evaluó en microarrays de tejido de linfoma FFPE (Cybrdi) y un panel de 24 muestras de linfoma humano congelado. Las muestras de tejido se congelaron a 5 µm, se secaron al aire y se fijaron en acetona durante 5 minutos antes de la inmunotinción. Los tejidos insertados en parafina se seccionaron a 5 µm y se montaron en portamuestras de microscopio SuperFrost Plus (VWR).

- 50 [0417] Para las secciones congeladas, se colocaron los portamuestras en TBST, 1% BSA y 10% de suero de caballo normal que contenía azida sódica al 0,05% durante 30 minutos, a continuación se incubaron con reactivos de un kit de bloqueo Avidina/Biotina (Vector) antes de la adición de anticuerpo primario. Los anticuerpos primarios monoclonales de ratón (disponibles comercialmente) se detectaron con IgG antirratón de caballo biotinilado (Vector), seguido de la incubación en el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC Elite, Vector) y tetrahidrocloruro de diaminobencidina potenciado con metal (DAB, Pierce). Las secciones de control se incubaron con anticuerpo monoclonal de ratón irrelevante coincidente de isotipo (Pharmingen) a una concentración equivalente. Tras la aplicación del reactivo ABC-HRP, las secciones se incubaron con biotil-tiramida (Perkin Elmer) en diluyente de amplificación durante 5-10 minutos, se lavaron y se incubaron de nuevo con reactivo ABC-HRP. La detección se realizó utilizando DAB tal como se ha descrito anteriormente.

- 60 [0418] Las secciones de tejido humano FFPE se descargaron en agua destilada, se trataron con solución de extracción diana (Dako) en un baño de agua hirviendo durante 20 minutos, seguido de un periodo de enfriamiento de 20 minutos. La actividad de peroxidasa endógena residual se bloqueó utilizando 1X una solución de bloqueo (KPL) durante 4 minutos. Las secciones se incubaron con reactivos de bloqueo avidina/biotina y tampón de bloqueo que contenía suero de caballo normal al 10% antes de la adición de los anticuerpos monoclonales diluidos hasta 0,5-5,0 µg/ml en tampón de bloqueo. A continuación, las secciones se incubaron secuencialmente con anticuerpo

secundario anti-ratón biotinilado, seguido de ABC-HRP y detección cromogénica con DAB. Se utilizó la amplificación de la señal de tiramida, descrita anteriormente, para aumentar la sensibilidad de tinción para un conjunto de TAHO dianas (CD21, CD22, HLA-DOB).

5 Resumen

[0419]

(1) TAHO26 (CD22) mostró un marcaje intenso de las células B de la zona del manto y un marcaje más débil, pero significativo, de los centros germinales detectado con un clon de anticuerpo primario RFB-4 (Leinco) en tejido de amígdala humana congelada y el clon 22C04 (Neomarkers) en tejido de amígdala humano FFPE (datos no mostrados).

(2) TAHO10 (HLA-DOB) mostró un patrón de marcaje punteado, posiblemente debido al marcaje de TAHO10 en vesículas intracelulares detectado con el clon DOB.L1 (BD/Pharmingen) en tejido de amígdala humana FFPE (datos no mostrados).

(3) TAHO8 (CD72) mostró un patrón de marcaje punteado, posiblemente debido al marcaje de TAHO8 en vesículas intracelulares detectado con el clon J4-117 (BD/Pharmingen) en tejido de amígdala humana congelado (datos no mostrados).

(4) TAHO1 (CD180) mostró un patrón de marcaje punteado, posiblemente debido al marcaje de TAHO1 en vesículas intracelulares detectado con el clon MHR73 (Serotec) en tejido de amígdala humana congelado (datos no mostrados).

(5) TAHO6 (CD21) mostró un marcaje intenso de las células dendríticas foliculares en centros germinales y células B maduras en la zona del manto detectado con el clon HB-135 (ATCC) en tejido de amígdala humana FFPE y utilizando amplificación de señal de tiramida (TSA) (datos no mostrados).

(6) TAHO11 (CXCR5) mostró un marcaje significativo tanto en la zona de manto como los centros germinales detectado con el clon 51505 (R&D Systems) y utilizando un anticuerpo anti-ratón conjugado a Cy3 (R&D Systems) en amígdala humana congelada.

[0420] Por consiguiente, en vista del patrón de expresión de TAHO1, TAHO6, TAHO8, TAHO10, TAHO11 y TAHO26 evaluado mediante inmunohistoquímica en muestras de amígdala, un órgano linfóide donde se desarrollan células B, las moléculas son dianas excelentes para la terapia de tumores en mamíferos, incluyendo cánceres asociados a células B, tales como linfomas (es decir, Linfoma no de Hodgkin), leucemias (es decir, leucemia linfocítica crónica), mielomas (es decir, mieloma múltiple) y otros cánceres de células hematopoyéticas.

EJEMPLO 14: Citometría de flujo

[0421] Para determinar la expresión de moléculas TAHO, se realizó un análisis FACS utilizando una variedad de células, incluyendo células normales y células enfermas, tales como células de leucemia linfocítica crónica (CLL).

A. Células normales: TAHO2 (CD20), TAHO1 (CD180), TAHO26 (CD22), TAHO4 (CD79A), TAHO5 (CD79B), TAHO8 (CD72), TAHO11 (CXCR5)

[0422] Para los subtipos de células B de amígdalas, las amígdalas frescas se trocearon en HBSS frío y se pasaron a través de un colador de células de 70 µm. Las células se lavaron una vez y se contaron. Las células B CD19+ se enriquecieron utilizando el AutoMACS (Miltenyi). Brevemente, las células de amígdalas se bloquearon con IgG humana, se incubaron con microesferas anti-CD19, y se lavaron antes de la selección positiva sobre el AutoMACS. Se guardó una fracción de células B CD19+ para el análisis citométrico de flujo de células plasmáticas. Las células CD19+ restante se tiñeron con FITC-CD77, PE-IgD, y APC-CD38 para separar subpoblaciones de células B. El enriquecimiento de CD19+ se analizó utilizando PE-Cy5-CD19, y la pureza variaba del 94 al 98% de CD19+. Las subpoblaciones B de amígdalas fueron separadas en el MoFlo por Michael Hamilton a la velocidad de flujo de 18.000-20000 células/segundo. Las células del manto folicular se recogieron como la fracción IgD/CD38-, las células B de memoria fueron IgD-/CD38-, los centrocitos fueron IgD-/CD38+/CD77-, y los centroblastos fueron IgD-/CD38+/CD77+. Las células se guardaron en suero al 50% durante toda la noche, o se tiñeron y fijaron con paraformaldehído al 2%. Para el análisis de células plasmáticas, se tiñeron todas las células B de amígdalas con CD138-PE, CD20-FITC, y se biotinyó el anticuerpo con la diana de interés y se detectó con estreptavidina-PE-Cy5. Las subpoblaciones B de amígdalas se tiñeron con anticuerpo biotinyado para la diana de interés, y se detectaron con estreptavidina-PE-Cy5. El análisis de flujo se realizó en el BD FACSCaliber, y se analizaron los datos posteriormente utilizando software FlowJo v 4.5.2 (TreeStar). Los anticuerpos conjugados con biotina que estaban disponibles comercialmente, tales como TAHO2/CD20 (2H7 de Acell), TAHO1/CD180 (MHR73-11 de eBioscience), TAHO8/CD72 (JF-117 de BD Pharmingen), TAHO26/CD22 (RFB4 de Acell), TAHO11/CXCR5 (51505 de R&D Systems), TAHO4/CD79A (ZL7-4 de Serotec) y TAHO5/CD79B (CB-3 de BD Pharmingen), se utilizaron en la citometría de flujo.

Resumen de TAHO2 (CD20), TAHO1 (CD180), TAHO26 (CD22), TAHO4 (CD79A), TAHO5 (CD79B), TAHO8 (CD72), TAHO11 (CXCR5) en células normales

[0423] El patrón de expresión en los subtipos B de amígdalas separados se realizó utilizando un anticuerpo

monoclonal específico para el polipéptido de interés. TAHO2 (CD20) (utilizando anti-CD20, 2H7 de BD Pharmingen), TAHO26 (CD22) (utilizando anti-CD22, RFB4 de Ancell), TAHO4 (CD79A) (utilizando anti-CD79A), TAHO5 (CD79B) (utilizando anti-CD79B), TAHO8 (CD72) (utilizando anti-CD72), TAHO1 (CD180) (utilizando anti-CD180, MHR73-11 de eBioscience) y TAHO11 (utilizando anti-CXCR5, 51505 de R&D Systems) mostraron una expresión significativa en células B de memoria, células del manto folicular, centroblastos y centrocitos (datos no mostrados).

[0424] El patrón de expresión en las células plasmáticas de amígdalas se realizó utilizando un anticuerpo monoclonal específico para el polipéptido TAHO de interés. TAHO26 (CD22) (utilizando anti-CD22, RFB4 de Ancell), TAHO4 (CD79A) (utilizando anti-CD79A), TAHO5 (CD79B) (utilizando anti-CD79B), TAHO1 (CD180) (utilizando anti-CD180, MHR73-11 de eBioscience) y TAHO8 (CD72) (utilizando anti-CD72) mostraron una expresión significativa en células plasmáticas (datos no mostrados).

[0425] Por consiguiente, a la vista del patrón de expresión de TAHO2, TAHO1, TAHO26, TAHO4, TAHO5, TAHO8 y TAHO11 en subtipos B de amígdalas evaluados mediante FACS, las moléculas son dianas excelentes para la terapia de tumores en mamíferos, incluyendo cánceres asociados a células B, tales como linfomas (es decir, Linfoma no de Hodgkin), leucemias (es decir, leucemia linfocítica crónica), mielomas (es decir, mieloma múltiple) y otros cánceres de células hematopoyéticas.

B. Células CLL: TAHO11 (CXCR5), TAHO4 (CD79A), TAHO5 (CD79B), TAHO26 (CD22), TAHO12 (CD23/FCER2), TAHO1 (CD180)

[0426] Los siguientes mAbs purificados o conjugados a fluorocromo se utilizaron para la citometría de flujo de muestras de CLL: CD5-PE, CD 19-PerCP Cy5.5, CD20-FITC, CD20-APC (disponible comercialmente de BD Pharmingen). Además, los anticuerpos biotinilados disponibles comercialmente contra CD22 (RFB4 de Ancell), CD23 (M-L233 de BD Pharmingen), CD79A (ZL7-4 de Serotec), CD79B (CB-3 de BD Pharmingen), CD 180 (MHR73-11 de eBioscience), CXCR5 (51505 de R&D Systems) se utilizaron para la citometría de flujo. Los anticuerpos CD5, CD19 y D20 se utilizaron para canalizar células B y se realizó la tinción con PI para comprobar la viabilidad celular.

[0427] Las células (10^6 células en un volumen de 100 ml) se incubaron en primer lugar con 1 mg de cada uno de los anticuerpos CD5, CD19 y CD20 y 10 mg de cada globulina gamma de humano y ratón (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA) para bloquear la unión no específica, a continuación se incubaron con concentraciones óptimas de mAbs durante 30 minutos en la oscuridad a 4°C. Cuando se utilizaron anticuerpos biotinilados, se añadieron a continuación estreptavidina-PE o estreptavidina-APC (Jackson ImmunoResearch Laboratories) según las instrucciones de fabricación. Se realizó una citometría de flujo en un FACS calibur (BD Biosciences, San Jose, CA). Se registraron las señales de dispersión frontal (FSC) y dispersión lateral (SSC) en un modo lineal, señales de fluorescencia en modo logarítmico. Las células muertas y la debris se canalizaron utilizando las propiedades de dispersión de las células. Los datos se analizaron utilizando software CellQuest Pro software (BD Biosciences) y FlowJo (Tree Star Inc.).

Resumen de TAHO11 (CXCR5), TAHO4 (CD79A), TAHO5 (CD79B), TAHO26 (CD22), TAHO12 (CD23/FCER2), TAHO1 (CD180) en muestras de CLL

[0428] El patrón de expresión en las muestras de CLL se realizó utilizando un anticuerpo monoclonal específico para el polipéptido TAHO de interés. TAHO11 (CXCR5), TAHO4 (CD79A), TAHO5 (CD79B), TAHO26 (CD22), TAHO12 (CD23/FCER2), TAHO1 (CD180) mostraron una expresión significativa en muestras de CLL (datos no mostrados).

[0429] Por consiguiente, en vista del patrón de expresión de TAHO11, TAHO4, TAHO5, TAHO26, TAHO12 y TAHO1 en muestras de leucemia linfocítica crónica (CLL) evaluadas mediante FACS, las moléculas son dianas excelentes para la terapia de tumores en mamíferos incluyendo cánceres asociados a células B, tales como linfomas (es decir, Linfoma no de Hodgkin), leucemias (es decir, leucemia linfocítica crónica), mielomas (es decir, mieloma múltiple) y otros cánceres de células hematopoyéticas.

Ejemplo 15: Internalización de TAHO

[0430] La internalización de los anticuerpos TAHO en líneas de células B se evaluaron en células Raji, Ramos, Daudi y otras células B, incluyendo líneas celulares ARH77, SuDHL4, U698M, huB y BJAB.

[0431] Se utilizó una placa de 15 cm "ready-to-split" de células B ($\sim 50 \times 10^6$ células) con células para su uso en hasta 20 reacciones. Las células estaban por debajo del paso 25 (menos de 8 semanas de vida) y crecieron de forma sana sin ningún micoplasma.

[0432] En un tubo Falcon de 15 ml de tapón suelto se añadieron 1 µg/ml de anticuerpo anti-TAHO de ratón a $2,5 \times 10^6$ células en 2 ml de medio de crecimiento normal (por ejemplo, RPMI/10% FBS/1% glutamina) que contenía 1:10 de bloqueo de FcR (kit MACS, dializado para eliminar la azida), 1% pen/strep, 5 PM pepstatina A, 10 µg/ml leupeptina (inhibidores de proteasas lisosomales) y 25 µg/ml Alexa488-transferrina (que marcaron el mecanismo de

reciclaje e indicaron qué células estaban vivas; alternatively se puede utilizar un marcador en fase fluida de dextrano Ax488 para marcar todos los mecanismos) durante 24 horas en un incubador con CO₂ al 5% a 37°C. Para los anticuerpos de internalización rápida, se tomaron puntos de tiempo cada 5 minutos. Para los puntos de tiempo tomados en menos de 1 hora, se utilizó 1 ml de medio libre de carbonato completo (Gibco 18045-088 + 10% FBS, 1 % glutamina, 1% pen/strep, 10 mM Hepes pH 7,4) y las reacciones se realizaron en baño de agua a 37°C en lugar del incubador con CO₂.

[0433] Después de completar la evolución el tiempo, las células se recogieron mediante centrifugación (1500 rpm a 4°C durante 5 minutos en G6-SR o 2500 rpm a 3 minutos en una centrífuga eppendorf tipo benchtop), se lavaron una vez en 1,5 ml de medio libre de carbonato (en Eppendorfs) o 10 ml de medio para tubos Falcon de 15 ml. Las células se sometieron a una segunda centrifugación y se resuspendieron en 0,5 ml de paraformaldehído al 3% (EMS) en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la fijación de las células.

[0434] Las siguientes etapas son realizadas por un conjunto de células a través de centrifugación. Las células se lavaron en PBS y a continuación se inactivaron durante 10 minutos en 0,5 ml de NH₄Cl 50 mM (sigma) en PBS y se permeabilizaron con 0,5 ml de Triton-X-100 al 0,1% en PBS durante 4 minutos durante una rotación de centrifugación de 4 minutos. Las células se lavaron en PBS y se sometieron a centrifugación. Se añadió 1 µg/ml Cy3-anticuerpo anti ratón (o anti-especie 1-) para detectar la captación del anticuerpo en 200 µl de medio libre de carbonato completo durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron dos veces en medio libre de carbonato y se resuspendieron en 25 µl de medio libre de carbonato y las células se dejaron reposar como una gota en un pocillo de un portamuestras LabtekII de 8 pocillos recubiertos de polilisina durante por lo menos una hora (o durante toda la noche en un frigorífico). Se aspiraron las células no unidas y se montaron los portamuestras con una gota por pocillo de Vectashield que contenía DAPI bajo un cubremuestras de 50x24 mm. Las células se examinaron bajo un objetivo de 100x para la internalización de los anticuerpos.

Resumen

[0435]

(1) TAHO25/CD19 (detectado utilizando anticuerpo anti-CD19 Biomeda CB-19) se internalizó en 20 minutos en células Ramos y daudi, llegando a los lisosomas en 1 hora. En células Raji y ARH77, la internalización de TAHO25/CD19 no fue detectable en 20 horas.

(2) La internalización de TAHO6/CR2 significativa (detectado utilizando anticuerpo anti-CR2 ATCC HB-135) no fue detectable en células Raji y en células Daudi en 20 horas.

(3) TAHO26/CD22 (detectado utilizando anticuerpo anti-CD22 Leinco RFB4) se internalizó en 5 minutos en células Raji, en 5 minutos en células Ramos, en 5 minutos en células Daudi y en 5 minutos en células ARH77 y se liberó a los lisosomas en 1 hora. TAHO26/CD22 (detectado utilizando anticuerpos anti-CD22, DAKO To15, Diatec 157, Sigma HIB-22 o Monosan BL-BC34) se internalizó en 5 minutos en células Raji y se liberó a los lisosomas en 1 hora.

(4) La internalización de TAHO12/FCER2 significativa (detectado utilizando anticuerpo anti-FCER2 Ancell BU38 o Serotec D3.6) no fue detectable en células ARH77 en 20 horas.

(5) La internalización de TAHO8/CD72 (detectado utilizando anticuerpo anti-CD72 BD Pharmingen J4-117) no fue detectable en 20 horas en células SuDHL4.

(6) TAHO4/CD79a (detectado utilizando anticuerpo anti-CD79a Serotec ZL7-4) se internalizó en 1 hora en células Ramos, en 1 hora en células Daudi y en 1 hora en células SuDHL4 y se liberó a lisosomas en 3 horas.

(7) TAHO1/CD180 (detectado utilizando anticuerpo anti-CD180 BD Pharmingen G28-8) se internalizó en 5 minutos en células SuDHL4 y se liberó a los lisosomas en 20 horas.

(8) La internalización de TAHO11/CXCR5 significativa (detectado utilizando anticuerpo anti-CXCR5 R&D Systems 51505) no fue detectable en 20 horas en células U698M.

(9) TAHO5/CD79b (detectado utilizando anticuerpo anti-CD79b Ancell SN8) se internaliza en 20 minutos en células Ramos, Daudi y Su-DHL4 y se libera a los lisosomas en 1 hora.

[0436] Por consiguiente, en vista de la internalización de TAHO25, TAHO26, TAHO4, TAHO1 y TAHO5 en líneas celulares B evaluada mediante inmunofluorescencia utilizando los anticuerpos anti-TAHO respectivos, las moléculas son dianas excelentes para la terapia de tumores en mamíferos, incluyendo cánceres asociados a células B, tales como linfomas (es decir, linfoma No de Hodgkin), leucemias (es decir, leucemia linfocítica crónica), mielomas (es decir, mieloma múltiple) y otros cánceres de células hematopoyéticas.

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo que se une a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la figura 10, con o sin su péptido señal asociado, para utilizar en un método de tratamiento del linfoma folicular, el linfoma de células de manto o el linfoma difuso de células grandes, en el que dicho anticuerpo está conjugado a un agente inhibidor del crecimiento o un agente citotóxico y está internalizado por una célula del linfoma folicular, una célula del linfoma de células de manto o una célula del linfoma difuso de células grandes que expresan dicho polipéptido e inhibe el crecimiento de las mismas.
2. Utilización de un anticuerpo que se une a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la figura 10, con o sin su péptido señal asociado, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del linfoma folicular, el linfoma de células de manto o el linfoma difuso de células grandes, en el que dicho anticuerpo está conjugado a un agente inhibidor del crecimiento o un agente citotóxico y está internalizado por una célula del linfoma folicular, una célula del linfoma de células de manto o una célula del linfoma difuso de células grandes que expresan dicho polipéptido e inhibe el crecimiento de las mismas.
3. Anticuerpo para utilizar, según la reivindicación 1, o la utilización, según la reivindicación 2, en los que el anticuerpo está conjugado al agente inhibidor del crecimiento o al agente citotóxico a través de un enlazador.
4. Utilización, o anticuerpo para utilizar, según la reivindicación 3, en los que el enlazador es un enlazador sensible a peptidasa.
5. Utilización, o anticuerpo para utilizar, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en los que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, o es un fragmento de anticuerpo, o es un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.
6. Utilización, o anticuerpo para utilizar, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en los que el anticuerpo está conjugado a un agente inhibidor del crecimiento.
7. Utilización, o anticuerpo para utilizar, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en los que el anticuerpo está conjugado a un agente citotóxico.
8. Utilización, o anticuerpo para utilizar, según la reivindicación 7, en los que el agente citotóxico se selecciona del grupo que consiste en toxinas, antibióticos, isótopos radioactivos y enzimas nucleolíticas.
9. Utilización, o anticuerpo para utilizar, según la reivindicación 8, en los que la toxina se selecciona del grupo que consiste en monometilauristatina (MMAE), maitansinoide y caliqueamicina.
10. Utilización, o anticuerpo para utilizar, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en los que el anticuerpo es producido en bacterias o es producido por células CHO.
11. Utilización, o anticuerpo para utilizar, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en los que dicho tratamiento comprende además exponer dicha célula a tratamiento con radiación o a un agente quimioterapéutico.
12. Utilización, o anticuerpo para utilizar, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en los que el tratamiento causa la muerte de la célula del linfoma folicular, la célula del linfoma de células de manto o la célula del linfoma difuso de células grandes.
13. Utilización, o anticuerpo para utilizar, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en los que la proteína tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 10, con o sin su secuencia señal.
14. Utilización, o anticuerpo para utilizar, según la reivindicación 3, en los que el anticuerpo está conjugado a un maitansinoide y en los que el enlazador se selecciona del grupo que consiste en sulfosuccinimidil maleimidometil ciclohexano carboxilato (SMCC) y N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato (SPP).
15. Utilización, o anticuerpo para utilizar, según la reivindicación 14, en los que el enlazador es SMCC.
16. Utilización, o anticuerpo para utilizar, según la reivindicación 14, en los que el enlazador es SPP.
17. Utilización, o anticuerpo para utilizar, según la reivindicación 4, en los que el anticuerpo está conjugado a un maitansinoide y en los que el enlazador sensible a peptidasa comprende un enlazador dipéptido valina-citrulina (vc) que tiene un componente maleimida y un componente autoinmolador para-aminobencilcarbamoilo (PAB) (MC-vc-PAB).
18. Utilización, o anticuerpo para utilizar, según la reivindicación 3, en los que el anticuerpo está conjugado a monometilauristatina (MMAE) a través de vc-PAB.

Figura 9

DNA225786

CAGGGGACAGGCTGCAGCCGGTGCAGTTACACGTTTTCTCTCCAAGGAGCCTCGGACGTTG
 TCACGGGTTTGGGGTCGGGGACAGAGCAGTGACC ATGGCCAGGCTGGCGTTGTCTCCTGT
 GCCCAGCCACTGGATGGTGGCGTTGCTGCTGCTGCTCTCAGCTGAGCCAGTACCAGCAGC
 CAGATCGGAGGACCGGTACCGGAATCCCAAAGGTAGTGCTTGTTTCGCGGATCTGGCAGAG
 CCCACGTTTTCATAGCCAGGAAACGGGGCTTCACGGTGAAAATGCACTGCTACATGAACAG
 CGCCTCCGGCAATGTGAGCTGGCTCTGGAAGCAGGAGATGGACGAGAATCCCCAGCAGCT
 GAAGCTGGAAAAGGGCCGCATGGAAGAGTCCAGAACGAATCTCTCGCCACCCTCACCAT
 CCAAGGCATCCGGTTTTGAGGACAATGGCATCTACTTCTGTCAGCAGAAGTGCAACAACAC
 CTCGGAGGTCTACCAGGGCTGCGGCACAGAGCTGCGAGTCATGGGATTGAGCACCTTGGC
 ACAGCTGAAGCAGAGGAACACGCTGAAGGATGGTATCATCATGATCCAGACGCTGCTGAT
 CATCTCTTCATCATCGTGCCTATCTTCCTGCTGCTGGACAAGGATGACAGCAAGGCTGG
 CATGGAGGAAGATCACACCTACGAGGGCCTGGACATTGACCAGACAGCCACCTATGAGGA
 CATAGTGACGCTGCGGACAGGGGAAGTGAAGTGGTCTGTAGGTGAGCACCCAGGCCAGGA
GTGAGAGCCAGGTCGCCCCATGACCTGGGTGCAGGCTCCCTGGCCTCAGTGACTGCTTCG
 GAGCTGCCTGGCTCATGGCCCAACCCCTTCTCTGGACCCCCAGCTGGCCTCTGAAGCTG
 GCCCACCAGAGCTGCCATTTGTCTCCAGCCCCTGGTCCCCAGCTCTTGCCAAAGGGCCTG
 GAGTAGAAGGACAACAGGGCAGCAACTTGGAGGGAGTTCTCTGGGGATGGACGGGACCCA
 GCCTTCTGGGGGTGCTATGAGGTGATCCGTCCCCACACATGGGATGGGGGAGGCAGAGAC
 TGGTCCAGAGCCCGCAAATGGACTCGGAGCCGAGGGCCTCCAGCAGAGCTTGGAAGGG
 CCATGGACCCAACTGGGGCCCCAGAAGAGCCACAGGAACATCATTCTCTCCCGCAACCAC
 TCCCACCCAGGGAGGCCCTGGCCTCCAGTGCTTCCCCCGTGGAATAAACGGTGTGTCC
 TGAGAAACCA

Figura 10

DNA225786

```
></usr/seqdb2/sst/DNA/Dnaseqs.min/ss.DNA225786
><subunit 1 of 1, 229 aa, 1 stop
><MW: 26048, pI: 5.86, NX(S/T): 4
```

**MARLALSPVPSHWMVALLLLLSAEPVPAARSEDYRNPKGSACSRIWQSPRFIARKRGFT
VKMH CYMNSASGNVSWLWKQEMDENPQQLKLEKGRMEESQNESLATLTIQGIRFEDNGIY
FCQQKCNNTSEVYQCGTEL RVMGFSTLAQLKQRNTLKDGIIMIQTLLIILPIIVPIFLL
LDKDDSKAGMEEDHTYEGLDIDQTATYEDI VTLRTGEVKWSVGEHPGQE**

Secuencia señal

aminoácidos 1-28

Dominio transmembrana

aminoácidos 5-25, 159-179

Dominio de inmunoglobulina

aminoácidos 58-124

Motivo de activación de base tirosina del inmunoreceptor

aminoácidos 193-213

Sitio de N-glicosilación

aminoácidos 73-76, 101-104, 127-130, 128-131

Sitio de fosforilación de la proteína quinasa C

aminoácidos 49-51, 60-62, 156-158, 212-214

Sitio de fosforilación de la caseína quinasa II

aminoácidos 99-102, 156-159, 206-209, 221-224

Sitio de fosforilación de tirosina quinasa

aminoácidos 113-120

Sitio de N-miristoilación

aminoácidos 40-45, 118-123



Figura 77B

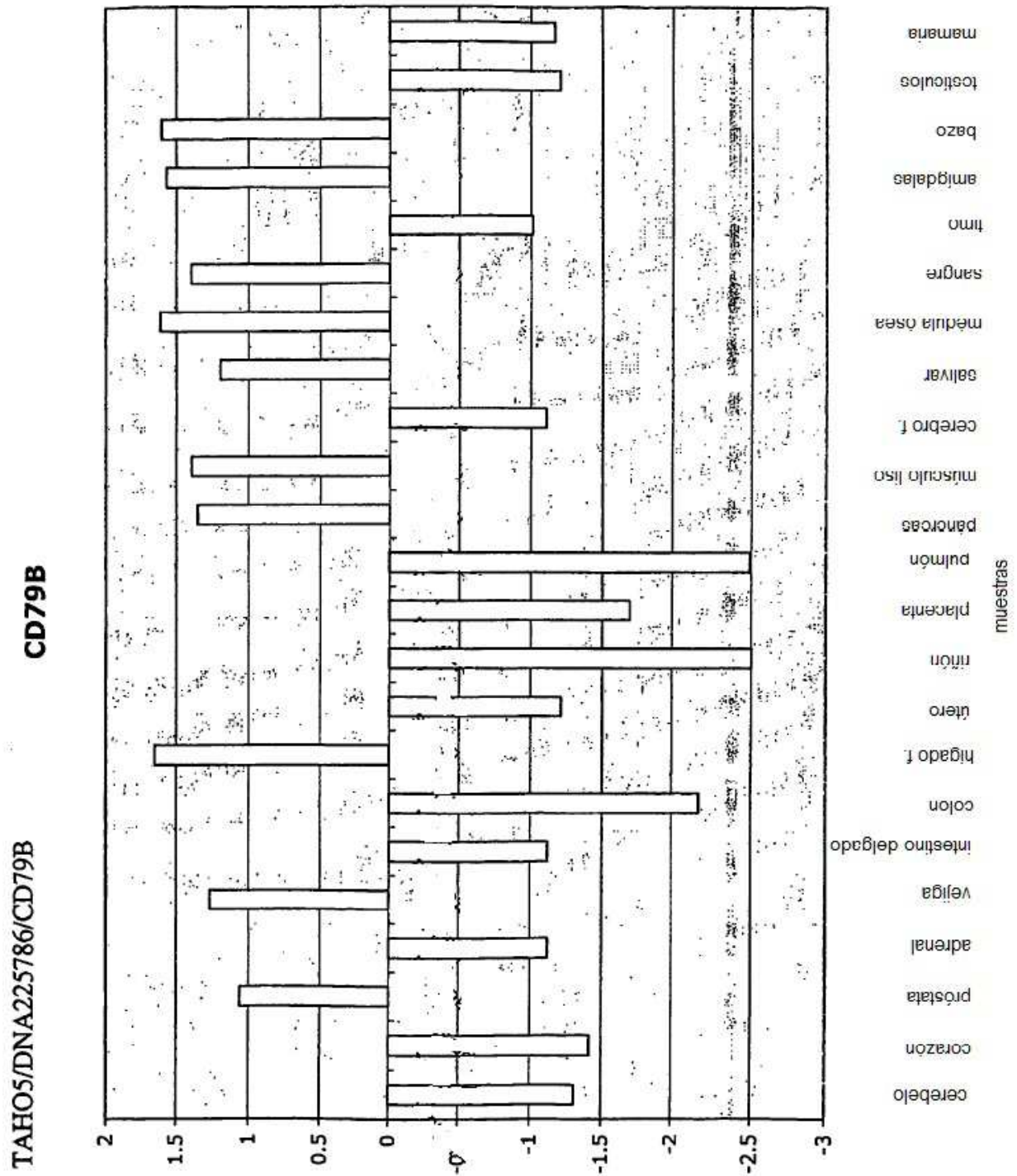


Figura 77C

