

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 610**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

C12Q 1/37 (2006.01)

G01N 33/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2005 E 05775274 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.12.2014 EP 1774022**

54 Título: **Procedimientos y composiciones para modular la activación del factor de crecimiento de hepatocitos**

30 Prioridad:

26.07.2004 US 591339 P

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

30.03.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KIRCHHOFER, DANIEL K.;
MORAN, PAUL M. y
PEEK, MARK D.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 532 610 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

Procedimientos y composiciones para modular la activación del factor de crecimiento de hepatocitos

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere generalmente a los campos de la biología molecular y la regulación de factores de crecimiento. Más específicamente, la invención se refiere a moduladores de la ruta de señalización de HGF/c-met, y a usos de dichos moduladores.

10

Antecedentes

La hepsina (también conocida como TMRPRSS 1) es una serina proteasa similar a quimotripsina expresada en la superficie celular y un miembro de la familia de las serina proteasas de transmembrana tipo II (TTSP), que también incluye matriptasa (también conocida como MT-SP1) y enteropeptidasa (1). El gen de hepsina humano, localizado sobre el cromosoma 19 en q11-13.2 (2), codifica un polipéptido de 417 aminoácidos (3) que comprende una cola citoplásmica corta del extremo N, una región transmembrana y un dominio extracelular (Arg45 - Leu417) compuesto de los dominios ricos en cisteína del receptor secuestrante (SRCR) y de proteasa. El zimógeno de hepsina se activa autocatalíticamente por la escisión en Arg162 - Ile163 (4), formando una enzima heterodimérica con el dominio de proteasa ligado por disulfuro (Cys153-Cys277) al dominio SRCR. Además del enlace Cys-Cys covalente, la estructura cristalina recientemente determinada de la hepsina reveló que los dominios SRCR y de proteasa comparten una amplia región de interfase, enterrando cada dominio aproximadamente 1200Å^2 (5). Debido a que esta región de interfase se localiza próxima a los residuos proximales a la membrana del dominio SRCR, el dominio de la proteasa hepsina y el sitio activo pueden posicionarse próximos a la superficie celular (5). Esto es fundamentalmente diferente de otras serinas proteasas ensambladas en la superficie celular, tales como los factores de coagulación VIIa (FVIIa)¹, IXa y Xa, cuyos sitios activos están localizados muy por encima (60 - 80 Å) de la superficie de la membrana (6-8).

La función fisiológica de la hepsina ha sido imprecisa. Excepto por el factor de coagulación VII, no se conocen sustratos macromoleculares y no se han identificado inhibidores fisiológicamente relevantes. Se sugirió una función de la hepsina en la coagulación de la sangre por Kazama y col. (1995) (9), demostrando que las células transfectadas con hepsina pueden activar el factor de coagulación VII. Sin embargo, ratones deficientes en hepsina fueron viables y no mostraron trastornos de la coagulación de la sangre (10, 11), poniendo en entredicho la importancia de la hepsina en la hemostasia normal. Sin embargo, es posible que la hepsina pueda contribuir a la formación de fibrina en situaciones patológicas, tales como carcinoma de células renales (12), en las que el iniciador primario de la coagulación de la sangre, el factor tisular, (13,14), está ausente. Además, otros estudios han sugerido un enlace funcional entre la hepsina y el crecimiento celular. Dependiendo de la línea celular tumoral y las condiciones experimentales usadas, se ha informado que la hepsina tiene actividad promotora del crecimiento (15) o supresora del crecimiento (16). Información adicional referente a la hepsina puede encontrarse en, entre otros, la publicación PCT n° WO2004/009803; patente de EE.UU. n° 6.482.630; patente de EE.UU. n° 6.423.543; patente de EE.UU. n° 5.981.830; publicación de solicitud de patente de EE.UU. n° 2004/0009911 A1; publicación de solicitud de patente de EE.UU. n° 2004/0001801 A1; publicación de solicitud de patente de EE.UU. n° 2003/0223973 A1; publicación de solicitud de patente de EE.UU. n° 2003/0175736 A1; publicación de solicitud de patente de EE.UU. n° 2003/0013097 A1 (también WO02/059373); publicación de solicitud de patente de EE.UU. n° 2003/0049645 (también WO02/064839); y publicación de solicitud de patente de EE.UU. n° 2004/0132156.

Recientes experimentos de expresión génica identificaron hepsina como uno de los genes más altamente regulados por incremento en cáncer de próstata (17-22). La tinción *in situ* mostró expresión de hepsina sobre células epiteliales de las glándulas secretoras de la próstata (19). La expresión de hepsina se correlacionó con la transformación neoplásica (19), siendo la mayor en tumores de pacientes con enfermedad avanzada y la menor en hiperplasia benigna (18,22). A diferencia, un estudio encontró que la baja expresión de la proteína hepsina se correlacionó con altas puntuaciones de Gleason y tumores grandes (20). No es evidente si esta aparente contradicción está relacionada con los procedimientos usados, es decir, inmunohistoquímica (20) frente a la cuantificación de ARN (18,22). Además, la hepsina también está fuertemente regulada por incremento en cáncer de ovario (23) y en carcinoma de células renales, en los que está asociado principalmente al tipo de célula epitelial (12).

En la superficie de células epiteliales, la hepsina está situada idealmente para interactuar con componentes de la matriz extracelular y otras proteínas asociadas a la membrana. Se sabe que las serina proteasas similares a quimotripsina, que incluyen la TTSP matriptasa (sinónimo MT-SP1) (24, 25) que está estructuralmente relacionada con la hepsina, activan enzimas fibrinolíticas, metaloproteasas de matriz y formas latentes de factores de crecimiento, tales como factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). El HGF promueve la proliferación celular, migración, angiogénesis, supervivencia y morfogénesis, activando la tirosina cinasa de receptor Met (revisada en (26, 27)). Además de su importancia en la fisiología normal, la ruta de HGF/Met participa en el crecimiento tumoral invasivo y la metástasis tumoral (26). El HGF tiene alta similitud con la serina proteasa plasminógeno y está compuesto por una cadena α que contiene un dominio N y cuatro dominios Kringle y una cadena β con homología por proteasas similares a quimotripsina. Es secretada en la matriz extracelular como un precursor monocatenario

inactivo (pro-HGF) y requiere la escisión por activación en Arg494 - Val495 para formar el heterodímero α/β ligado a disulfuro biológicamente competente (28-31). Esta etapa está mediada por pro-HGF, que convierte las serina proteasas, tales como el activador del factor de crecimiento de hepatocitos (HGFA) (32), matriptasa (33, 34), activador del plasminógeno tipo urocinasa (u-PA) (35), factor XIIa (36), factor XIa y calicreína del plasma (34). El HGFA y la matriptasa se inhiben por inhibidores tipo Kunitz expresados en la superficie celular, tales como las dos variantes de corte y empalme del inhibidor del activador de factores de crecimiento de hepatocitos HAI-1 (37, 38) y HAI-1 B (34) y por HAI-2 (39). HAI-2 (también conocido como bikunina placentaria) (40) también inhibe potentemente el factor XIa y la calicreína del plasma (41), mientras que HAI-1 B tiene poca o ninguna actividad inhibitoria (34). Por tanto, la disponibilidad biológica del conjunto de pro-HGF en la matriz extracelular está regulada por las actividades de pro-HGF convertasas y sus inhibidores.

El perfil de expresión de la hepsina en tejidos con cáncer como se ha descrito anteriormente, acoplado a su posible función en actuar de regulador de otros factores de crecimiento, cuya desregulación podría subyacer la carcinogénesis, sugiere que la modulación de la interacción de hepsinas con su sustrato podría demostrar ser un enfoque terapéutico eficaz. A este respecto, hay una clara necesidad en identificar un sustrato fisiológico para hepsina y/o su(s) modulador(es) fisiológico(s). La invención cumple esta necesidad y proporciona otros beneficios.

Divulgación de la invención

Como se ha escrito en el presente documento, un sustrato fisiológico para hepsina, una proteína de la superficie celular altamente expresada en exceso en múltiples cánceres, es el factor de crecimiento de hepatocitos, que él mismo es conocido por desempeñar una función importante en muchos aspectos del desarrollo del cáncer. Se muestra en el presente documento que la hepsina escinde pro-HGF con una actividad comparable a la potente pro-HGF convertasa fisiológica, HGFA (activador del factor de crecimiento de hepatocitos). El HGF de dos cadenas (activado) generado por la hepsina presenta actividades biológicas normales, que incluyen la inducción de la fosforilación de Met tirosina, estimulación de la proliferación celular y estimulación de la migración celular. Además, se identifican dos inhibidores de dominios de Kunitz, HAI-1B y HAI-2, en el presente documento como reguladores fisiológicos de la actividad enzimática de hepsina. La invención proporciona procedimientos y composiciones basados al menos en parte en estos hallazgos, que se describen en mayor detalle más adelante y como se define en las reivindicaciones. Se muestra que la hepsina y su interacción con HGF y/o sus inhibidores fisiológicos pueden ser una diana única y ventajosa para un mayor ajuste en el diseño de enfoques profilácticos y/o terapéuticos contra afecciones patológicas asociadas a la señalización anormal o no deseada de la ruta de HGF/Met (también denominada "c-met"). Así, la invención proporciona procedimientos y composiciones para su uso, para identificar y para usar sustancias que pueden modular la ruta de HGF/c-met mediante la modulación de moléculas de interacción fisiológica que participan en la regulación de la activación de HGF, como se define en las reivindicaciones.

Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona un procedimiento de cribado (o identificación) de una sustancia inhibitoria candidata (es decir, antagonista) que inhibe la activación por hepsina de HGF, comprendiendo dicho procedimiento: (a) poner en contacto una sustancia candidata con una primera muestra que comprende hepsina y un sustrato de pro-HGF, y (b) comparar la cantidad de activación del sustrato de pro-HGF en la muestra con la cantidad de activación del sustrato de pro-HGF en una muestra de referencia que comprende cantidades similares de hepsina y sustrato de pro-HGF como la primera muestra, pero que no se ha puesto en contacto con dicha sustancia candidata, por lo que una disminución en la cantidad de activación del sustrato de pro-HGF en la primera muestra en comparación con la muestra de referencia indica que la sustancia candidata es capaz de inhibir la activación por hepsina de HGF monocatenario (pro-HGF). En una realización, la hepsina en una muestra está en una cantidad eficaz para activar dicho pro-HGF. Un sustrato de pro-HGF adecuado para su uso en estos procedimientos puede estar en varias formas, mientras que imite la característica del sitio de escisión de hepsina sobre pro-HGF. Ejemplos de sustrato de pro-HGF incluyen, pero no se limitan a, HGF monocatenario de longitud completa que comprende una forma de tipo salvaje del enlace peptídico R494-V495, y cualquier fragmento de HGF que comprenda este enlace peptídico. Tal fragmento puede ser de cualquier longitud, por ejemplo, al menos (aproximadamente) 5, 7, 10, 15, 20, 25 aminoácidos de longitud, o entre (aproximadamente) 4 y 25, 5 y 20, 7 y 15 aminoácidos de longitud. Generalmente y preferentemente, un sustrato de pro-HGF comprende un enlace peptídico R494-V495 que puede escindirse por una hepsina de tipo salvaje. En una realización, el sustrato de pro-HGF comprende un sitio de escisión de HGF humano que se ajusta al sitio de escisión consenso de proteasas (es decir, residuo básico en la posición P₁ y dos residuos de aminoácidos hidrófobos en las posiciones P₁' y P₂' - P₁ R494, P₁' V495, P₂' V496).

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento de cribado de una sustancia que bloquea la activación de pro-HGF por hepsina, comprendiendo dicho procedimiento seleccionar una sustancia que se une (preferentemente, pero no necesariamente, específicamente) a hepsina o pro-HGF y bloquea la interacción específica (por ejemplo, unión) entre la hepsina y pro-HGF. En algunas realizaciones, la sustancia compite con la hepsina para unirse a HGF. En algunas realizaciones, la sustancia compite con pro-HGF por unirse a hepsina. En una realización, la sustancia comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % de similitud o identidad de secuencias con respecto a pro-HGF (por ejemplo, humano), por ejemplo, un fragmento de HGF humano que comprende los residuos de aminoácidos 494 (Arg) ligados por péptido a 495 (Val). En algunas realizaciones en las que la sustancia

comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos tal, el fragmento está mutado o carece de al menos una porción de la cadena beta de HGF, de forma que dicho fragmento tiene actividad activante de c-met reducida en comparación con HGF de tipo salvaje.

5 Como sería evidente para un experto en la materia, ensayos de cribado de acuerdo con aquellos descritos anteriormente también pueden comprender una primera etapa de cribado basada en una lectura de formación de complejos de hepsina-HGF para obtener un primer conjunto de sustancia moduladora candidata, seguido de una
 10 segunda etapa de cribado basada en la capacidad del primer conjunto de sustancia moduladora candidata para modular la activación de HGF y/o conversión de HGF en una forma que puede activar la ruta de HGF/c-met. Lecturas adecuadas pueden ser cualquiera que sea evidente para un experto en la materia, basándose en un conocimiento de la formación de complejos de enzima-sustrato y/o actividades biológicas asociadas a la ruta de señalización de HGF/c-met. La formación de complejos de enzima-sustrato puede medirse usando, por ejemplo, ensayos bioquímicos rutinarios (por ejemplo, electroforesis en gel, cromatografía, RMN, etc.). Las actividades biológicas de HGF/c-met incluyen, pero no se limitan a, fosforilación de C-met, fosforilación de moléculas celulares
 15 que son sustratos de C-met cinasa, crecimiento celular (proliferación, supervivencia, etc.), angiogénesis, migración celular, morfogénesis celular, etc.

En un aspecto, la invención proporciona el uso médico de los antagonistas de HGF/c-met que rompen la ruta de señalización de HGF/c-met como se define en las reivindicaciones. Por ejemplo, la invención se refiere a una
 20 molécula que inhibe la escisión por hepsina de pro-HGF (por ejemplo, escisión en la posición R494-V495). La molécula puede ejercer su función inhibidora en cualquier número de formas, que incluyen, pero no se limitan a, unión a tanto hepsina como pro-HGF de forma que se inhiba la escisión por hepsina de pro-HGF, uniéndose al complejo de hepsina-pro-HGF de forma que se inhiba la escisión de pro-HGF, y/o uniéndose a pro-HGF o hepsina (individualmente o en complejo) de forma que se inhiban los efectos de la escisión por hepsina de HGF (por ejemplo, inhibición de la liberación de HGF posterior a la escisión por hepsina). En una realización, una molécula antagonista no inhibe la unión de HGF a c-met. Por ejemplo, en una realización, una molécula antagonista no es un anticuerpo o fragmento del mismo que tiene capacidad inhibidora y/o de unión similar como el anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma depositada bajo la Colección Americana de Cultivos Tipo número de acceso ATCC HB-11894 (hibridoma 1A3.3.13) o HB-11895 (hibridoma 5D5.11.6). En una realización, una molécula antagonista inhibe
 30 actividades biológicas asociadas a la activación de HGF/c-met.

En un aspecto, un antagonista se deriva del descubrimiento descrito en el presente documento de que los inhibidores del activador del factor de crecimiento de hepatocitos (HAI-1, HAI-1B, HAI-2) son potentes inhibidores de la activación por hepsina de pro-HGF. En una realización, la invención se refiere a un antagonista de la activación de
 35 pro-HGF por hepsina, comprendiendo dicho antagonista al menos una porción (incluyendo todo) de HAI-1, HAI-1 B o HAI-2 humano. En una realización, dicha porción comprende una secuencia del dominio de Kunitz (KD) que puede inhibir la activación de pro-HGF por hepsina. En una realización, dicha secuencia del dominio de Kunitz es el dominio 1 de Kunitz (KD1) de HAI-1 o HAI-1 B. En una realización, un antagonista comprende una secuencia de KD1 variante que tiene al menos aproximadamente el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad de secuencias con KD1 de tipo salvaje de HAI-1 humano, en el que dicha secuencia variante tiene al menos capacidad comparable como KD1 de tipo salvaje en inhibir la escisión por hepsina de pro-HGF humano. En una realización, un antagonista comprende una secuencia de KD1 de variante que tiene entre aproximadamente el 70 % y el 99 %, aproximadamente el 75 % y el 98 %, aproximadamente el 80 % y el 97 %, el 85 % y el 95 % de identidad de secuencias con KD1 de tipo salvaje de HAI-1 humano, en el que dichas secuencias tienen al menos capacidad comparable como KD1 de tipo salvaje en inhibir la escisión por hepsina de pro-HGF humano. En una realización, dicha secuencia del dominio de Kunitz es uno o ambos de los dominios de Kunitz de HAI-2. En una realización, un antagonista comprende una secuencia del dominio de Kunitz de HAI-2 de variante que tiene al menos aproximadamente el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad de secuencias con el (los) dominio(s) de Kunitz correspondiente(s) de HAI-2 humano de tipo salvaje, en el que dicha secuencia variante tiene al menos capacidad comparable como HAI-2 de tipo salvaje en inhibir la escisión por hepsina de pro-HGF humano. En una realización, un antagonista comprende una secuencia del dominio de Kunitz de HAI-2 de variante que tiene entre aproximadamente el 70 % y el 99 %, aproximadamente el 75 % y el 98 %, aproximadamente el 80 % y el 97 %, 85 % y 95 % de identidad de secuencias con el (los) dominio(s) de Kunitz correspondiente(s) de HAI-2 humano de tipo salvaje, en el que dichas secuencias tienen al menos capacidad comparable como HAI-2 de tipo salvaje en
 55 inhibir la escisión por hepsina de pro-HGF humano.

En algunas realizaciones, un antagonista es o comprende una molécula pequeña, péptido, anticuerpo, fragmento de anticuerpo, aptámero, o una combinación de los mismos. Los antagonistas como se describen en el presente documento pueden obtenerse rutinariamente usando técnicas conocidas en la técnica (incluyendo aquellas descritas
 60 en mayor detalle más adelante) basadas en el descubrimiento de la interacción de hepsina, inhibidores del activador del factor de crecimiento de hepatocitos y pro-HGF como se describen en el presente documento. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un antagonista compite con hepsina para unirse a HGF, pero no tiene la capacidad para escindir pro-HGF en el sitio de escisión de hepsina. En algunas realizaciones, un antagonista compite con pro-HGF para unirse a hepsina. Por ejemplo, en una realización, dicho antagonista comprende, consiste o consiste esencialmente en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % de similitud de secuencias o identidad con respecto a pro-HGF (por ejemplo, humano) y puede
 65

unirse sustancialmente a hepsina, pero carece de un sitio de escisión por hepsina (por ejemplo, un sitio P₁ que comprende el enlace peptídico R494-V495 de HGF humano de tipo salvaje) y/o carece de la capacidad para activar c-met (por ejemplo, en la que la cadena β de HGF está mutada, carece de cadena β de HGF o porción de la misma, etc.). En una realización, un antagonista comprende, consiste o consiste esencialmente en un fragmento de HGF que puede unirse a hepsina, en la que dicho fragmento carece de al menos una porción de cadena β de HGF de forma que dicho fragmento tiene actividad activante de c-met reducida en comparación con HGF de tipo salvaje.

Así, la invención se refiere a un mutante de HGF que puede unirse sustancialmente a hepsina, pero tiene actividad moduladora de HGF/c-met disminuida en comparación con HGF de tipo salvaje, por ejemplo, un antagonista de la actividad de HGF/c-met o una variante de HGF que presenta una reducción, pero no una ausencia, de la actividad biológica de HGF (por ejemplo, actividad estimulante del crecimiento celular). En una realización, un antagonista es capaz de inhibir la actividad biológica de HGF natural (*in vivo*) (tal actividad biológica incluye, pero no se limita a, estimulación de la proliferación celular, potenciamiento de la supervivencia celular, promoción de la angiogénesis, inducción/promoción de la migración celular). En una realización, un antagonista proporciona actividad promotora reducida del crecimiento celular (que incluye, pero no se limita a, proliferación celular, supervivencia celular, angiogénica, migración celular).

En algunas realizaciones, un antagonista se obtiene por un procedimiento de cribado o identificación de la invención como se describe en el presente documento.

En un aspecto, una molécula antagonista se asocia a una toxina tal como un agente citotóxico. Estas moléculas/sustancias pueden formularse o administrarse en combinación con un aditivo/agente potenciador, tal como una radiación y/o agente quimioterapéutico.

En el presente documento se describe una molécula que puede potenciar la escisión de pro-HGF por hepsina, en la que dicha molécula puede interferir con la interacción de HAI-1, HAI-1B y/o HAI-2 con hepsina. En algunos casos, una molécula potenciadora es o comprende una molécula pequeña, péptido, anticuerpo, fragmento de anticuerpo, aptámero, o una combinación de los mismos. Por ejemplo, una molécula potenciadora puede comprender, consistir o consistir esencialmente en un fragmento, o variante de la misma, de HAI-1, HAI-1B y/o HAI-2, en la que dicho fragmento puede unirse a hepsina, pero no inhibe sustancialmente la escisión por hepsina de pro-HGF. En un caso, dicha molécula puede inhibir competitivamente la unión de HAI-1, HAI-1B y/o HAI-2 de tipo salvaje a hepsina. En un caso, una molécula potenciadora es un anticuerpo que interfiere con la formación de un complejo que comprende hepsina y HAI-1, HAI-1B y/o HAI-2. En un caso, una molécula potenciadora es hepsina o variante de la misma (incluyendo cualquiera de aquellas definidas más adelante), en la que la hepsina o variante de la misma puede efectuar la escisión de pro-HGF en el sitio R494-V495.

La invención también proporciona moléculas y composiciones antagonistas para su uso en modular los estados de enfermedad asociados a desregulación de los ejes de señalización de HGF/c-met como se define en las reivindicaciones. Así, en un aspecto, la invención proporciona antagonistas y composiciones para su uso en un procedimiento de modulación de la activación de c-met en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento administrar al sujeto una molécula moduladora de HGF/c-met (por ejemplo, una molécula antagonista, como se describe en el presente documento, que inhibe la escisión por hepsina de pro-HGF), por lo que la activación de c-met se modula como se define en las reivindicaciones. En una realización, dicha molécula es un antagonista de HGF/c-met que inhibe la actividad de HGF/c-met. En un aspecto, la invención proporciona un antagonista de c-met para su uso en un procedimiento de tratamiento de una afección patológica asociada a activación de c-met en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento administrar al sujeto un antagonista de c-met (por ejemplo, cualquiera de los antagonistas de la escisión de pro-HGF por hepsina como se describe en el presente documento), por lo que la activación de c-met se inhibe como se define en las reivindicaciones.

La ruta de señalización de HGF/c-met participa en múltiples funciones biológicas y fisiológicas, que incluyen, por ejemplo, estimulación del crecimiento celular (por ejemplo, proliferación celular, supervivencia celular, migración celular, morfogénesis celular) y angiogénesis. Así, en otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de inhibición del crecimiento celular activado de c-met (por ejemplo, proliferación y/o supervivencia), comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto una célula o tejido con un antagonista descrito en el presente documento, por lo que se inhibe la proliferación celular asociada a la activación de c-met. En otro aspecto más, la invención se refiere a un procedimiento de inhibición de la angiogénesis, comprendiendo dicho procedimiento administrar a una célula, tejido y/o sujeto con una afección asociada a angiogénesis anormal un antagonista descrito en el presente documento, por lo que se inhibe la angiogénesis. También se describe en el presente documento un procedimiento de potenciamiento de la angiogénesis, comprendiendo dicho procedimiento administrar a una célula, tejido y/o sujeto con una afección que se beneficiaría de la elevada angiogénesis y/o está asociado con cantidad sub-óptima de la angiogénesis una molécula potenciadora, por lo que se potencia la angiogénesis.

En un aspecto, la invención proporciona el uso de un antagonista en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un cáncer, un tumor, un trastorno proliferativo de células, un trastorno inmunitario (tal como autoinmunitario) y/o un trastorno relacionado con la angiogénesis como se define en las reivindicaciones. El antagonista puede ser de cualquier forma descrita en el presente documento,

que incluye anticuerpo, fragmento de anticuerpo, molécula pequeña (por ejemplo, una molécula orgánica), polipéptido (por ejemplo, un oligopéptido), ácido nucleico (por ejemplo, un oligonucleótido, tal como un oligonucleótido antisentido o ARN interferente), un aptámero, o combinación de los mismos.

5 También se describe en el presente documento

10 (i) Uso de una molécula potenciadora en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como cicatrización (por ejemplo, heridas asociadas a diabetes, traumatismo, etc.). La molécula potenciadora puede ser de cualquier forma descrita en el presente documento, que incluye anticuerpo, fragmento de anticuerpo, molécula pequeña (por ejemplo, una molécula orgánica), polipéptido (por ejemplo, un oligopéptido), ácido nucleico (por ejemplo, un oligonucleótido, tal como un oligonucleótido antisentido o ARN interferente), un aptámero, o combinación de los mismos.

15 (ii) Uso de un ácido nucleico descrito en el presente documento en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un cáncer, un tumor, un trastorno proliferativo de células, un trastorno inmunitario (tal como autoinmunitario) y/o un trastorno relacionado con la angiogénesis (por ejemplo, cicatrización).

20 (iii) Uso de un vector de expresión descrito en el presente documento en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un cáncer, un tumor, un trastorno proliferativo de células, un trastorno inmunitario (tal como autoinmunitario) y/o un trastorno relacionado con la angiogénesis (por ejemplo, cicatrización).

(iv) Uso de una célula huésped descrita en el presente documento en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un cáncer, un tumor, un trastorno proliferativo de células, un trastorno inmunitario (tal como autoinmunitario) y/o un trastorno relacionado con la angiogénesis (por ejemplo, cicatrización).

25 (v) Uso de un artículo de fabricación descrito en el presente documento en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un cáncer, un tumor, un trastorno proliferativo de células, un trastorno inmunitario (tal como autoinmunitario) y/o un trastorno relacionado con la angiogénesis (cicatrización).

30 (vi) Uso de un kit descrito en el presente documento en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad, tal como un cáncer, un tumor, un trastorno proliferativo de células, un trastorno inmunitario (tal como autoinmunitario) y/o un trastorno relacionado con la angiogénesis (cicatrización).

35 En un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de inhibición de la proliferación de células activadas por c-met, comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto una célula o tejido con una cantidad eficaz de un antagonista descrito en el presente documento, por lo que se inhibe la proliferación celular asociada a la activación de c-met.

40 En un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de tratamiento de una afección patológica asociada a desregulación de la activación de c-met en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento administrar al sujeto una cantidad eficaz de un antagonista descrito en el presente documento, por lo que se trata dicha afección.

45 En un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de inhibición del crecimiento de una célula que expresa c-met o factor de crecimiento de hepatocitos, o ambos, comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto dicha célula con un antagonista descrito en el presente documento, produciendo así una inhibición del crecimiento de dicha célula. En un ejemplo, la célula se pone en contacto por HGF expresado por una célula diferente (por ejemplo, mediante un efecto paracrino).

50 En un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de tratamiento terapéutico de un mamífero que tiene un tumor canceroso que comprende una célula que expresa c-met o factor de crecimiento de hepatocitos, o ambos, comprendiendo dicho procedimiento administrar a dicho mamífero una cantidad eficaz de un antagonista descrito en el presente documento, tratando así eficazmente dicho mamífero. En un ejemplo, la célula se pone en contacto por HGF expresado por una célula diferente (por ejemplo, mediante un efecto paracrino).

55 En un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de tratamiento o prevención de un trastorno proliferativo de células asociado a elevada expresión o actividad de hepsina, c-met y/o factor de crecimiento de hepatocitos, comprendiendo dicho procedimiento administrar a un sujeto en necesidad de tal tratamiento una cantidad eficaz de un antagonista descrito en el presente documento, tratando o previniéndose así eficazmente dicho trastorno proliferativo de células. En una realización, dicho trastorno proliferativo es cáncer.

60 En un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de inhibición del crecimiento de una célula, en el que el crecimiento de dicha célula es al menos en parte dependiente de un efecto potenciador del crecimiento de hepsina, c-met y/o factor de crecimiento de hepatocitos, comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto dicha célula con una cantidad eficaz de un antagonista descrito en el presente documento, inhibiendo así el crecimiento de dicha célula. En un ejemplo, la célula se pone en contacto por HGF expresado por una célula diferente (por ejemplo, mediante un efecto paracrino).

65

En un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento de tratamiento terapéutico de un tumor en un mamífero, en el que el crecimiento de dicho tumor es al menos en parte dependiente de un efecto potenciador del crecimiento de hepsina, c-met y/o factor de crecimiento de hepatocitos, comprendiendo dicho procedimiento poner en contacto dicha célula con una cantidad eficaz de un antagonista descrito en el presente documento, tratándose así eficazmente dicho tumor. En un ejemplo, la célula se pone en contacto por HGF expresado por una célula diferente (por ejemplo, mediante un efecto paracrino).

Pueden usarse usos médicos de la invención para afectar cualquier estado patológico adecuado, por ejemplo, células y/o tejidos asociados a la desregulación de la ruta de señalización de hepsina y/o HGF/c-met. En una realización, una célula que es elegida como diana en un procedimiento de la invención es una célula cancerosa. Por ejemplo, una célula cancerosa puede ser una seleccionada del grupo que consiste en una célula de cáncer de mama, una célula de cáncer colorrectal, una célula de cáncer de pulmón, una célula de carcinoma papilar (por ejemplo, de la glándula tiroides), una célula de cáncer de colon, una célula de cáncer pancreático, una célula de cáncer de ovario, una célula de cáncer de cuello uterino, una célula de cáncer del sistema nervioso central, una célula de cáncer de próstata, una célula de sarcoma osteogénico, una célula de carcinoma renal, una célula de carcinoma hepatocelular, una célula de cáncer de vejiga, una célula de carcinoma gástrico, una célula de carcinoma escamoso de cabeza y cuello, una célula de melanoma y una célula de leucemia. En una realización, una célula que es elegida como diana en un procedimiento de la invención es una célula hiperproliferativa y/o hiperplásica. En una realización, una célula que es elegida como diana en un procedimiento de la invención es una célula displásica. En otra realización más, una célula que es elegida como diana en un procedimiento de la invención es una célula metastásica.

Usos médicos pueden comprender etapas de tratamiento adicionales. Por ejemplo, uso médico puede referirse a un procedimiento que comprende además una etapa en la que una célula y/o tejido elegido como diana (por ejemplo, una célula cancerosa) se expone a tratamiento por radiación o un agente quimioterapéutico.

Como se describe en el presente documento, la activación de c-met es un proceso biológico importante cuya desregulación conduce a numerosas afecciones patológicas. Por consiguiente, en un ejemplo de usos médicos descritos en el presente documento, una célula que es elegida como diana (por ejemplo, una célula cancerosa) es una en la que la activación de c-met se potencia en comparación con una célula normal del mismo origen de tejido. En un ejemplo, un procedimiento descrito en el presente documento produce la muerte de una célula elegida como diana. Por ejemplo, el contacto con un antagonista descrito en el presente documento puede producir una incapacidad de la célula para señalizar mediante la ruta de c-met, que produce muerte celular.

La desregulación de la activación de c-met (y así la señalización) puede resultar de varios cambios celulares, que incluyen, por ejemplo, expresión en exceso de HGF (ligando relacionado con c-met) y/o el mismo c-met. Por consiguiente, en algunos ejemplos, un uso médico comprende elegir como diana una célula en la que c-met o el factor de crecimiento de hepatocitos, o ambos, se expresa más abundantemente por dicha célula (por ejemplo, una célula cancerosa) en comparación con una célula normal del mismo origen de tejido. Una célula que expresa c-met puede regularse por HGF de varias fuentes, es decir, en una manera autocrina o paracrina. Por ejemplo, en un ejemplo, una célula elegida como diana se pone en contacto/se une por factor de crecimiento de hepatocitos expresado en una célula diferente (por ejemplo, mediante un efecto paracrino). Dicha célula diferente puede ser del mismo origen de tejido o diferente. En un ejemplo, una célula elegida como diana se pone en contacto/se une por HGF expresado por la misma célula elegida como diana (por ejemplo, mediante un efecto/bucle autocrino).

También se describe en el presente documento un procedimiento que comprende administrar a un sujeto una molécula potenciadora descrita en el presente documento. Condiciones adecuadas que van a tratarse por este procedimiento incluyen cualquier afección patológica que esté asociada a un nivel fisiológico anormalmente/no deseablemente bajo de angiogénesis asociada a la actividad de HGF/c-met en un sujeto. Ejemplos de tales afecciones incluyen, pero no se limitan a, cicatrización, hipertrofia cardíaca, infarto cardíaco, isquemia de miembros, enfermedad arterial periférica, etc.

En un aspecto, la invención proporciona composiciones para uso médico que comprenden uno o más antagonistas descritos en el presente documento y un vehículo. En una realización, el vehículo es farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, la invención se refiere a ácidos nucleicos que codifican un antagonista descrito en el presente documento. En un ejemplo, un ácido nucleico codifica una molécula antagonista que es o comprende un polipéptido (por ejemplo, un oligopéptido). En un ejemplo, un ácido nucleico codifica una molécula antagonista que es o comprende un anticuerpo o fragmento del mismo.

En un aspecto, la invención se refiere a vectores que comprenden un ácido nucleico descrito en el presente documento.

En un aspecto, la invención se refiere a células huésped que comprenden un ácido nucleico o un vector descrito en el presente documento. Un vector puede ser de cualquier tipo, por ejemplo, un vector recombinante tal como un vector de expresión. Puede usarse cualquiera de varias células huésped. En un ejemplo, una célula huésped es una

célula procarionta, por ejemplo, *E. coli*. En un ejemplo, una célula huésped es una célula eucariota, por ejemplo, una célula de mamífero tal como célula de ovario de hámster chino (CHO).

5 También se describen en el presente documento procedimientos de preparación de una molécula antagonista o potenciadora descrita en el presente documento. Por ejemplo, en el presente documento se describe un procedimiento de preparación de un antagonista que es o comprende un anticuerpo (o fragmento del mismo), comprendiendo dicho procedimiento expresar en una célula huésped adecuada un vector recombinante que codifica dicho anticuerpo (o fragmento del mismo), y recuperar dicho anticuerpo. En otro ejemplo, en el presente documento se describe un procedimiento de preparación de un antagonista o molécula potenciadora que es o comprende un polipéptido (tal como un oligopéptido), comprendiendo dicho procedimiento expresar en una célula huésped adecuada un vector recombinante que codifica dicho polipéptido (tal como un oligopéptido), y recuperar dicho polipéptido (tal como un oligopéptido).

15 También se describe en el presente documento un artículo de fabricación que comprende un recipiente; y una composición contenida dentro del recipiente, en el que la composición comprende uno o más antagonistas o moléculas potenciadoras descritas en el presente documento. En un ejemplo, la composición comprende un ácido nucleico descrito en el presente documento. En un ejemplo, una composición que comprende un antagonista o molécula potenciadora comprende además un vehículo, que en algunos ejemplos es farmacéuticamente aceptable. En un ejemplo, un artículo de fabricación comprende además instrucciones para administrar la composición (por ejemplo, el antagonista o molécula potenciadora) a un sujeto.

25 También se describe en el presente documento un kit que comprende un primer recipiente que comprende una composición que comprende uno o más antagonistas o moléculas potenciadoras descritas en el presente documento; y un segundo recipiente que comprende un tampón. En un ejemplo, el tampón es farmacéuticamente aceptable. En un ejemplo, una composición que comprende un antagonista o molécula potenciadora comprende además un vehículo, que en algunos ejemplos es farmacéuticamente aceptable. En un ejemplo, un kit comprende además instrucciones para administrar la composición (por ejemplo, el antagonista o molécula potenciadora) a un sujeto.

30 Breve descripción de los dibujos

FIG. 1 Pureza de hepsina y actividad hacia el factor VII. (A) La hepsina soluble expresada en células CHO comprendió el dominio extracelular entero (Arg45 - Leu417) y una marca de His₈ del extremo C. Geles teñidos (condiciones reductoras) de hepsina purificada muestran que la hepsina se había convertido espontáneamente en su forma de dos cadenas por escisión en Arg163 - Ile163 (verificado por secuenciación del extremo N). (B) Activación del zimógeno del factor VII por hepsina (40 nM) en presencia de vesículas de PCPS y CaCl₂ a 37 °C durante un periodo de 2 h. Se indican las posiciones del zimógeno del factor VII, además de la cadena ligera (c.l.) y dominio de proteasa (c.p.) de FVIIa. Se muestran los marcadores de peso molecular como M_r x 10⁻³.

40 FIG. 2 Activación específica de pro-HGF por hepsina. Se incubó pro-HGF marcado con ¹²⁵I (0,05 mg/ml) en HEPES 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM (tampón HEPES) con concentraciones decrecientes de hepsina y HGFA: etapas de dilución de 3 veces de enzimas, de 40 nM en el carril 2 a 0,16 nM en el carril 7. (A) Hepsina y (B) HGFA. Después de 4 h a 37 °C, las muestras se analizaron por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras, seguido de exposición a películas de rayos X. Se indican las posiciones de pro-HGF, cadena α de HGF y cadena β de HGF (doblete). El carril 1 es una alícuota inmediatamente tomada al principio de la reacción. (C) Activación de plasminógeno por t-PA y hepsina. Se incubó plasminógeno (0,12 mg/ml) con t-PA (40 nM), hepsina (40 nM) o tampón (control) en tampón HEPES. Se analizaron alícuotas tomadas en diferentes momentos de tiempo por SDS-PAGE (condiciones reductoras) seguido de tinción con Simply Blue Safe Stain. Carril 1, tampón a 0,5 h; carril 2, t-PA a 0,5 h; carril 3, hepsina a 0,5 h; carril 4, tampón a 5 h; carril 5, t-PA a 5 h; carril 6, hepsina a 5 h. Se indican las posiciones de plasminógeno (PIg) y la cadena pesada (c.p.) de plasmina.

55 FIG. 3 Fosforilación de Met por pro-HGF activado por hepsina y HGFA. (A) Se escindió pro-HGF no marcado (0,3 mg/ml) con hepsina 40 nM o HGFA 40 nM dando >95 % de conversión. El HGF producido por escisión por hepsina (HGF_{hepsina}) y escisión por HGFA (HGF_{HRFA}) se analizó por SDS-PAGE (condiciones reductoras) y se tiñó con Simply Blue Safe Stain. (B) La fosforilación del receptor de Met se midió en un ensayo de KIRA exponiendo células A549 a concentraciones crecientes de HGF_{hepsina} (círculos), HGF_{HGFA} (cuadrados) o a scHGF (diamantes), una forma monocatenaria escindible de HGF. Las actividades se expresaron como porcentaje de la máxima señal obtenida con una preparación de control de HGF. Los valores son el promedio ± DE de tres experimentos.

60 FIG. 4 Proliferación y migración celular con pro-HGF activado por hepsina (HGF_{hepsina}) y HGFA (HGF_{HGFA}). (A) Proliferación celular de células BxPC3 en presencia de concentraciones crecientes de HGF_{hepsina} (barras rellenas) y HGF_{HGFA} (barras blancas). Los valores son el promedio de dos experimentos. (B) Cuantificación de la migración celular estimulada por concentraciones crecientes de HGF_{hepsina} (barras rellenas) y HGF_{HGFA} (barras blancas) añadidas a la cámara inferior de un sistema de migración celular Transwell. Los valores son el promedio ± DE de tres experimentos. Las actividades en los ensayos de proliferación y de migración se expresaron como

porcentaje de células de control expuestas a 100 ng/ml de una preparación de HGF de control, que se incluyó en cada experimento.

5 FIG. 5 Inhibición de la actividad enzimática de hepsina en un ensayo amidolítico. Se incubó hepsina (0,4 nM) con inhibidores durante 30 min a temperatura ambiente y se determinó la actividad enzimática hacia S2366 (0,2 mM $\sim K_m$) en un lector de microplacas cinético. (■), sHAI-1B; (▼), sHAI-1B(R260A), (●), sHAI-1B(K401A), (●), sHAI-2.

10 FIG. 6 Inhibición de la activación de pro-HGF por formas mutantes de sHAI-1B y por sHAI-2. Se incubó pro-HGF marcado con ^{125}I (0,05 mg/ml) con hepsina (15 nM) e inhibidores durante 4 h a 37 °C. Se analizaron alícuotas de reacción como se ha descrito en la Figura 1. Estuvo presente hepsina a 15 nM en cada muestra. Los inhibidores estuvieron a 1 μ M. Carril 1, alícuota a t = 0; 2, sin inhibidor; 3, sHAI-1B; 4, sHAI-1B(R260A); 5, sHAI-1B(K401A); 6, sHAI-2. Se indican las posiciones de pro-HGF, cadena α de HGF y cadena β de HGF (doblete).

15 FIG. 7 Una realización de una secuencia de aminoácidos de hepsina humana nativa.

FIG. 8 Otra realización de una secuencia de aminoácidos de hepsina humana nativa.

20 Modos para llevar a cabo la invención

La invención proporciona procedimientos, composiciones, kits y artículos de fabricación que comprenden moduladores de la ruta de señalización de HGF/c-met, que incluyen procedimientos de uso de tales moduladores.

25 Detalles de estos procedimientos, composiciones, kits y artículos de fabricación se proporcionan en el presente documento.

Técnicas centrales

30 La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro de la experiencia de la materia. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía, tal como "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", segunda edición (Sambrook y col., 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R. I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel y col., eds., 1987, y actualizaciones periódicas); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis y col., ed., 1994); "A Practical Guide to Molecular Cloning" (Perbal Bernard V., 1988); "Phage Display: A Laboratory Manual" (Barbas y col., 2001).

Definiciones

40 El término "hepsina", como se usa en el presente documento, engloba polipéptidos de secuencia nativa, variantes de polipéptidos y fragmentos de un polipéptido de secuencia nativa y variantes de polipéptidos (que se definen adicionalmente en el presente documento) que es capaz de la escisión de pro-HGF de un modo similar a la hepsina de tipo salvaje. El polipéptido de hepsina descrito en el presente documento puede ser aquel que se aísla de varias fuentes, tales como de tipos de tejidos humanos o de otra fuente, o se prepara por procedimientos recombinantes o sintéticos. Los términos "hepsina", "polipéptido de hepsina", "enzima hepsina" y "proteína hepsina" también incluyen variantes de un polipéptido de hepsina como se desvela en el presente documento.

50 Una "polipéptido de hepsina de secuencia nativa" comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido de hepsina correspondiente derivado de la naturaleza. En una realización, un polipéptido de hepsina de secuencia nativa comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1 (véase la Figura 7). En una realización, un polipéptido de hepsina de secuencia nativa comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2 (véase la Figura 8). Tal polipéptido de hepsina de secuencia nativa puede aislarse de la naturaleza o puede producirse por medios recombinantes o sintéticos. El término "polipéptido de hepsina de secuencia nativa" engloba específicamente formas truncadas o secretadas que se producen naturalmente del polipéptido de hepsina específico (por ejemplo, una secuencia del dominio extracelular), formas variantes que se producen naturalmente (por ejemplo, formas alternativamente cortadas y empalmadas) y variantes alélicas que se producen naturalmente del polipéptido.

60 "Variante del polipéptido de hepsina", o variaciones de los mismos, significa un polipéptido de hepsina, generalmente un polipéptido de hepsina activo, como se define en el presente documento, que tiene al menos aproximadamente el 80 % de identidad de secuencias de aminoácidos con cualquiera de las secuencias de polipéptidos de hepsina de secuencia nativa que se desvelan en el presente documento. Tales variantes de polipéptidos de hepsina incluyen, por ejemplo, polipéptidos de hepsina en los que uno o más residuos de aminoácidos se añaden, o delecionan, en el extremo N o C de una secuencia de aminoácidos nativa. Generalmente, una variante de polipéptidos de hepsina tendrá al menos aproximadamente el 80 % de identidad de secuencias de aminoácidos, alternativamente al menos 65 aproximadamente el 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencias de aminoácidos con cualquiera de las secuencias de polipéptidos de hepsina de secuencia nativa que se desvelan en el presente documento.

96 %, 97 %, 98 % o el 99 % de identidad de secuencias de aminoácidos, con una secuencia de polipéptidos de hepsina de secuencia nativa como se ha desvelado en el presente documento. Generalmente, los polipéptidos de variantes de hepsina tienen al menos aproximadamente 10 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600 aminoácidos de longitud, o más. Opcionalmente, los polipéptidos de variantes de hepsina tendrán no más de una sustitución de aminoácidos conservativa en comparación con una secuencia de polipéptidos de hepsina nativa, alternativamente no más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones de aminoácidos conservativas en comparación con la secuencia de polipéptidos de hepsina nativa.

"Porcentaje (%) de identidad de secuencias de aminoácidos" con respecto a una secuencia de péptidos o polipéptidos se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia de péptidos o polipéptidos, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencias, y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencias. El alineamiento para los fines de determinar el porcentaje de identidad de secuencias de aminoácidos puede lograrse de diversas formas que están dentro de la habilidad en la materia, por ejemplo, usando software informático públicamente disponible tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Aquellos expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para medir el alineamiento, que incluyen cualquier algoritmo necesario para lograr el máximo alineamiento con respecto a la longitud completa de las secuencias que se comparan. Sin embargo, para los fines en el presente documento, los valores de % de identidad de secuencias de aminoácidos se generan usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2, como se describe en patente de EE.UU. nº 6.828.146.

El término "vector", como se usa en el presente documento, pretende referirse a una molécula de ácido nucleico que puede transportar otro ácido nucleico con el que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que se han ligado segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector de fago. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que segmentos de ADN adicionales pueden ligarse en el genoma viral. Ciertos vectores pueden replicarse autónomamente en una célula huésped en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores de mamífero episómicos). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episómicos) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula huésped, y así se replican junto con el genoma huésped. Además, ciertos vectores pueden dirigir la expresión de genes a los que están operativamente ligados. Tales vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión recombinantes" (o, simplemente, "vectores de expresión"). En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están frecuentemente en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" pueden usarse indistintamente ya que el plásmido es la forma más comúnmente usada de vector.

"Polinucleótido", o "ácido nucleico", como se usan indistintamente en el presente documento, se refieren a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluyen ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificados, y/o sus análogos, o cualquier sustrato que pueda incorporarse en un polímero por ADN o ARN polimerasa, o por una reacción sintética. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados tales como nucleótidos metilados y sus análogos. Si está presente, la modificación a la estructura del nucleótido puede conferirse antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede interrumpirse por componentes de no nucleótido. Un polinucleótido puede modificarse adicionalmente después de la síntesis, tal como por conjugación con una marca. Otros tipos de modificaciones incluyen, por ejemplo, "tapas", sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales con un análogo, modificaciones de internucleótidos tales como, por ejemplo, aquellas con enlaces sin carga (por ejemplo, fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosforamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforditioatos, etc.), aquellos que contienen restos laterales tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señal, ply-L-lisina, etc.), aquellos con intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), aquellos que contienen quelantes (por ejemplo, metales, metales radiactivos, boro, metales oxidativos, etc.), aquellos que contienen alquilantes, aquellos con enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos alfa-anoméricos, etc.), además de formas sin modificar del (de los) polinucleótido(s). Además, cualquiera de los grupos hidroxilo generalmente presente en los azúcares puede sustituirse, por ejemplo, con grupos fosfonato, grupos fosfato, protegerse por grupos protectores convencionales o activarse para preparar enlaces adicionales a nucleótidos adicionales, o pueden conjugarse con soportes sólidos o semisólidos. Los OH del extremo 5' y 3' pueden fosforilarse o sustituirse con aminas o restos de grupos de remate orgánicos de 1 a 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también pueden derivatizarse a grupos protectores convencionales. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de azúcares de ribosa o desoxirribosa que generalmente son conocidos en la técnica que incluyen, por ejemplo, 2'-O-metil-, 2'-O-alil-, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcares carbocíclicos, azúcares alfa-anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares de piranosa, azúcares de furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósidos abásicos tales como metilribósido. Uno o más enlaces fosfodiéster pueden sustituirse con grupos de enlace alternativos. Estos grupos de enlace alternativos incluyen, pero no se limitan a, realizaciones en las que el fosfato está sustituido con P(O)S

("tioato"), P(S)S ("ditioato"), (O)NR₂ ("amidato"), P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ ("formacetal"), en las que cada R o R' es independientemente H o alquilo (1-20 C) sustituido o sin sustituir que opcionalmente contiene un enlace éter (-O-), arilo, alqueno, cicloalquilo, cicloalqueno o araldilo. No todos los enlaces en un polinucleótido necesitan ser idénticos. La descripción precedente se aplica a todos los polinucleótidos citados en el presente documento, que incluyen ARN y ADN.

"Oligonucleótido", como se usa en el presente documento, generalmente se refiere a polinucleótidos generalmente monocatenarios, generalmente sintéticos, que tienen generalmente, pero no necesariamente, menos de aproximadamente 200 nucleótidos de longitud. Los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" no son mutuamente excluyentes. La descripción anterior para polinucleótidos es igualmente y completamente aplicable a oligonucleótidos.

El término "factor de crecimiento de hepatocitos" o "HGF", como se usa en el presente documento, se refiere, a menos que se indique específicamente o contextualmente de otro modo, a cualquier polipéptido de HGF nativo o variante (tanto si se produce naturalmente como sintético) que puede activar la ruta de señalización de HGF/c-met en condiciones que permitan que se produzca tal procedimiento. El término "HGF de tipo salvaje" generalmente se refiere a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una proteína HGF que se produce naturalmente. El término "secuencia de HGF de tipo salvaje" generalmente se refiere a una secuencia de aminoácidos encontrada en un HGF que se produce naturalmente.

Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se usan indistintamente en el sentido más amplio e incluyen anticuerpos monoclonales (para, por ejemplo, anticuerpos monoclonales de longitud completa o intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos en tanto que presenten la actividad biológica deseada) y también pueden incluir ciertos fragmentos de anticuerpos (como se describe en mayor detalle en el presente documento). Un anticuerpo puede ser quimérico, humano, humanizado y/o madurado por afinidad.

"Fragmentos de anticuerpos" comprenden sólo una parte de un anticuerpo intacto, en el que la porción retiene preferentemente al menos una, preferentemente la mayoría o todas, de las funciones normalmente asociadas a esa porción cuando está presente en un anticuerpo intacto. En una realización, un fragmento de anticuerpo comprende un sitio de unión a antígeno del anticuerpo intacto y, por tanto, retiene la capacidad para unirse al antígeno. En otra realización, un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, uno que comprende la región Fc, retiene al menos una de las funciones biológicas normalmente asociadas a la región Fc cuando está presente en un anticuerpo intacto, tal como la unión a FcRn, modulación de la semivida del anticuerpo, función de ADCC y unión al complemento. En una realización, un fragmento de anticuerpo es un anticuerpo monovalente que tiene una semivida *in vivo* sustancialmente similar a un anticuerpo intacto. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo tal puede comprender sobre el antígeno el brazo de unión ligado a una secuencia de Fc que puede conferir estabilidad *in vivo* al fragmento.

El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones que se producen naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único antígeno. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopes), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante sobre el antígeno.

Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpos particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntica a u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, además de fragmentos de tales anticuerpos, en tanto que presenten la actividad biológica deseada (patente de EE.UU. nº 4.816.567; y Morrison y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)).

Formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En general, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en la que los residuos de una región hipervariable del receptor están sustituidos con residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural (FR) de la inmunoglobulina humana son sustituidos con residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se hacen para refinar adicionalmente el rendimiento de los anticuerpos. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en el que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables se corresponden con los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado

también comprenderá opcionalmente al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones y col., *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann y col., *Nature* 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). Véanse también los siguientes artículos de revisión y referencias citadas en su interior: Vaswani y Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurlle y Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994).

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o ha sido producido usando cualquiera de las técnicas para producir anticuerpos humanos como se ha desvelado en el presente documento. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos.

Un anticuerpo "madurado por afinidad" es uno con una o más alteraciones en una o más CDR del mismo que producen una mejora en la afinidad del anticuerpo por antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee aquella(s) alteración (alteraciones). Los anticuerpos madurados por afinidad preferidos tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares para el antígeno diana. Los anticuerpos madurados por afinidad se producen mediante procedimientos conocidos en la técnica. Marks y col. *Bio/Technology* 10:779-783 (1992) describe la maduración por afinidad por barajado de dominios VH y VL. La mutagénesis al azar de residuos de CDR y/o de regiones estructurales se describe por: Barbas y col. *Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994); Schier y col. *Gene* 169:147-155 (1995); Yelton y col. *J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson y col., *J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); y Hawkins y col., *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

Un anticuerpo "bloqueante" o un anticuerpo "antagonista" es uno que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno con el que se une. Anticuerpos bloqueantes preferidos o anticuerpos antagonistas inhiben sustancialmente o completamente la actividad biológica del antígeno.

Un "anticuerpo agonista", como se usa en el presente documento, es un anticuerpo que imita al menos una de las actividades funcionales de un polipéptido de interés.

Un "trastorno" es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con una sustancia/molécula o procedimiento de la invención. Éste incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas que incluyen aquellas afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Ejemplos no limitantes de trastornos que van a tratarse en el presente documento incluyen tumores malignos y benignos; no leucemias y tumores malignos linfoides; trastornos neuronales, de la glía, astrocíticos, hipotalámicos y otros glandulares, macrofágicos, epiteliales, del estroma y blastocélicos; y trastornos inflamatorios, inmunológicos y otros relacionados con la angiogénesis.

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

"Tumor", como se usa en el presente documento, se refiere a todo crecimiento y proliferación celular neoplásico, tanto maligno como benigno, y a todas las células y tejidos pre-cancerosos y cancerosos. Los términos "cáncer", "canceroso", "trastorno proliferativo de células", "trastorno proliferativo" y "tumor" no son mutuamente excluyentes como se denomina en el presente documento.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen la afección fisiológica en mamíferos que normalmente se caracteriza por crecimiento/proliferación celular no regulado. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma escamoso de pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma de endometrio o uterino, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello.

Como se usa en el presente documento, "tratamiento" se refiere a la intervención clínica en un intento por alterar el curso natural del individuo o célula que está tratándose, y puede realizarse tanto para la profilaxis como durante el curso de la patología clínica. Efectos del tratamiento deseables incluyen prevención de la manifestación o reaparición de enfermedad, alivio de síntomas, disminución de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, prevención de metástasis, disminución de la tasa de progresión de la enfermedad, mejora o paliación del estado de enfermedad y remisión o mejora del pronóstico. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se usan para retardar el desarrollo de una enfermedad o trastorno.

Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una sustancia/molécula de la invención, agonista o antagonista, puede variar según factores tales como el estado de enfermedad, edad, sexo y peso del individuo, y la capacidad de la sustancia/molécula de la invención, agonista o antagonista, para provocar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial de la sustancia/molécula de la invención, agonista o antagonista, es superado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado profiláctico deseado. Normalmente, pero no necesariamente, como una dosis profiláctica se usa en sujetos antes de o en un estadio temprano de enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será inferior a la cantidad terapéuticamente eficaz.

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

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento de cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y la ciclofosfamida CYTOXAN®; alquilsulfonatos tales como busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas tales como benzodopa, carbocouona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietileno fosforamida y trimetilolmelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapacona; lapacol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecan (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR®), acetilcamptotecina, escoplectina y 9-aminocamptotecina); briostatina; callistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos de adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiestatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalan, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos de enediína (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma 11 y caliqueamicina omega 11 (véase, por ejemplo, Angew. Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); dinemicina, que incluye dinemicina A; una esperamicina; además de cromóforo de neocarzinostatina y la cromoproteína relacionada cromóforos antibióticos de enediína), aclacinomisininas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinoflina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluyendo ADRIAMYCIN®, morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina, inyección de liposomas de HCl de doxorubicina (DOXIL®) y desoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, porfomicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos tales como metotrexato, gemcitabina (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capecitabina (XELODA®), una epotilona y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitioestano, testolactona; antiadrenérgicos tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; recuperador de ácido fólico tal como ácido frolínico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®), formulación de nanopartículas manipuladas con albúmina de paclitaxel (ABRAXANE™) y docetaxel (TAXOTERE®); clorambucilo; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina (VELBAN®); platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN®); oxaliplatino; leucovorina; vinorelbina (NAVELBINE®); novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; además de combinaciones de dos o más de los anteriores tales como CHOP, una

abreviatura para una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona, y FOLFOX, una abreviatura para una pauta de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovorina.

En esta definición también se incluyen agentes antihormonales que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de hormonas que pueden promover el crecimiento de cáncer, y están frecuentemente en forma de tratamiento sistémico, o del cuerpo completo. Pueden ser las propias hormonas. Ejemplos incluyen antiestrógenos y moduladores de receptores de estrógenos selectivos (SERM) que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo el tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno (EVISTA®), droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (FARESTON®); antiprogesteronas; reguladores por disminución de receptores de estrógenos (ERD); antagonistas de receptores de estrógenos como fulvestrant (FASLODEX®); agentes que funcionan para suprimir o cerrar los ovarios, por ejemplo, agonistas de la hormona liberadora de hormona leutinizante (LHRH) tales como acetato de leuprolida (LUPRON® y ELIGARD®), acetato de goserelina, acetato de buserelina y triptorelina; otros antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; e inhibidores de aromatasas que inhiben la enzima aromatasas, que regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales tales como, por ejemplo, 4(5)-imidazoles, aminoglutetimida, acetato de megestrol (MEGASE®), exemestano (AROMASIN®), formestano, fadrozol, vorozol (RIVISOR®), letrozol (FEMARA®) y anastrozol (ARIMIDEX®). Además, tal definición de agentes quimioterapéuticos incluye bisfosfonatos tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), etidronato (DIDROCAL®), NE-58095, ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®), alendronato (FOSAMAX®), pamidronato (AREDIA®), tiludronato (SKELID®) o risedronato (ACTONEL®); además de troxacitabina (un análogo de citosina de nucleósido de 1,3-dioxolano); oligonucleótidos antisentido, particularmente aquellos que inhiben la expresión de genes en las rutas de señalización implicadas en la proliferación celular anómala tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras y receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas tales como la vacuna THERATOPE® y vacunas de terapia génica, por ejemplo, la vacuna ALLOVECTIN®, la vacuna LEUVECTIN® y la vacuna VAXID®; inhibidor de la topoisomerasa 1 (LURTOTECAN®); rrmRH (por ejemplo, ABARELIX®); ditosilato de lapatinib (un inhibidor de moléculas pequeñas de tirosina cinasa dual ErbB-2 y EGFR también conocido como GW572016); inhibidores de la COX-2 tales como celecoxib (CELEBREX®); 4-(5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il) bencenosulfonamida; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

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

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

Composiciones y procedimientos de la invención

A. Anticuerpos

La presente invención se refiere a anticuerpos que encuentran uso en el presente documento como agentes terapéuticos y/o de diagnóstico. Anticuerpos a modo de ejemplo incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, biespecíficos y heteroconjugados.

1. Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales se producen preferentemente en animales por múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno relevante (especialmente cuando se usan péptidos sintéticos) con una proteína que es inmunogénica en las especies a inmunizar. Por ejemplo, el antígeno puede conjugarse con hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja usando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzoil-sulfosuccinimida (conjugación por residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (por

residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 , o $\text{R}^1 \text{N}=\text{C}=\text{NR}$ en la que R y R^1 son grupos alquilo diferentes.

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

2. Anticuerpos monoclonales

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

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

25 Las células de hibridoma así preparadas se siembran y se cultivan en un medio de cultivo adecuado, medio que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma sin fusionar parentales (también denominado componente de fusión). Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo selectivo para los hibridomas normalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), 30 sustancias que previenen el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Células de mieloma de componentes de fusión preferidos son aquellas que se fusionan eficientemente, soportan producción de alto nivel estable de anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son 35 sensibles a un medio selectivo que selecciona contra las células parentales sin fusionar. Líneas de células de mieloma preferidas son líneas de mieloma murino tales como aquellas derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles de the Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, EE.UU., y células SP-2 y derivados, por ejemplo, células X63-Ag8-653 disponibles de la Colección americana de cultivos tipo, Manassas, Virginia, EE.UU. Las líneas de células de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); y 40 Brodeur y col., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

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

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

Una vez se han identificado las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse por procedimientos de dilución limitante y cultivarse mediante 55 procedimientos convencionales (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pág. 59-103 (Academic Press, 1986)). Medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como tumores ascíticos en un animal, por ejemplo, por inyección i.p. de las células en ratones.

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

65 El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención se aísla y se secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos murinos). Las células de

5 hibridoma sirven de fuente preferida de tal ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión que entonces se transfectan en células huésped tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen de otra forma proteína de anticuerpo para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica el anticuerpo incluyen Skerra y col., Curr. Opin. in Immunol., 5:256-262 (1993) y Plückthun, Immunol. Revs, 130:151-188 (1992).

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

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

3. Anticuerpos humanos y humanizados

30 Los anticuerpos pueden comprender adicionalmente anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos) que contienen la secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural Fv de la inmunoglobulina humana están sustituidos con residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que ni se encuentran en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de CDR o de la región estructural importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos un dominio variable, y normalmente dos, correspondiéndose todas o sustancialmente todas las regiones CDR con las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá óptimamente al menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, normalmente la de una inmunoglobulina humana [Jones y col., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann y col., Nature, 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992)].

50 Los procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos son muy conocidos en la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él de una fuente que es no humana. Estos residuos no humanos de aminoácidos se denominan frecuentemente en lo sucesivo residuos "importados", que se toman normalmente de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores [Jones y col., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann y col., Nature, 332:323-327 (1968); Verhoeyen y col., Science, 239:1534-1536 (1998)] sustituyendo CDR de roedor o secuencias de CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de EE.UU. nº 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR están sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

60 La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que van a usarse en la producción de anticuerpos humanizados puede ser importante para reducir la antigenicidad y respuesta HAMA (anticuerpo anti-ratón humano) cuando el anticuerpo está previsto para uso terapéutico humano. Según el llamado procedimiento "de mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba contra la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humano conocido. La secuencia del dominio V humana que está más próxima a la del roedor es identificada y la región estructural humana (FR) en su interior es aceptada para el anticuerpo

humanizado (Sims y col. (1993) J. Immunol. 151:2296; Chothia y col. (1987) J. Mol. Biol. 196:901 (1997)). Otro procedimiento usa una región estructural particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. La misma región estructural puede usarse para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta y col., J. Immunol. 151:2623 (1993)).

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

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

Como una alternativa a la humanización pueden generarse anticuerpos humanos. Por ejemplo, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que tras la inmunización pueden producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo (J_H) en ratones quiméricos y mutantes en la línea germinal produce la inhibición completa de la producción de anticuerpo endógeno. La transferencia de la matriz de genes de inmunoglobulina de la línea germinal en tales ratones mutantes en la línea germinal producirá la producción de anticuerpos humanos tras la exposición a antígeno. Véanse, por ejemplo, Jakobovits y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits y col., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggemann y col., Year in Immuno. 7:33 (1993); las patentes de EE.UU. n° 5.545.806, 5.569.825, 5.591.669 (todas de GenPharm); 5.545.807; y el documento WO 97/17852.

Alternativamente, la tecnología de expresión en fago (McCafferty y col., Nature 348, 552-553 [1990]) puede usarse para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro* a partir de repertorios de genes del dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes sin inmunizar. Según esta técnica, los genes del dominio V de anticuerpo se clonan en marco en un gen de la proteína de la cubierta tanto principal como minoritario de un bacteriófago filamentoso tal como M13 o fd, y se muestran como fragmentos funcionales de anticuerpos sobre la superficie de la partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenaria del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también producen la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta esas propiedades. Por tanto, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. Las muestras de fago pueden realizarse en varias formas, revisadas en, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3, 564-571 (1993). Pueden usarse varias fuentes de segmentos de genes de V para la expresión en fago. Clackson y col., Nature 352, 624-628 (1991) aislaron una matriz diferente de anticuerpos de anti-oxazolona a partir de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes de V derivados de los bazos de ratones inmunizados. Puede construirse un repertorio de genes V de donantes humanos sin inmunizar y los anticuerpos con respecto a una matriz diferente de antígenos (incluyendo autoantígenos) pueden aislarse esencialmente siguiendo las técnicas descritas por Marks y col., J. Mol. Biol. 222, 581-597 (1991), o Griffith y col., EMBO J. 12, 725-734 (1993). Véase, por tanto, las patentes de EE.UU. n° 5.565.332 y 5.573.905.

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

4. Fragmentos de anticuerpos

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

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaron por digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto y col., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); y Brennan y col., Science, 229:81 (1985)). Sin

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

5. Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión por al menos dos epítopos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos a modo de ejemplo pueden unirse a dos epítopos diferentes de hepsina, HGF y/o complejo de hepsina:HGF como se describe en el presente documento. Otros de tales anticuerpos pueden combinar un sitio de unión sobre estas entidades con un sitio de unión para otro polipéptido. Alternativamente, un brazo de anticuerpo puede combinarse con un brazo que se une a una molécula desencadenante sobre un leucocito tal como una molécula receptora de linfocitos T (por ejemplo, CD3), o receptores de Fc para IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16), de manera que centren y localicen mecanismos de defensa celular para la célula que expresa y/o de unión a hepsina y/o HGF. Los anticuerpos biespecíficos también pueden usarse para localizar agentes citotóxicos para células que expresan y/o se unen a hepsina, HGF y/o complejo de hepsina:HGF. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a polipéptido y un brazo que se une al agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti-interferón-α, alcaloide de la vinca, cadena A de ricina, metrotrexato o hapteno de isótopo radiactivo). Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

El documento WO 96/16673 describe un anticuerpo anti-ErbB2/anti-FcγRIII biespecífico y la patente de EE.UU. n° 5.837.234 desvela un anticuerpo anti-ErbB2/anti-FcγRI biespecífico. Un anticuerpo anti-ErbB2/Fcα biespecífico se muestra en el documento WO98/02463. La patente de EE.UU. n° 5.821.337 enseña un anticuerpo anti-ErbB2/anti-CD3 biespecífico.

Se conocen en la técnica procedimientos de producción de anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina en los que las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Milstein y col., Nature 305:537-539 (1983)). Debido al surtido aleatorio de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una posible mezcla de 10 moléculas de anticuerpos diferentes, de las que sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se hace normalmente por etapas de cromatografía de afinidad, es bastante embarazosa, y los rendimientos de producto son bajos. Procedimientos similares se desvelan en el documento WO 93/08829 y en Traunecker y col., EMBO J., 10:3655-3659 (1991).

Según un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios que combinan anticuerpo-antígeno) están fusionados a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. Preferiblemente, la fusión es con un dominio constante de la cadena pesada de Ig que comprende al menos parte de las regiones bisagra, C_H2 y C_H3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (C_H1) que contiene el sitio necesario para la unión a cadena ligera presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se co-transfectan en una célula huésped adecuada. Esto proporciona una gran flexibilidad en el ajuste de proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptidos en realizaciones en las que relaciones desiguales de las tres cadenas de polipéptidos usadas en la construcción proporcionan el rendimiento óptimo del anticuerpo biespecífico deseado. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas de polipéptidos en un único vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptidos en relaciones iguales produzca altos rendimientos o cuando las relaciones no tengan efecto significativo sobre el rendimiento de la combinación de cadenas deseada.

En una realización preferida de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos por una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se encontró que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado a partir de

combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una forma fácil de separación. Esta solución se desvela en el documento WO 94/04690. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh y col., *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

5 Según otro enfoque descrito en la patente de EE.UU. nº 5.731.168, la superficie de separación entre un par de moléculas de anticuerpos puede manipularse para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo celular recombinante. La superficie de separación preferida comprende al menos una parte del dominio C_H3. En este procedimiento, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeños de la superficie de separación de la primera molécula de anticuerpo están sustituidas con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Las "cavidades" de compensación de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) lateral(es) grande(s) se crean sobre la superficie de separación de la segunda molécula de anticuerpo sustituyendo las cadenas laterales de aminoácidos grandes por más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento del heterodímero con respecto a otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

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

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

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

55 Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos trispecíficos. Tutt y col., *J. Immunol.* 147:60 (1991).

6. Anticuerpos heteroconjugados

60 Los anticuerpos heteroconjugado también están dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos por dos anticuerpos covalentemente unidos. Tales anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para elegir como diana células del sistema inmunitario para células no deseadas [patente de EE.UU. nº 4.676.980] y para el tratamiento de infección por el VIH [documentos WO 91/00360, WO 92/00373 y EP 03089]. Se contempla que los anticuerpos puedan prepararse *in vitro* usando procedimientos conocidos en la química de proteínas sintéticas, que incluyen aquellos que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, las

inmunotoxinas pueden construirse usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Ejemplos de reactivos adecuados para este fin incluyen iminotiolato y 4-mercaptobutirimidato de metilo y los desvelados, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n° 4.676.980.

5 7. Anticuerpos multivalentes

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

8. Ingeniería de la función efectora

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

9. Inmunoconjugados

50 La divulgación en el presente documento también se refiere a inmunoconjugados o conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) que comprenden un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico tal como un agente quimioterapéutico, un fármaco, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas) o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

55 El uso de conjugados de anticuerpo-fármaco para la administración local de agentes citotóxicos o citostáticos, es decir, fármacos para destruir o inhibir células tumorales en el tratamiento de cáncer (Syrigos y Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614; Niculescu-Duvaz y Springer (1997) Adv. Drg. Del. Rev. 26:151-172; patente de EE.UU. 4.975.278) permite la administración elegida como diana del resto de fármaco a tumores, y la acumulación intracelular en los mismos, en los que la administración sistémica de estos agentes de fármaco sin conjugar puede producir niveles inaceptables de toxicidad para células normales, además de las células tumorales que se busca eliminar (Baldwin y col., (1986) Lancet pp. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review" en Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications, A. Pinchera y col. (ed.s), pág. 475-506). Así se busca la máxima eficacia con la mínima toxicidad. Se ha informado de tanto anticuerpos policlonales como de anticuerpos monoclonales útiles en estas estrategias (Rowland y col., (1986) Cancer Immunol. Immunother., 21:183-87). Los fármacos usados en estos procedimientos incluyen daunomicina,

doxorubicina, metrotrexato y vindesina (Rowland y col., (1986), arriba). Las toxinas usadas en conjugados de anticuerpo-toxina incluyen toxinas bacterianas tales como toxina diftérica, toxinas de plantas tales como ricina, toxinas de moléculas pequeñas tales como geldanamicina (Mandler y col. (2000) Jour. of the Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581; Mandler y col. (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028; Mandler y col. (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791), maitansinoides (EP 1391213; Liu y col., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623) y caliqueamicina (Lode y col. (1998) Cancer Res. 58:2928; Hinman y col. (1993) Cancer Res. 53:3336-3342). Las toxinas pueden efectuar sus efectos citotóxicos y citostáticos por mecanismos que incluyen unión a tubulina, unión a ADN o inhibición de topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos activos cuando se conjugan con anticuerpos grandes o ligandos de receptores de proteínas.

ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetan, Biogen/Idec) es un conjugado de anticuerpo-radioisótopo compuesto por un anticuerpo monoclonal IgG1 kappa murino dirigido contra el antígeno CD20 encontrado sobre la superficie de linfocitos B normales y malignos y radioisótopo ^{111}In o ^{90}Y unido por un quelante de conector de tiourea (Wiseman y col. (2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7):766-77; Wiseman y col. (2002) Blood 99(12):4336-42; Witzig y col. (2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63; Witzig y col. (2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69). Aunque ZEVALIN tiene actividad contra linfoma no Hodgkin (LNH) de linfocitos B, la administración produce citopenias graves y prolongadas en la mayoría de los pacientes. MYLOTARG™ (gemtuzumab ozogamicina, Wyeth Pharmaceuticals), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto por un anticuerpo huCD33 ligado a caliqueamicina, fue aprobado en 2000 para el tratamiento de leucemia mieloide aguda mediante inyección (Drugs of the Future (2000) 25(7):686; patentes de EE.UU. n° 4.970.198; 5.079.233; 5.585.089; 5.606.040; 5.693.762; 5.739.116; 5.767.285; 5.773.001). Cantuzumab mertansina (Immunogen, Inc.), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto por el anticuerpo huC242 ligado por el conector de disulfuro SPP al resto de fármacos maitansinoides, DM1, está avanzando a ensayos de fase II para el tratamiento de cánceres que expresan CanAg, tales como colon, pancreático, gástrico y otros. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto por el anticuerpo monoclonal anti-antígeno prostático específico de membrana (PSMA) ligado al resto de fármacos maitansinoides, DM1, está en desarrollo para el posible tratamiento de tumores de próstata. Los péptidos de auristatina, auristatina E (AE) y monometilauristatina (MMAE), análogos sintéticos de la dolastatina, se conjugaron con anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específicos para Lewis Y en carcinomas) y cAC10 (específicos para CD30 en tumores malignos hematológicos) (Doronina y col. (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784) y están en desarrollo terapéutico.

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

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

Maitansina y maitansinoides

En una realización, un anticuerpo (longitud completa o fragmentos) se conjuga con una o más moléculas de maitansinoide.

Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de tubulina. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto del África oriental *Maytenus serrata* (patente de EE.UU. n° 3.896.111). Posteriormente se descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres de maitansinol C-3 (patente de EE.UU. n° 4.151.042). El maitansinol sintético y los derivados y análogos del mismo se desvelan, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n° 4.137.230; 4.248.870; 4.256.746; 4.260.608; 4.265.814; 4.294.757; 4.307.016; 4.308.268; 4.308.269; 4.309.428; 4.313.946; 4.315.929; 4.317.821; 4.322.348; 4.331.598; 4.361.650; 4.364.866; 4.424.219; 4.450.254; 4.362.663; y 4.371.533, cuyas divulgaciones se incorporan expresamente por el presente documento por referencia.

Conjugados de maitansinoide-anticuerpo

En un intento por mejorar su índice terapéutico, la maitansina y los maitansinoides se han conjugado con anticuerpos que se unen específicamente a antígenos de células tumorales. Los inmunoconjugados que contienen maitansinoides y su uso terapéutico se desvelan, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n° 5.208.020, 5.416.064 y la patente europea EP 0 425 235 B1, cuyas divulgaciones se incorporan expresamente en el presente documento por referencia. Liu y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) describieron inmunoconjugados que comprenden un maitansinoide designado DM1 ligado al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra cáncer colorrectal humano. Se encontró que el conjugado era altamente citotóxico hacia células de cáncer de colon cultivadas y mostró actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento tumoral *in vivo*. Chari y col., Cancer Research 52:127-131 (1992) describen inmunoconjugados en los que un maitansinoide se conjugó mediante un conector de disulfuro con el anticuerpo A7 murino que se une a un antígeno en líneas de células de cáncer de colon humano, o a otro anticuerpo monoclonal murino TA.1 que se une al oncogén HER-2/*neu*. La citotoxicidad del conjugado de TA.1-maitansinoide se probó *in vitro* en la línea celular de cáncer de mama humano SK-BR-3, que expresa 3×10^5 antígenos de superficie HER-2 por célula. El conjugado de fármaco alcanzó un grado de citotoxicidad similar al fármaco maitansinoide libre, que podría aumentarse aumentando el número de moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo. El conjugado de A7-maitansinoide mostró baja citotoxicidad sistémica en ratones.

Conjugados de anticuerpo-maitansinoide (inmunoconjugados)

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

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

Los conjugados del anticuerpo y el maitansinoide pueden prepararse usando varios agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activo (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Agentes de acoplamiento particularmente preferidos incluyen 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP) (Carlsson y col., Biochem. J. 173:723-737 [1978]) y 4-(2-piridiltio)pentanoato de N-succinimidilo (SPP) para proporcionar un enlace disulfuro.

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

Caliqueamicina

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

enormemente sus efectos citotóxicos.

Otros agentes citotóxicos

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

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

15 La presente invención contempla adicionalmente un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una endonucleasa de ADN tal como una desoxirribonucleasa; DNasa).

20 Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radiactivo. Están disponibles varios isótopos radiactivos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Ejemplos incluyen Al^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isótopos radiactivos de Lu. Si el conjugado se usa para detección, puede comprender un átomo radiactivo para estudios escintigráficos, por ejemplo, Tc^{99m} o I^{123} , o una marca de espín para la obtención de imágenes de resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como
25 obtención de imágenes de resonancia magnética, irm), tal como yodo-123 de nuevo, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Las radiomarcas u otras marcas pueden incorporarse en el conjugado de formas conocidas. Por ejemplo, el péptido puede biosintetizarse o puede sintetizarse por síntesis química de aminoácidos usando precursores de aminoácidos
30 adecuados que implican, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Marcas tales como Tc^{99m} o I^{123} , Re^{186} , Re^{188} e In^{111} pueden unirse por un residuo de cisteína en el péptido. Itrio-90 puede unirse por un residuo de lisina. El procedimiento IODOGEN (Fraker y col. (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57 puede usarse para incorporar yodo-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros procedimientos en detalle.

35 Los conjugados de anticuerpo y agente citotóxico pueden prepararse usando varios agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina puede prepararse como se describe en Vitetta y col., Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentriaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante a modo de ejemplo
45 para la conjugación de radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO94111026. El conector puede ser un "conector escindible" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede usarse un conector lábil de ácido, conector sensible a peptidasa, conector fotolábil, conector de dimetilo o conector que contiene disulfuro (Chari y col., Cancer Research 52:127-131 (1992); patente de EE.UU. nº 5.208.020).

50 Los compuestos contemplan expresamente, pero no se limitan a, ADC preparado con reactivos de conector cruzado: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB, y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que están comercialmente disponibles (por ejemplo, de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A). Véanse las páginas 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

55 PREPARACIÓN DE CONJUGADOS DE ANTICUERPO-FÁRMACO

En los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC), un anticuerpo (Ab) está conjugado con uno o más restos de fármaco (D), por ejemplo, aproximadamente 1 a aproximadamente 20 restos de fármaco por anticuerpo, mediante
60 un conector (L). El ADC de fórmula I puede prepararse por varias rutas empleando reacciones de química orgánica, condiciones y reactivos conocidos para aquellos expertos en la materia que incluyen: (1) reacción de un grupo nucleófilo de un anticuerpo con un reactivo de conector bivalente para formar Ab-L, mediante un enlace covalente, seguido de reacción con un resto de fármaco D; y (2) reacción de un grupo nucleófilo de un resto de fármaco con un reactivo de conector bivalente, para formar D-L, mediante un enlace covalente, seguido de reacción con el grupo
65 nucleófilo de un anticuerpo.

Ab-(L-D)_p I

Los grupos nucleófilos en anticuerpos incluyen, pero no se limitan a: (i) grupos amina del extremo N, (ii) grupos amina de la cadena lateral, por ejemplo, lisina, (iii) grupos tiol de la cadena lateral, por ejemplo, cisteína, y (iv) grupos hidroxilo o amino de azúcar en los que el anticuerpo está glucosilado. Los grupos amina, tiol e hidroxilo son nucleófilos y pueden reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en restos de conector y reactivos de conector que incluyen: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformiatos y haluros de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, grupos carboxilo y maleimida. Ciertos anticuerpos tienen disulfuros entre cadenas reducibles, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos pueden hacerse reactivos para la conjugación con reactivos de conector mediante tratamiento con un agente reductor tal como DTT (ditiotreitól). Por tanto, cada puente de cisteína formará teóricamente dos nucleófilos de tiol reactivos. Grupos nucleófilos adicionales pueden introducirse en anticuerpos mediante la reacción de lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) produciendo la conversión de una amina en un tiol.

Los conjugados de anticuerpo-fármaco también pueden producirse por modificación del anticuerpo para introducir restos electrófilos que pueden reaccionar con sustituyentes nucleófilos en el reactivo de conector o fármaco. Los azúcares de anticuerpos glucosilados pueden oxidarse, por ejemplo, con reactivos oxidantes de peryodato para formar grupos aldehído o cetona que pueden reaccionar con el grupo amina de reactivos de conector o restos de fármaco. Los grupos de base de Schiff de iminas resultantes pueden formar un enlace estable, o pueden reducirse, por ejemplo, por reactivos de borohidruro para formar enlaces de amina estables. En una realización, la reacción de la porción de hidrato de carbono de un anticuerpo glucosilado con tanto galactosa oxidasa como meta-peryodato de sodio puede dar grupos carbonilo (aldehído y cetona) en la proteína que pueden reaccionar con grupos apropiados en el fármaco (Hermanson, Bioconjugate Techniques). En otra realización, las proteínas que contienen residuos de serina o treonina del extremo N pueden reaccionar con meta-peryodato de sodio, produciendo la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; documento US 5362852). Tal aldehído puede hacerse reaccionar con un resto de fármaco o nucleófilo conector.

Asimismo, los grupos nucleófilos en un resto de fármaco incluyen, pero no se limitan a: grupos amina, tiol, hidroxilo, hidrazida, oxima, hidracina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidracina y arilhidrazida que pueden reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en restos de conector y reactivos de conector que incluyen: (i) ésteres activos tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformiatos y haluros de ácido; (ii) haluros de alquilo y bencilo tales como haloacetamidas; (iii) aldehídos, cetonas, grupos carboxilo y maleimida.

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

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

45 10. Inmunoliposomas

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

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

B. Oligopéptidos de unión

Los oligopéptidos de unión son oligopéptidos que se unen, preferentemente específicamente, a hepsina, HGF y/o complejo de hepsina: HGF, como se describe en el presente documento. Los oligopéptidos de unión pueden sintetizarse químicamente usando metodología de síntesis de oligopéptidos conocida o pueden prepararse y purificarse usando tecnología recombinante. Los oligopéptidos de unión tienen normalmente al menos aproximadamente 5 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 aminoácidos de longitud o más, en los que tales oligopéptidos pueden unirse, preferentemente específicamente, a un polipéptido como se describe en el presente documento. Los oligopéptidos de unión pueden identificarse sin experimentación adicional usando técnicas muy conocidas. A este respecto se observa que técnicas para cribar bibliotecas de oligopéptido para oligopéptidos que pueden unirse específicamente a una diana polipéptido son muy conocidas en la técnica (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 5.556.762, 5.750.373, 4.708.871, 4.833.092, 5.223.409, 5.403.484, 5.571.689, 5.663.143; publicaciones PCR nº WO 84/03506 y WO84/03564; Geysen y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3998-4002 (1984); Geysen y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:178-182 (1985); Geysen y col., en Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986); Geysen y col., J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987); Schoofs y col., J. Immunol., 140:611-616 (1988), Cwirla, S. E. y col. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378; Lowman, H.B. y col. (1991) Biochemistry, 30:10832; Clackson, T. y col. (1991) Nature, 352: 624; Marks, J. D. y col. (1991), J. Mol. Biol., 222:581; Kang, A.S. y col. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363, y Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668).

A este respecto, la expresión en bacteriófago (fago) es una técnica muy conocida que permite cribar grandes bibliotecas de oligopéptidos para identificar miembro(s) de aquellas bibliotecas que pueden unirse específicamente a una diana de polipéptido. La expresión en fago es una técnica por la que polipéptidos variantes son expresados como proteínas de fusión para la proteína de la envuelta sobre la superficie de partículas de bacteriófago (Scott, J.K. y Smith, G. P. (1990) Science 249: 386). La utilidad de la expresión en fago se basa en el hecho de que grandes bibliotecas de variantes de proteína selectivamente aleatorizadas (o ADNc clonados aleatoriamente) pueden clasificarse rápidamente y eficientemente para aquellas secuencias que se unen a una molécula diana con afinidad alta. La expresión de bibliotecas de péptido (Cwirla, S. E. y col. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378) o proteína (Lowman, H.B. y col. (1991) Biochemistry, 30:10832; Clackson, T. y col. (1991) Nature, 352: 624; Marks, J. D. y col. (1991), J. Mol. Biol., 222:581; Kang, A.S. y col. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363) en fago se ha usado para cribar millones de polipéptidos o oligopéptidos para aquellos con propiedades específicas de unión (Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668). La clasificación de bibliotecas de fagos de mutantes al azar requiere una estrategia para construir y propagar un gran número de variantes, un procedimiento para la purificación por afinidad usando el receptor diana y un medio de evaluación de los resultados de los enriquecimientos de unión. Patentes de EE.UU. nº 5.223.409, 5.403.484, 5.571.689 y 5.663.143.

Aunque la mayoría de los procedimientos de expresión en fago han usado fago filamentoso, también se conocen sistemas de expresión en fago lambda (documentos WO95/34683; U.S. 5.627.024), sistemas de expresión en fago T4 (Ren y col., Gene, 215: 439 (1998); Zhu y col., Cancer Research, 58(15): 3209-3214 (1998); Jiang y col., Infection & Immunity, 65(11): 4770-4777 (1997); Ren y col., Gene, 195(2):303-311 (1997); Ren, Protein Sci., 5: 1833 (1996); Efimov y col., Virus Genes, 10: 173 (1995)) y sistemas de expresión en fago T7 (Smith y Scott, Methods in Enzymology, 217: 228-257 (1993); U.S. 5.766.905).

Ahora se han desarrollado muchas otras mejoras y variaciones del concepto básico de la expresión en fago. Estas mejoras potencian la capacidad de sistemas de expresión para cribar bibliotecas de péptido para la unión a moléculas diana seleccionadas y para expresar proteínas funcionales con el potencial de cribar estas proteínas para propiedades deseadas. Se han desarrollado dispositivos de reacción combinatorios para las reacciones de expresión en fago (documento WO 98/14277) y se han usado bibliotecas de expresión en fago para analizar y controlar interacciones bimoleculares (documentos WO 98/20169; WO 98/20159) y propiedades de péptidos helicoidales obligados (documento WO 98/20036). El documento WO 97/35196 describe un procedimiento de aislamiento de un ligando de afinidad en el que una biblioteca de expresión en fago se pone en contacto con una solución en la que el ligando se unirá a una molécula diana y una segunda solución en la que el ligando de afinidad no se unirá a la molécula diana, para aislar selectivamente ligandos de unión. El documento WO 97/46251 describe un procedimiento de ciclos de selección de una biblioteca de expresión en fago aleatoria con un anticuerpo purificado por afinidad y luego aislamiento del fago de unión, seguido de un procedimiento de microadsorción usando pocillos de microplaca para aislar fago de unión de alta afinidad. También se ha informado del uso de proteína A de *Staphylococcus aureus* como marca de afinidad (Li y col. (1998) Mol Biotech., 9:187). El documento WO 97/47314 describe el uso de bibliotecas de sustracción de sustrato para distinguir especificidades de enzima usando una biblioteca combinatoria que puede ser una biblioteca de expresión en fago. Un procedimiento para seleccionar enzimas adecuadas para su uso en detergentes usando expresión en fago se describe en el documento WO 97/09446. Procedimientos adicionales de selección de proteínas de unión específica se describen en las patentes de EE.UU. nº 5.498.538, 5.432.018, y el documento WO 98/15833.

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

5 C. Moléculas pequeñas de unión

Las moléculas pequeñas de unión son preferentemente moléculas orgánicas distintas de oligopéptidos o anticuerpos como se definen en el presente documento que se unen, preferentemente específicamente, a hepsina, HGF y/o complejo de hepsina:HGF como se describe en el presente documento. Las moléculas pequeñas orgánicas de unión pueden identificarse y sintetizarse químicamente usando metodología conocida (véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT nº WO00/00823 y WO00/39585). Las moléculas pequeñas orgánicas de unión tienen normalmente menos de aproximadamente 2000 dalton de tamaño, alternativamente menos de aproximadamente 1500, 750, 500, 250 o 200 dalton de tamaño, en las que tales moléculas pequeñas orgánicas que pueden unirse, preferentemente específicamente, a un polipéptido como se describe en el presente documento pueden identificarse sin experimentación adicional usando técnicas muy conocidas. A este respecto, se observa que técnicas para cribar bibliotecas de moléculas orgánicas para moléculas que pueden unirse a una diana de polipéptido son muy conocidas en la técnica (véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT nº WO00/00823 y WO00/39585). Las moléculas pequeñas orgánicas de unión pueden ser, por ejemplo, aldehídos, cetonas, oximas, hidrazonas, semicarbazonas, carbazidas, aminas primarias, aminas secundarias, aminas terciarias, hidracinas N-sustituídas, hidrazidas, alcoholes, éteres, tioles, tioéteres, disulfuros, ácidos carboxílicos, ésteres, amidas, ureas, carbamatos, carbonatos, cetales, tiocetales, acetales, tioacetales, haluros de arilo, sulfonatos de arilo, haluros de alquilo, sulfonatos de alquilo, compuestos aromáticos, compuestos heterocíclicos, anilinas, alquenos, alquinos, dioles, aminoalcoholes, oxazolidinas, oxazolininas, tiazolidinas, tiazolininas, enaminas, sulfonamidas, epóxidos, aziridinas, isocianatos, cloruros de sulfonilo, compuestos diazónicos, cloruros de ácido o similares.

25 D. Cribado de anticuerpos, oligopéptidos de unión y moléculas pequeñas de unión con las propiedades deseadas

Anteriormente se han descrito técnicas para generar anticuerpos, oligopéptidos y moléculas pequeñas. Pueden seleccionarse adicionalmente anticuerpos, oligopéptidos u otras moléculas pequeñas con ciertas características biológicas, según se desee.

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

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

anticuerpos, oligopéptidos de unión o moléculas pequeñas orgánicas de unión que inducen niveles de muerte celular estadísticamente significativos como se ha determinado por captación de YP pueden seleccionarse como anticuerpos, oligopéptidos de unión o moléculas pequeñas orgánicas de unión inductores de muerte celular.

- 5 Para cribar anticuerpos, oligopéptidos u otras moléculas pequeñas orgánicas que se unen a un epítipo sobre un polipéptido unido por un anticuerpo de interés puede realizarse un ensayo de bloqueo cruzado rutinario tal como el descrito en Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Este ensayo puede usarse para determinar si un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula pequeña orgánica de prueba se une al mismo sitio o epítipo que un anticuerpo conocido. Alternativamente o adicionalmente, el mapeo de epítipos
10 puede realizarse mediante procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la secuencia de anticuerpos puede mutagenizarse tal como por cribado con alanina para identificar residuos de contacto. El anticuerpo mutante se prueba inicialmente para la unión con anticuerpo policlonal para garantizar el plegamiento apropiado. En un procedimiento diferente, los péptidos correspondientes a diferentes regiones de un polipéptido pueden usarse en ensayos de competencia con los anticuerpos de prueba o con un anticuerpo de prueba y un anticuerpo con epítipo
15 sin caracterizar o conocido.

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

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

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

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

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

F. Variantes de anticuerpos

- 50 Además de los anticuerpos descritos en el presente documento, se contempla que puedan prepararse variantes de anticuerpos. Las variantes de anticuerpos pueden prepararse introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN codificante, y/o mediante síntesis del anticuerpo deseado. Aquellos expertos en la materia apreciarán que los cambios de aminoácidos pueden alterar procesos postraduccionales del anticuerpo tales como cambiar el número o
55 la posición de sitios de glucosilación o alterar las características de anclaje a la membrana.

- Las variaciones en los anticuerpos descritas en el presente documento pueden hacerse, por ejemplo, usando cualquiera de las técnicas y pautas para mutaciones conservativas y no conservativas expuestas, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 5.364.934. Las variaciones pueden ser una sustitución, delección o inserción de uno o más
60 codones que codifican el anticuerpo que produce un cambio en la secuencia de aminoácidos en comparación con el anticuerpo o polipéptido de secuencia nativa. Opcionalmente, la variación es mediante sustitución de al menos un aminoácido con cualquier otro aminoácido en uno o más de los dominios del anticuerpo. La orientación para determinar qué residuo de aminoácido puede insertarse, sustituirse o deleccionarse sin afectar adversamente la actividad deseada puede encontrarse comparando la secuencia del anticuerpo con las de moléculas de proteínas
65 conocidas homólogas y minimizando el número de cambios de secuencias de aminoácidos hechos en regiones de alta homología. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser el resultado de sustituir un aminoácido por otro

aminoácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas similares tales como la sustitución de una leucina por una serina, es decir, sustituciones de aminoácidos conservativos. Las inserciones o deleciones puede estar opcionalmente en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida puede determinarse haciendo sistemáticamente inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia y probando las variantes resultantes para la actividad mostrada por la secuencia parental.

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

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

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

Residuo original	Sustitución a modo de ejemplo	Sustituciones preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Las modificaciones sustanciales en la función o identidad inmunológica del anticuerpo o polipéptido se llevan a cabo seleccionando sustituciones que se diferencian significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto de polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una hoja o conformación helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) la voluminosidad de la cadena lateral. Los aminoácidos pueden agruparse según similitudes en las propiedades de sus cadenas laterales (en A. L. Lehninger, en Biochemistry, segunda ed., pág. 73-75, Worth Publishers, New York (1975)):

- (1) no polares: Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)
- (2) polares no cargados: Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)
- (3) ácidos: Asp (D), Glu (E)
- (4) básicos: Lys (K), Arg (R), His(H)

Alternativamente, los residuos que se producen naturalmente pueden dividirse en grupos basados en propiedades de las cadenas laterales comunes:

- (1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) hidrófilos neutros: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) ácidos: Asp, Glu;
- (4) básicos: His, Lys, Arg;
- (5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gly, Pro;
- (6) aromáticos: Trp, Tyr, Phe.

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

Las variaciones pueden hacerse usando procedimientos conocidos en la técnica tales como mutagénesis mediada por oligonucleótidos (dirigida a sitio), exploración con alanina y mutagénesis por PCR. La mutagénesis dirigida a sitio [Carter y col., Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986); Zoller y col., Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987)], la mutagénesis por casete [Wells y col., Gene, 34:315 (1985)], la mutagénesis con selección de restricción [Wells y col., Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 (1986)] u otras técnicas conocidas pueden realizarse en el ADN clonado para producir el ADN de la variante de anticuerpo o de polipéptido.

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

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

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

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

G. Modificaciones de anticuerpos y polipéptidos

Las modificaciones covalentes de anticuerpos y polipéptidos están incluidas dentro del alcance de la presente invención. Un tipo de modificación covalente incluye hacer reaccionar residuos de aminoácidos elegidos como diana de un anticuerpo o polipéptido con un agente derivatizante orgánico que puede reaccionar con cadenas laterales

seleccionadas o los residuos del extremo N o C del anticuerpo o polipéptido. La derivatización con agentes bifuncionales es útil, por ejemplo, para reticular anticuerpo o polipéptido con una matriz o superficie de soporte insoluble en agua para su uso en el procedimiento para purificar anticuerpos, y viceversa. Agentes de reticulación comúnmente usados incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, que incluye ésteres de disuccinimidilo tales como propionato de 3,3'-ditiobis(succinimidilo), maleimidias bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano y agentes tales como 3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato de metilo.

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

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

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

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

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

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

Otro tipo de modificación covalente de anticuerpo o polipéptido comprende ligar el anticuerpo o polipéptido a uno de varios polímeros no proteináceos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxialquilenos, en el modo expuesto en las patentes de EE.UU. nº 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337. El anticuerpo o polipéptido también puede atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial (por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente), en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Tales técnicas se desvelan en Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 16ª edición, Oslo, A., Ed., (1980).

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

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

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

H. Preparación de anticuerpos y polipéptidos

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

1. Aislamiento de ADN que codifica anticuerpo o polipéptido

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

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

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

65

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

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

2. Selección y transformación de células huésped

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

Los procedimientos de transfección de células eucariotas y transformación de células procariotas son conocidos para el experto general, por ejemplo, CaCl_2 , CaPO_4 , mediados por liposomas y electroporación. Dependiendo de la célula huésped usada, la transformación se realiza usando técnicas habituales apropiadas para tales células. El tratamiento con calcio que emplea cloruro de calcio, como se describe en Sambrook y col., arriba, o la electroporación se usan generalmente para procariotas. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se usa para la transformación de ciertas células vegetales como se describe por Shaw y col., Gene, 23:315 (1983) y el documento WO 89/05859 publicado el 29 de junio de 1989. Para células de mamífero sin tales paredes celulares puede emplearse el procedimiento de precipitación con fosfato de calcio de Graham y van der Eb, Virology, 52:456-457 (1978). Los aspectos generales de las transfecciones del sistema huésped de células de mamífero se han descrito en la patente de EE.UU. nº 4.399.216. Las transformaciones en levadura se llevan a cabo normalmente según el procedimiento de Van Solingen y col., J. Bact., 130:946 (1977) y Hsiao y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76:3829 (1979). Sin embargo, también pueden usarse otros procedimientos para introducir ADN en células tales como por microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplastos bacterianos con células intactas o policones, por ejemplo, polibreno, poliornitina. Para diversas técnicas para transformar células de mamífero véanse Keown y col., Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990) y Mansour y col., Nature, 336:348-352 (1988).

Células huésped adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores en el presente documento incluyen células procariotas, de levadura o de eucariotas superiores. Procariotas adecuados incluyen, pero no se limitan a, eubacterias tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, Enterobacteriaceae tales como *E. coli*. Diversas cepas de *E. coli* están públicamente disponibles tales como la cepa MM294 de *E. coli* K12 (ATCC 31,446); X1776 de *E. coli* (ATCC 31,537); cepa W3110 de *E. coli* (ATCC 27,325) y K5 772 (ATCC 53.635). Otras células huésped procariotas adecuadas incluyen Enterobacteriaceae tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescens* y *Shigella*, además de *Bacilli* tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, 41P de *B. licheniformis* desvelada en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Estos ejemplos son ilustrativos en vez de limitantes. La cepa W3110 es un huésped o huésped parental particularmente preferido ya que es una cepa huésped común para fermentaciones de productos de ADN recombinante. Preferentemente, la célula huésped secreta cantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la cepa W3110 puede modificarse para efectuar una mutación genética en los genes que codifican proteínas endógenas para el huésped, incluyendo ejemplos de tales huéspedes la cepa 1A2 de *E. coli* W3110, que tiene el genotipo completo *tonA*; cepa 9E4 de *E. coli* W3110, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3*; cepa 27C7 de *E. coli* W3110 (ATCC 55.244), que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT kan^r*; cepa 37D6 de *E. coli* W3110, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT rbs7 ilvG kan^r*; cepa 40B4 de *E. coli* W3110, que es la cepa 37D6 con un mutación por delección *degP* resistente a no kanamicina; y una cepa de *E. coli* que tiene proteasa periplásmica mutante desvelada en la patente de EE.UU. 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 polimerasa de ácido nucleico.

El anticuerpo de longitud completa, fragmentos de anticuerpos y proteínas de fusión de anticuerpos pueden producirse en bacterias, en particular cuando no se necesitan glucosilación y función efectora de Fc, tal como cuando el anticuerpo terapéutico está conjugado con un agente citotóxico (por ejemplo, una toxina) y el inmunoconjugado muestra por sí mismo eficacia en la destrucción de células tumorales. Los anticuerpos de longitud completa tienen mayor semivida en circulación. La producción en *E. coli* es más rápida y más rentable. Para la expresión de fragmentos de anticuerpos y polipéptidos en bacterias véanse, por ejemplo, los documentos U.S.

5.648.237 (Carter y col.), U.S. 5.789.199 (Joly y col.) y U.S. 5.840.523 (Simmons y col.) que describen la región de iniciación de la traducción (TIR) y secuencias señal para optimizar la expresión y secreción, incorporadas estas patentes en el presente documento por referencia. Después de la expresión, el anticuerpo se aísla de la pasta de células de *E. coli* en una fracción soluble y puede purificarse mediante, por ejemplo, una columna de proteína A o G dependiendo del isotipo. La purificación final puede llevarse a cabo similar al procedimiento para purificar anticuerpo expresado, por ejemplo, en células CHO.

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

Células huésped adecuadas para la expresión del anticuerpo o polipéptido glucosilado se derivan de organismos multicelulares. Ejemplos de células de invertebrados incluyen células de insecto tales como *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9, además de células vegetales tales como cultivos celulares de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco. Se han identificado numerosas cepas baculovirales y variantes y células huésped de insecto permisivas correspondientes de huéspedes tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Varias cepas virales para transfección está públicamente disponible, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y tales virus pueden usarse como virus en el presente documento según la presente invención, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

Sin embargo, el mayor interés ha sido en células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo de tejido) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Ejemplos de líneas celulares huésped de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón de embrión humano (células 293 o 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham y col., J. Gen. Virol. 36:59 (1977)); células de riñón de bebés de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-25 (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 de cuello uterino humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather y col., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

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

3. Selección y uso de un vector replicable

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

componentes emplea técnicas de ligación habituales que son conocidas para el experto.

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

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

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

Un ejemplo de marcadores de selección adecuados para células de mamífero son aquellos que permiten la identificación de células competentes para recibir el ácido nucleico que codifica el anticuerpo o polipéptido tal como DHFR o timidina cinasa. Una célula huésped apropiada cuando se emplea DHFR natural es la línea celular CHO deficiente en actividad de DHFR, preparada y propagada como se describe por Urlaub y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980). Un gen de selección adecuado para uso en levadura es el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura YRp7 [Stinchcomb y col., Nature, 282:39 (1979); Kingsman y col., Gene, 7:141 (1979); Tschemper y col., Gene, 10:157 (1980)]. El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de capacidad para crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC nº 44076 o PEP4-1 [Jones, Genetics, 85:12 (1977)].

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

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

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

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

sistemas de células huésped.

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

Los vectores de expresión usados en células huésped eucariotas (células de levadura, de hongo, de insecto, vegetales, animales, humanas o nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Tales secuencias están comúnmente disponibles a partir de regiones sin traducir en 5' y, ocasionalmente 3', de ADN o ADNc de eucariota o viral. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción sin traducir del ARNm que codifica anticuerpo o polipéptido.

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

4. Cultivo de células huésped

Las células huésped usadas para producir el anticuerpo o polipéptido pueden cultivarse en varios medios. Para cultivar las células huésped son adecuados medios de cultivo comercialmente disponibles tales como F10 de Ham (Sigma), medio esencial mínimo ((MEM), (Sigma)), RPMI-1640 (Sigma) y medio de Eagle modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma). Además, cualquiera de los medios descritos en Ham y col., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes y col., Anal. Biochem, 102:255 (1980), patentes de EE.UU. nº 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; documentos WO 90/03430; WO 87/00195; o la patente de EE.UU. Re. 30.985. Cualquiera de estos medios puede complementarse según se necesite con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tal como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCIN™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos normalmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También puede incluirse cualquier otro complemento necesario a concentraciones apropiadas que serían conocidas para aquellos expertos en la materia. Las condiciones de cultivo tales como temperatura, pH y similares son aquellas previamente usadas con la célula huésped seleccionada para expresión, y serán evidentes para el experto general.

5. Detección de la amplificación/expresión de genes

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

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

6. Purificación del anticuerpo y polipéptido

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

descongelación, sonicación, rotura mecánica o agentes de lisado de células.

Puede desearse purificar el anticuerpo y polipéptido a partir de proteínas de células recombinantes o polipéptidos. Los siguientes procedimientos son a modo de ejemplo de procedimientos de purificación adecuados: por fraccionamiento sobre una columna de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía sobre sílice o sobre una resina de intercambio catiónico tal como DEAE; cromatografía de exclusión por tamaño; SDS-PAGE; precipitación con sulfato de amonio; filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75; columnas de proteína A-Sepharose para eliminar contaminantes tales como IgG; y columnas quelantes de metales para unir formas marcadas con epítopes del anticuerpo y polipéptido. Pueden emplearse diversos procedimientos de purificación de proteínas y tales procedimientos se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990) Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, Nueva York (1982). La(s) etapa(s) de purificación seleccionada(s) dependerá(n), por ejemplo, de la naturaleza del procedimiento de producción usado y del anticuerpo o polipéptido particular producido.

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

La composición de anticuerpo preparada a partir de las células puede purificarse usando, por ejemplo, cromatografía con hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier dominio de Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A puede usarse para purificar anticuerpos que se basan en cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ humanas (Lindmark y col., *J. Immunol. Methods* 62:1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humana (Guss y col., *EMBO J.* 5:1567-1575 (1986)). La matriz a la que está unida el ligando de afinidad es más frecuentemente agarosa, pero están disponibles otras matrices. Matrices mecánicamente estables tales como vidrio de poro controlado o poli(estirenodivinil)benceno permiten flujos de velocidad más rápida y tiempos de procesamiento más cortos que los que pueden lograrse con agarosa. Si el anticuerpo comprende un dominio C_{H3} , la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas tales como fraccionamiento sobre una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía sobre sílice, cromatografía sobre heparina SEPHAROSE™, cromatografía sobre una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), cromatografía de exclusión por tamaño y precipitación con sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo que vaya a recuperarse.

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

I. Formulaciones farmacéuticas

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

ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN®, PLURONICS® o polietilenglicol (PEG). La formulación puede comprender el anticuerpo a una concentración de entre 5-200 mg/ml, preferentemente entre 10-100 mg/ml.

- 5 Las formulaciones en el presente documento también pueden contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que está tratándose, preferentemente aquellas con actividades complementarias que no se afectan adversamente entre sí. Por ejemplo, además de un anticuerpo, oligopéptido de unión o molécula pequeña orgánica o inorgánica de unión, puede desearse incluir en la formulación un anticuerpo adicional, por ejemplo, un segundo anticuerpo que se une a un epítipo diferente sobre el mismo polipéptido; o un anticuerpo para alguna otra diana tal como un factor de crecimiento que afecta el crecimiento del cáncer particular. Alternativamente o adicionalmente, la composición puede comprender adicionalmente un agente quimioterapéutico, agente citotóxico, citocina, agente inhibidor del crecimiento, agente antihormonal y/o cardioprotector. Tales moléculas están adecuadamente presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el fin previsto.
- 10
- 15 Los principios activos también pueden estar atrapados en una microcápsula preparada, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o de gelatina y microcápsulas de poli-(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Oslo, A. Ed. (1980).
- 20

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

25

30

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

J. Tratamiento con anticuerpos, oligopéptidos de unión y moléculas pequeñas orgánicas/inorgánicas de unión

35

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

40

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

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

45

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

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

50

Aquellos tumores con puntuaciones 0 o 1+ para la expresión de polipéptidos pueden caracterizarse como que no expresan en exceso el polipéptido, mientras que aquellos tumores con puntuaciones 2+ o 3+ pueden caracterizarse como que expresan en exceso el polipéptido.

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

55

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

60

Como se ha descrito anteriormente, los anticuerpos, oligopéptidos y moléculas pequeñas orgánicas de la invención tienen diversas aplicaciones no terapéuticas. Los anticuerpos, oligopéptidos y moléculas pequeñas orgánicas/inorgánicas de la presente invención pueden ser útiles para estadificar cánceres que expresan polipéptido (por ejemplo, en obtención de imágenes por rayos X). Los anticuerpos, oligopéptidos y moléculas pequeñas

65

orgánicas también son útiles para la purificación o inmunoprecipitación de polipéptido de células, para la detección y cuantificación de polipéptido *in vitro*, por ejemplo, en un ELISA o una transferencia Western, para destruir y eliminar células que expresan el polipéptido de una población de células mixtas como una etapa en la purificación de otras células.

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

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

40 Los anticuerpos, oligopéptidos, moléculas pequeñas orgánicas/inorgánicas o conjugados de toxina de los mismos se administran a un paciente humano según procedimientos conocidos, tales como administración intravenosa, por ejemplo, como un bolo o por infusión continua durante un período de tiempo, por las vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intrarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, o por inhalación. Se prefiere la administración intravenosa o subcutánea del anticuerpo, oligopéptido o molécula pequeña orgánica.

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

50 También puede desearse combinar la administración del anticuerpo o anticuerpos, oligopéptidos o moléculas pequeñas orgánicas/inorgánicas con la administración de un anticuerpo dirigido contra otro antígeno de tumor asociado al cáncer particular.

55 En otra realización, los procedimientos de tratamiento terapéutico de la presente invención implican la administración combinada de un anticuerpo (o anticuerpos), oligopéptidos o moléculas pequeñas orgánicas/inorgánicas y uno o más agentes quimioterapéuticos o agentes inhibidores del crecimiento, que incluyen la co-administración de mezclas de diferentes agentes quimioterapéuticos. Agentes quimioterapéuticos incluyen antibióticos de fosfato de estramustina, prednimustina, cisplatino, 5-fluorouracilo, melfalan, ciclofosfamida, hidroxurea e hidroxureataxanos (tales como paclitaxel y docetaxel) y/o antraciclina. La preparación y los programas de dosificación para tales agentes quimioterapéuticos pueden usarse según instrucciones del fabricante o como se determina empíricamente por el médico experto. La preparación y los programas de dosificación para tal quimioterapia también se describen en Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992).

65

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

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

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

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

Hay dos enfoques principales para entrar el ácido nucleico (opcionalmente contenido en un vector) en las células del paciente; *in vivo* y *ex vivo*. Para la administración *in vivo*, el ácido nucleico se inyecta directamente en el paciente, normalmente en el sitio en el que se requiere el anticuerpo. Para el tratamiento *ex vivo*, las células del paciente se extraen, el ácido nucleico se introduce en estas células aisladas y las células modificadas se administran al paciente tanto directamente como, por ejemplo, encapsuladas dentro de membranas porosas que son implantadas en el paciente (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 4.892.538 y 5.283.187). Hay varias técnicas disponibles para introducir ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas varían dependiendo de si el ácido nucleico se transfiere a células cultivadas *in vitro* o *in vivo* en las células del huésped previsto. Técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico en células de mamífero *in vitro* incluyen el uso de liposomas, electroporación, microinyección, fusión de células, DEAE-dextrano, el procedimiento de precipitación con fosfato de calcio, etc. Un vector comúnmente usado para la administración *ex vivo* del gen es un vector retroviral.

Las técnicas de transferencia de ácido nucleico *in vivo* actualmente preferidas incluyen transfección con vectores virales (tal como adenovirus, virus del herpes simple I o virus adenoasociados) y sistemas basados en lípidos (lípidos útiles para la transferencia mediada por lípidos del gen son, por ejemplo, DOTMA, DOPE y DC-Chol). Para la revisión de los protocolos de marcado y de terapia génica actualmente conocidos véase Anderson y col., Science 256:808-813 (1992). Véase también el documento WO 93/25673 y las referencias citadas en su interior.

Los anticuerpos de la invención pueden estar en las diferentes formas englobadas por la definición de "anticuerpo" en el presente documento. Por tanto, los anticuerpos incluyen anticuerpo de longitud completa o intacto, fragmentos de anticuerpos, anticuerpo de secuencia nativa o variantes de aminoácidos, anticuerpos humanizados, quiméricos o de fusión, inmunoconjugados, y fragmentos funcionales de los mismos. En los anticuerpos de fusión, una secuencia de anticuerpos está fusionada con una secuencia de polipéptidos heteróloga. Los anticuerpos pueden modificarse en la región Fc para proporcionar funciones efectoras deseadas. Como se trata en más detalle en las secciones en

el presente documento, con las regiones Fc apropiadas, el anticuerpo desnudo unido sobre la superficie celular puede inducir citotoxicidad, por ejemplo, por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) o por reclutamiento de complemento en citotoxicidad dependiente del complemento, o algún otro mecanismo. Alternativamente, si se desea eliminar o reducir la función efectora, de forma que se minimicen los efectos secundarios o las complicaciones terapéuticas, pueden usarse ciertas otras regiones Fc.

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

Los procedimientos de producción de anticuerpos anteriores se describen en detalle en el presente documento.

Los presentes anticuerpos, oligopéptidos y moléculas pequeñas orgánicas/inorgánicas son útiles para tratar un cáncer que expresa hepsina y/o HGF o aliviar uno o más síntomas del cáncer en un mamífero. Los procedimientos engloban el uso de antagonistas en el tratamiento y/o alivio de síntomas de tumores metastásicos asociados a estos cánceres. El antagonista del anticuerpo, oligopéptido o molécula pequeña orgánica/inorgánica puede unirse a al menos una porción de las células cancerosas que expresan el polipéptido(s) (hepsina y/o HGF) en el mamífero. En una realización, el anticuerpo, oligopéptido o molécula pequeña orgánica/inorgánica es eficaz para destruir o matar células tumorales que expresan y/o sensibles a polipéptido o inhibir el crecimiento de tales células tumorales, *in vitro* o *in vivo*, tras la unión al polipéptido. Un anticuerpo tal incluye un anticuerpo desnudo (no conjugado con ningún agente). Los anticuerpos desnudos que tienen propiedades citotóxicas o de inhibición del crecimiento celular pueden emplearse adicionalmente con un agente citotóxico para hacerlos incluso más potentes en la destrucción de células tumorales. Las propiedades citotóxicas pueden conferirse a un anticuerpo, por ejemplo, conjugando el anticuerpo con un agente citotóxico, para formar un inmunoconjugado como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, el agente citotóxico o un agente inhibidor del crecimiento es una molécula pequeña. En algunas realizaciones, se usan toxinas tales como caliqueamicina o un maitansinoide y análogos o derivados de los mismos.

En el presente documento se desvela una composición que comprende un anticuerpo, oligopéptido o molécula pequeña orgánica/inorgánica de la invención, y un vehículo. Para los fines para tratar cáncer, las composiciones pueden administrarse al paciente en necesidad de tal tratamiento, en el que la composición puede comprender uno o más anticuerpos presentes como inmunoconjugado o como el anticuerpo desnudo. En otra realización, las composiciones puede comprender estos anticuerpos, oligopéptidos o moléculas pequeñas orgánicas/inorgánicas en combinación con otros agentes terapéuticos tales como agentes citotóxicos o inhibidores del crecimiento, que incluyen agentes quimioterapéuticos. La invención también proporciona formulaciones que comprenden un anticuerpo, oligopéptido o molécula pequeña orgánica/inorgánica de la invención, y un vehículo. En una realización, la formulación es una formulación terapéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto descrito en el presente documento es ácidos nucleicos aislados que codifican los anticuerpos. Están englobados ácidos nucleicos que codifican tanto las cadenas H como L, y especialmente los residuos de la región hipervariable, cadenas que codifican el anticuerpo de la secuencia nativa, además de variantes, modificaciones y versiones humanizadas del anticuerpo.

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

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

K. Artículos de fabricación y kits

Otro aspecto de la divulgación en el presente documento es un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de un cáncer que expresa polipéptido (hepsina y/o HGF), tal como cáncer de próstata y de ovario. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto sobre o asociado al recipiente. Recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringuillas, etc. Los recipientes pueden formarse a

partir de varios materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es eficaz para tratar la afección por cáncer y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo, oligopéptido o molécula pequeña orgánica/inorgánica descrita en el presente documento. La etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar cáncer. La etiqueta o prospecto comprenderá además instrucciones para administrar la composición de anticuerpo, oligopéptido o molécula pequeña orgánica/inorgánica 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 (BWFI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir adicionalmente otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, que incluyen otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringuillas.

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

L. Polipéptidos y ácidos nucleicos que codifican polipéptidos – Formas específicas y aplicaciones

Las secuencias de nucleótidos (o su complemento) que codifican polipéptidos descritas en el presente documento tienen diversas aplicaciones en la ciencia de la biología molecular, además de usos para terapia, etc. El ácido nucleico que codifica polipéptido también será útil para la preparación de polipéptidos por las técnicas recombinantes descritas en el presente documento, en las que aquellos polipéptidos pueden usarse, por ejemplo, en la preparación de anticuerpos como se describe en el presente documento.

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

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

La unión de oligonucleótidos antisentido o sentido a secuencias de ácidos nucleicos diana produce la formación de dúplex que bloquean la transcripción o traducción de la secuencia diana por uno de varios medios, que incluyen degradación potenciada de los dúplex, terminación prematura de la transcripción o traducción, o por otros medios. Tales procedimientos están englobados por la presente invención. Por tanto, los oligonucleótidos antisentido pueden usarse para bloquear la expresión de una proteína, en los que la proteína puede desempeñar una función en la inducción de cáncer en mamíferos. Los oligonucleótidos antisentido o sentido comprenden además oligonucleótidos

que tienen esqueletos de azúcar-fosfodiéster modificados (u otros enlaces con el azúcar, tales como aquellos descritos en el documento WO 91/06629) y en los que tales enlaces con el azúcar son resistentes a nucleasas endógenas. Tales oligonucleótidos con enlaces de azúcar resistentes son estables *in vivo* (es decir, pueden resistir a la degradación enzimática), pero retienen la especificidad de secuencias para poder unirse a secuencias de nucleótidos diana.

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

Ejemplos específicos de compuestos antisentido preferidos útiles para inhibir la expresión de un polipéptido incluyen oligonucleótidos que contienen esqueletos modificados o enlaces internucleosídicos no naturales. Oligonucleótidos que tienen esqueletos modificados incluyen aquellos que retienen un átomo de fósforo en el esqueleto y aquellos que no tienen un átomo de fósforo en el esqueleto. Para los fines de esta memoria descriptiva, y como algunas veces se menciona en la materia, los oligonucleótidos modificados que no tienen un átomo de fósforo en su esqueleto de internucleósidos también pueden considerarse que son oligonucleósidos. Esqueletos de oligonucleótidos modificados preferidos incluyen, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, fosfonatos de metilo y otros alquilo que incluyen fosfonatos de 3'-alquileo, fosfonatos de 5'-alquileo y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos que incluyen 3'-aminofosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres, selenofosfatos y borano-fosfatos que tienen enlaces 3'-5' normales, análogos ligados en 2'-5' de estos, y aquellos que tiene polaridad invertida en los que uno o más enlaces internucleosídicos es un enlace 3' a 3', 5' a 5' o 2' a 2'. Oligonucleótidos preferidos que tienen polaridad invertida comprenden un único enlace 3' a 3' en el enlace internucleosídico más hacia 3', es decir, un único residuo de nucleósido invertido que puede ser abásico (falta la nucleobase o tiene un grupo hidroxilo en su lugar). También están incluidas diversas sales, sales mixtas y formas de ácido libre. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de enlaces que contienen fósforo incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. n°: 3.687.808; 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.196; 5.188.897; 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, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia.

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

En otros oligonucleótidos antisentido preferidos, tanto el enlace con el azúcar como el internucleosídico, es decir, el esqueleto, de las unidades de nucleótidos se reemplazan por grupos novedosos. Las unidades de base se mantienen para la hibridación con un compuesto diana de ácido nucleico apropiado. Un compuesto oligomérico tal, un mimético de oligonucleótidos que se ha mostrado que tiene excelentes propiedades de hibridación, se denomina un ácido nucleico peptídico (PNA). En compuestos de PNA, el esqueleto de azúcar de un oligonucleótido se reemplaza por un esqueleto que contiene amida, en particular un esqueleto de aminoetilglicina. Las nucleobases son retenidas y se unen directamente o indirectamente a átomos de nitrógeno aza de la porción de amida del esqueleto.

Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de compuestos de PNA incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. nº: 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262, cada uno de que se incorpora en el presente documento por referencia. Otra enseñanza de compuestos de PNA puede encontrarse en Nielsen y col., Science, 1991, 254, 1497-1500.

5 Oligonucleótidos antisentido 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 de metilen(metilimino) o MMI], $-\text{CH}_2\text{-O-N(CH}_3\text{)-CH}_2-$, $-\text{CH}_2\text{-N(CH}_3\text{)-N(CH}_3\text{)-CH}_2-$ y $-\text{O-N(CH}_3\text{)-CH}_2\text{-CH}_2-$ [en el que el esqueleto de fosfodiéster nativo se representa como $-\text{O-P-O-CH}_2-$] descritos en la patente de EE.UU. nº 5.489.677 anteriormente citada y los esqueletos de amida de la patente de EE.UU. nº 5.602.240 anteriormente citada. También se prefieren oligonucleótidos antisentido que tienen estructuras de esqueleto de morfolino de la patente de EE.UU. nº 5.034.506 anteriormente citada.

15 Los oligonucleótidos modificados también pueden contener uno o más restos de azúcar sustituidos. Oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-alquilo, S-alquilo, o N-alquilo; O-alqueno, S-alqueno o N-alqueno; O-alquino, S-alquino o N-alquino; o O-alquil-O-alquilo, en los que el alquilo, alqueno y alquino pueden ser alquilo C_1 a C_{10} o alqueno C_2 a C_{10} y alquino sustituido o sin sustituir. Particularmente se prefieren $\text{O}[(\text{CH}_2)_n\text{O}]_m\text{CH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{OCH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$, $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ONH}_2$ y $\text{O}(\text{CH}_2)_n\text{ON}[(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3]_2$ en las que n y m son de 1 a aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos antisentido preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': alquilo C_1 a C_{10} inferior, alquilo inferior sustituido, alqueno, alquino, 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, sililo sustituido, un grupo saliente de ARN, un grupo indicador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido, y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida incluye 2'-metoxietoxi (2'-O- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3$, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE) (Martin y col., Helv. Chim. Acta, 1995, 78:486-504), es decir, un grupo alcóxalcoxi. Otra modificación preferida incluye 2'-dimetilaminoetoxi, es decir, un grupo $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{ON}(\text{CH}_3)_2$, también conocido como 2'-DMAOE, como se describe en ejemplos en el presente documento más adelante, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O- $\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-N}(\text{CH}_2)_2$.

Otra modificación preferida incluye ácidos nucleicos bloqueados (LNA) en los que el grupo 2'-hidroxilo está ligado al átomo de carbono de 3' o 4' del anillo de azúcar formando así un resto de azúcar bicíclico. El enlace es preferentemente un grupo metileno ($-\text{CH}_2-$)_n que une por puentes el átomo de oxígeno de 2' y el átomo de carbono de 4' en el que n es 1 o 2. Los LNA y la preparación de los mismos se describe en los documentos WO 98/39352 y WO 99/14226.

Otras modificaciones preferidas incluyen 2'-metoxi (2'-O- CH_3), 2'-aminopropoxi (2'-O- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-NH}_2$), 2'-alilo (2'- $\text{CH}_2\text{-CH=CH}_2$), 2'-O-alilo (2'-O- $\text{CH}_2\text{-CH=CH}_2$) y 2'-flúor (2'-F). La modificación en 2' puede ser en la posición arábino (arriba) o la posición ribo (abajo). Una modificación en 2'-arábino preferida es 2'-F. También pueden hacerse modificaciones similares en otras posiciones sobre el oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido del extremo 3' o en oligonucleótidos ligados en 2'-5' y la posición 5' del nucleótido del extremo 5'. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos del azúcar tales como restos de ciclobutilo en lugar del azúcar pentofuranosilo. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de tales estructuras de azúcar modificadas incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. nº: 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, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

50 Los oligonucleótidos también pueden incluir modificaciones o sustituciones de nucleobases (frecuentemente denominadas en la materia simplemente "base"). Como se usa en el presente documento, nucleobases "sin modificar" o "naturales" incluyen las bases de purina adenina (A) y guanina (G) y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las nucleobases modificadas incluyen otras nucleobases sintéticas y naturales tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetilcitosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil ($-\text{C}\equiv\text{C-CH}_3$ o $-\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$) uracilo y citosina y otros derivados de alquino de bases de pirimidina, 6-azouracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halógeno, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas sustituidas en 8, 5-halo, particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas sustituidos en 5, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-amino-adenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7-deazaadenina y 3-deazaguanina y 3-deazaadenina. Otras nucleobases modificadas incluyen pirimidinas tricíclicas tales como fenoxazina citidina (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), fenotiazina citidina (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzotiazin-2(3H)-ona), abrazaderas de G tales como una fenoxazina citidina sustituida (por ejemplo 9-(2-aminoetoxi)-H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), carbazol citidina (2H-pirimido[4,5-b]indol-2-ona), piridoindol citidina (H-pirido[3',2':4,5]pirrolo[2,3-d]pirimidin-2-ona). Nucleobases modificadas también pueden incluir aquellas en las que la base de purina o pirimidina se reemplaza por otros heterociclos, por ejemplo, 7-deaza-adenina, 7-deazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona.

Otras nucleobases incluyen las desveladas en la patente de EE.UU. n° 3.687.808, las desveladas en The Concise Encyclopedia of Polymer Science And Engineering, páginas 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990, y las desveladas por Englisch y col., Angewandte Chemie, edición internacional, 1991, 30, 613. Ciertas de estas nucleobases son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la invención. Éstas incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas sustituidas en N-2, N-6 y O-6, que incluyen 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha mostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico 0,6-1,2°C (Sanghvi y col., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pág. 276-278) y se prefieren sustituciones de bases, incluso más particularmente cuando se combinan con modificaciones de 2'-O-metoxietil-azúcar. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de nucleobases modificadas incluyen, pero no se limitan a: la patente de EE.UU. n° 3.687.808, además de las patentes de EE.UU. n°: 4.845.205; 5.130.302; 5.134.066; 5.175.273; 5.367.066; 5.432.272; 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 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; 5.763.588; 6.005.096; 5.681.941 y 5.750.692, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia

Otra modificación de oligonucleótidos antisentido ligar químicamente al oligonucleótido uno o más restos o conjugados que potencian la actividad, distribución celular o captación celular del oligonucleótido. Los compuestos de la invención pueden incluir grupos conjugados covalentemente unidos a grupos funcionales tales como grupos hidroxilo primarios o secundarios. Grupos conjugados de la invención incluyen intercaladores, moléculas indicadoras, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, poliéteres, grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas de oligómeros, y grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas de oligómeros. Grupos conjugados típicos incluyen colesteroles, lípidos, lípidos catiónicos, fosfolípidos, fosfolípidos catiónicos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y colorantes. Grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas, en el contexto de la presente invención, incluyen grupos que mejoran la captación de oligómeros, potencian la resistencia de oligómeros a la degradación y/o fortalecen la hibridación específica de secuencias con ARN. Grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas, en el contexto de la presente invención, incluyen grupos que mejoran la captación, distribución, metabolismo o secreción de oligómeros. Restos de conjugado incluyen, pero no se limitan a, restos de lípidos tales como un resto de colesterol (Letsinger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553-6556), ácido cólico (Manoharan y col., Bioorg. Med. Chem. Let., 1994, 4, 1053-1060), un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilol (Manoharan y col., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306-309; Manoharan y col., Bioorg. Med. Chem. Let., 1993, 3, 2765-2770), un tiocolesterol (Oberhauser y col., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538), una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecanodiol o undecilo (Saison-Behmoaras y col., EMBO J., 1991, 10, 1111-1118; Kabanov y col., FEBS Lett., 1990, 259, 327-330; Svinarchuk y col., 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 y col., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654; Shea y col., Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783), una cadena de poliamina o de polietilenglicol (Manoharan y col., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973) o ácido adamantanoacético (Manoharan y col., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654), un resto palmitilo (Mishra y col., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237), o un resto octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol. Los oligonucleótidos de la invención también pueden conjugarse con principios activos, por ejemplo, aspirina, warfarina, fenilbutazona, ibuprofeno, suprofen, fenbufeno, ketoprofeno, (S)-(+)-pranoprofeno, carprofeno, dansilsarcosina, ácido 2,3,5-triyodobenzoico, ácido flufenámico, ácido folínico, una benzotiadiazida, clorotiazida, una diazepina, indometicina, un barbitúrico, una cefalosporina, una sulfamida, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico. Conjugados de oligonucleótido-fármaco y su preparación se describen en la solicitud de patente de EE.UU. n° de serie 09/334.130 (presentada el 15 de junio de 1999) y las patentes de Estados Unidos n°: 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; 5.245.022; 5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241; 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 uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia.

No es necesario que todas las posiciones en un compuesto dado estén uniformemente modificadas y, de hecho, más de una de las modificaciones anteriormente mencionadas puede incorporarse en un único compuesto o incluso en un único nucleósido dentro de un oligonucleótido. La presente invención también incluye compuestos antisentido que son compuestos quiméricos. Los compuestos antisentido "quiméricos" o "quimeras" en el contexto de la presente invención son compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos, que contienen dos o más regiones químicamente distintas, representando cada una al menos una unidad de monómero, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto de oligonucleótido. Estos oligonucleótidos normalmente contienen al menos una región en la que el oligonucleótido se modifica de manera que se confiera al oligonucleótido un aumento de la resistencia a la degradación por nucleasas, aumento de la captación celular y/o aumento de la afinidad de unión para el ácido nucleico diana. Una región adicional del oligonucleótido puede servir de sustrato para enzimas que pueden escindir híbridos de ARN:ADN o ARN:ARN. A modo de ejemplo, la RNasa H es una endonucleasa celular que escinde la hebra de ARN de un dúplex ARN:ADN. Por tanto, la activación de RNasa H produce la escisión de la ARN diana, potenciándose así enormemente la eficiencia de la inhibición de oligonucleótidos de la expresión génica. Por consiguiente, frecuentemente pueden obtenerse resultados comparables con oligonucleótidos más cortos cuando se

usan oligonucleótidos quiméricos en comparación con desoxi oligonucleótidos de fosforotioato que se hibridan con la misma región diana. Los compuestos antisentido quiméricos de la invención pueden formarse como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleósidos y/o miméticos de oligonucleótidos como se ha descrito anteriormente. Oligonucleótidos antisentido quiméricos preferidos incorporan al menos un azúcar modificado en 2' (preferentemente 2'-O-(CH₂)₂-O-CH₃) en el extremo 3' para conferir resistencia a nucleasa y una región con al menos 4 azúcares en 2'-H contiguos para conferir actividad de RNasa H. Tales compuestos también se han denominado en la materia híbridos o gámpmeros. Los gámpmeros preferidos tienen una región de azúcares modificados en 2' (preferentemente 2'-O-(CH₂)₂-O-CH₃) en el extremo 3' y en el extremo 5' separada por al menos una región que tiene al menos 4 azúcares en 2'-H contiguos y preferentemente incorporan enlaces de esqueleto fosforotioato. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de tales estructuras híbridas incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. nº 5.013.830; 5.149.797; 5.220.007; 5.256.775; 5.366.878; 5.403.711; 5.491.133; 5.565.350; 5.623.065; 5.652.355; 5.652.356; y 5.700.922,

Los compuestos antisentido usados según la presente divulgación pueden prepararse convenientemente y rutinariamente por la técnica muy conocida de síntesis en fase sólida. El equipo para tal síntesis es comercializado por varios vendedores que incluyen, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, Calif.). Cualquier otro medio para tales síntesis conocidas puede emplearse adicionalmente o alternativamente. Es muy conocido usar técnicas similares para preparar oligonucleótidos tales como los fosforotioatos y derivados alquilados. Los compuestos de la invención también pueden mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de otro modo a otras moléculas, estructuras de molécula o mezclas de compuestos como, por ejemplo, liposomas, moléculas elegidas como diana por el receptor, formulaciones orales, rectales, tópica u otras, para ayudar en la captación, distribución y/o absorción. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de tales formulaciones que ayudan en la captación, distribución y/o absorción incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE.UU. nº 5.108.921; 5.354.844; 5.416.016; 5.459.127; 5.521.291; 5.543.158; 5.547.932; 5.583.020; 5.591.721; 4.426.330; 4.534.899; 5.013.556; 5.108.921; 5.213.804; 5.227.170; 5.264.221; 5.356.633; 5.395.619; 5.416.016; 5.417.978; 5.462.854; 5.469.854; 5.512.295; 5.527.528; 5.534.259; 5.543.152; 5.556.948; 5.580.575; y 5.595.756.

Otros ejemplos de oligonucleótidos sentido o antisentido incluyen aquellos oligonucleótidos que están ligados covalentemente a restos orgánicos tales como aquellos descritos en el documento WO 90/10048, y otros restos que aumentan la afinidad del oligonucleótido por una secuencia de ácidos nucleicos diana, tal como poli-(L-lisina). Todavía más, agentes intercalantes, tales como elipticina, y agentes alquilantes o complejos metálicos pueden unirse a oligonucleótidos sentido o antisentido para modificar las especificidades de unión del oligonucleótido antisentido o sentido por la secuencia de nucleótidos diana.

Los oligonucleótidos antisentido o sentido pueden introducirse en una célula que contiene la secuencia de ácidos nucleicos diana por cualquier procedimiento de transferencia génica que incluye, por ejemplo, transfección de ADN mediada por CaPO₄, electroporación, o usando vectores de transferencia génica tales como virus de Epstein-Barr. En un procedimiento preferido, un oligonucleótido antisentido o sentido se inserta en un vector retroviral adecuado. Una célula que contiene la secuencia de ácidos nucleicos diana se pone en contacto con el vector retroviral recombinante, tanto *in vivo* como *ex vivo*. Vectores retrovirales adecuados incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados del retrovirus murino M-MuLV, N2 (un retrovirus derivado de M-MuLV), o los vectores de doble copia designados DCT5A, DCT5B y DCT5C (véase el documento WO 90/13641).

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

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

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

Las sondas también pueden emplearse en técnicas de PCR para generar un conjunto de secuencias para la

identificación de secuencias codificantes de polipéptido estrechamente relacionadas.

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

El polipéptido puede usarse en ensayos para identificar las otras proteínas o moléculas que participan en una interacción de unión con el polipéptido. Por tales procedimientos pueden identificarse los inhibidores de la interacción de unión a receptor/ligando. Las proteínas que participan en tales interacciones de unión también pueden usarse para cribar inhibidores de péptidos o moléculas pequeñas de la interacción de unión. Pueden diseñarse ensayos de cribado para encontrar compuestos cabeza de serie que imitan la actividad biológica de un polipéptido nativo o un receptor para el polipéptido. Tales ensayos de cribado incluirán ensayos aceptados para cribados de alto rendimiento de bibliotecas químicas, que hacen que sean particularmente adecuados para identificar candidatos de fármacos de moléculas pequeñas. Moléculas pequeñas contempladas incluyen compuestos orgánicos o inorgánicos sintéticos. Los ensayos pueden realizarse en varios formatos, que incluyen ensayos de unión proteína-proteína, ensayos de cribado bioquímico, inmunoensayos y ensayos basados en células, que están todos bien caracterizados en la materia.

También pueden usarse ácidos nucleicos que codifican un polipéptido o sus formas modificadas para generar tanto animales transgénicos como animales de "genes inactivados" que, a su vez, son útiles en el desarrollo y el cribado de reactivos terapéuticamente útiles. Un animal transgénico (por ejemplo, un ratón o rata) es un animal que tiene células que contienen un transgén, transgén que se introdujo en el animal o un antecesor del animal en un estado prenatal, por ejemplo, embrionario. Un transgén es un ADN que está integrado en el genoma de una célula a partir de la cual se desarrolla un animal transgénico. En una realización, el ADNc que codifica un polipéptido puede usarse para clonar ADN genómico que codifica el polipéptido según técnicas establecidas y las secuencias genómicas usadas para generar animales transgénicos que contienen células que expresan ADN que codifica el polipéptido. Los procedimientos para generar animales transgénicos, particularmente animales tales como ratones o ratas, se han convertido en convencionales en la materia y se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n° 4.736.866 y 4.870.009. Normalmente, células particulares serían elegidas como diana para la incorporación del transgén del polipéptido con potenciadores específicos de tejido. Los animales transgénicos que incluyen una copia de un transgén que codifica un polipéptido introducido en la línea germinal del animal en una etapa embrionaria pueden usarse para examinar el efecto del aumento de la expresión de ADN que codifica un polipéptido. Tales animales pueden usarse como animales de prueba para reactivos debido a que se cree que confieren protección de, por ejemplo, afecciones patológicas asociadas a su expresión en exceso. Según esta faceta de la invención, un animal se trata con el reactivo y una incidencia reducida de la afección patológica, en comparación con animales sin tratar que llevan el transgén, indicaría una posible intervención terapéutica para la afección patológica.

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

El ácido nucleico que codifica los polipéptidos también puede usarse en terapia génica. En aplicaciones de terapia génica, los genes se introducen en células con el fin de lograr la síntesis *in vivo* de un producto genético terapéuticamente eficaz, por ejemplo, para la sustitución de un gen defectuoso. "Terapia génica" incluye tanto terapia génica convencional en la que se logra un efecto duradero por un único tratamiento como la administración de agentes terapéuticos génicos, que implica la administración de una sola vez o repetida de un ADN o ARNm terapéuticamente eficaz. Los ARN y ADN antisentido pueden usarse como agentes terapéuticos para bloquear la

expresión de ciertos genes *in vivo*. Ya se ha mostrado que los oligonucleótidos antisentido cortos pueden importarse en células cuando actúan de inhibidores, a pesar de sus bajas concentraciones intracelulares producidas por su captación limitada por la membrana celular (Zamecnik y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4143-4146 [1986]). Los oligonucleótidos pueden modificarse para potenciar su captación, por ejemplo, sustituyendo sus grupos fosfodiéster negativamente cargados por grupos sin cargar.

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

Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos o fragmentos de los mismos descritos en el presente documento son útiles para la identificación de cromosomas. A este respecto, existe una necesidad continua de identificar nuevos marcadores de cromosomas, ya que actualmente están disponibles relativamente pocos reactivos de marcado de cromosomas, basados en los datos de secuencias reales. Cada molécula de ácido nucleico de la presente invención puede usarse como marcador de cromosoma.

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

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

Los ensayos pueden realizarse en varios formatos, que incluyen ensayos de unión proteína-proteína, ensayos de cribado bioquímico, inmunoensayos y ensayos basados en células, que están todos bien caracterizados en la materia.

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

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

Si el compuesto candidato interacciona, pero no se une a un polipéptido, su interacción con ese polipéptido puede ensayarse mediante procedimientos muy conocidos para detectar las interacciones proteína-proteína. Tales ensayos

incluyen enfoques tradicionales tales como, por ejemplo, reticulación, co-inmunoprecipitación y co-purificación a través de gradientes o columnas cromatográficas. Además, las interacciones proteína-proteína pueden monitorizarse usando un sistema genético basado en levadura descrito por Fields y colaboradores (Fields y Song, Nature (Londres), 340:245-246 (1989); Chien y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:9578-9582 (1991)) como se desvela por
 5 Chevray y Nathans, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 5789-5793 (1991). Muchos activadores transcripcionales, tales como levadura GAL4, consisten en dos dominios modulares físicamente discretos, actuando uno de dominio de unión a ADN, funcionando el otro de dominio de activación de la transcripción. El sistema de expresión en levadura descrito en las publicaciones anteriores (generalmente denominado el "sistema de dos híbridos") aprovecha esta
 10 propiedad y emplea dos proteínas híbridas, una en la que proteína diana está fusionada con el dominio de unión a ADN de GAL4 y la otra en la que las proteínas activadoras candidatas están fusionadas con el dominio de activación. La expresión de un gen indicador GAL1-*lacZ* bajo el control de un promotor activado por GAL4 depende de la reconstitución de la actividad de GAL4 por interacción proteína-proteína. Las colonias que contienen polipéptidos interactuantes se detectan con un sustrato cromogénico para β -galactosidasa. Un kit completo (MATCHMAKER™) para identificar interacciones proteína-proteína entre dos proteínas específicas usando la
 15 técnica de dos híbridos está comercialmente disponible de Clontech. Este sistema también puede extenderse para mapear los dominios de proteínas que participan en las interacciones de proteínas específicas, además de para localizar residuos de aminoácidos que son cruciales para estas interacciones.

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

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

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

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

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

Otro posible antagonista es una construcción de ARN o ADN antisentido preparada usando tecnología antisentido en la que, por ejemplo, una molécula de ARN o ADN antisentido actúa para bloquear directamente la traducción de ARNm hibridándose con el ARNm elegido como diana y previniendo la traducción de proteínas. Puede usarse tecnología antisentido para controlar la expresión génica mediante la formación de una triple hélice o ADN o ARN antisentido, basándose ambos procedimientos en la unión de un polinucleótido a ADN o ARN. Por ejemplo, la porción codificante de 5' de la secuencia de polinucleótidos, que codifica los polipéptidos maduros en el presente documento puede usarse para diseñar un oligonucleótido de ARN antisentido de aproximadamente 10 a 40 pares de bases de longitud. Un oligonucleótido de ADN se diseña para ser complementario a una región del gen que participa en la transcripción (triple hélice - véanse Lee y col., Nucl. Acids Res., 6:3073 (1979); Cooney y col., Science, 241: 456 (1988); Dervan y col., Science, 251:1360 (1991)), previniéndose así la transcripción y la producción del polipéptido. El oligonucleótido de ARN antisentido se hibrida con el ARNm *in vivo* y bloquea la traducción de la molécula de ARNm en el polipéptido (antisentido - Okano, Neurochem., 56:560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression (CRC Press: Boca Raton, FL, 1988). Los oligonucleótidos descritos anteriormente también pueden administrarse a células de forma que el ARN o ADN antisentido pueda expresarse *in vivo* para inhibir la producción del polipéptido. Si se usa ADN antisentido, se prefieren los oligodesoxirribonucleótidos derivados del sitio de iniciación de la traducción, por ejemplo, entre aproximadamente las posiciones -10 y +10 de la secuencia de nucleótidos del gen diana.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5 Ejemplos

Reactivos

10 El sustrato cromogénico S2366 se obtuvo de DiaPharma Group, Inc. (West Chester, OH), Lys-plasminógeno de Haematologic Technologies Inc. (Essex Junction, VT) y el activador de plasminógeno tipo tejido (t-PA) de Genentech, Inc. (South San Francisco, CA). Pro-HGF, expresado en células de ovario de hámster chino (CHO) en ausencia de suero y purificado por cromatografía en HiTrap Sepharose SP, se proporcionó por David Kahn (Genentech). HGFA que comprende los residuos Val373 - Arg407 se expresó en un sistema de expresión de baculovirus y se purificó como se ha descrito (34). FVII recombinante humano purificado, expresado en células 293 15 humanas, fue una donación de Mark O'Connell (Genentech) y se ha descrito recientemente (42). Se usaron dioleoil 1,2-diacil-sn-glicero-3-(fosfo-L-serina) (PS) y oleoil 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfocolina (PC) (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL) para producir vesículas de PCPS (relación molar 7:3) esencialmente como se ha descrito (43). Los marcadores de peso molecular fueron los patrones SeeBlue Plus2 y MultiMark (Invitrogen, Carlsbad, CA).

20 Expresión y purificación de hepsina

El ADNc de hepsina de longitud completa, obtenido del consorcio I.M.A.G.E. (ATCC, Manassas, VA), se digirió con endonucleasas de restricción EcoRI y Not I (New England Biolabs Inc. Beverly, MA) y se insertó en el vector de expresión eucariota pRK5E. Se construyó un ADNc de hepsina marcado con His secretado por fusión del ADNc que 25 codifica la secuencia señal de HGF humano (aminoácidos Met1 - Gly31) con el ADNc que codifica el dominio extracelular de hepsina humana (Arg45 - Leu417: sistema de numeración según Somoza y col., 2003 (5)). Además, se añadió una marca de His₈ al extremo C después de Leu417 y la construcción de ADNc final se insertó en el vector de expresión eucariota pCMV.PD5. La hepsina se expresó en un sistema de expresión transitorio de células de ovario de hámster chino (CHO) y se purificó por cromatografía de afinidad en níquel-ácido nitrilotriacético (Ni-NTA) esencialmente como se describe para la producción de sHAI-1B de tipo salvaje (34). 30

Expresión y purificación de sHAI-1B, mutantes de sHAI-1B y sHAI-2

35 Se produjo una forma soluble de HAI-1B (sHAI-1B) que comprende el dominio extracelular entero en un sistema de expresión transitorio de células CHO y se purificó como se ha descrito previamente (34). Usando mutagénesis dirigida al sitio, los residuos P₁ de KD1 (Arg260) y KD2 (Lys401) se cambiaron individualmente a Ala y las proteínas resultantes, sHAI-1B(R260A) y sHAI-1B(K401A), se expresaron y purificaron como se ha descrito (34).

40 Se obtuvo HAI-2 de longitud completa a partir de una biblioteca de ADNc derivada de ARN de pulmón fetal humano (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA) usando oligo dT /sitio Not I como cebador y adaptador con el sitio Sal I para la segunda cadena. El ADNc se digirió con Sal I y Not I; los ADNc superiores a 2,8 kb se ligaron a pRK5D. Se generó ADN monocatenario de la biblioteca ADNc/pRK5D de pulmón humano usando procedimientos de biología molecular estándar. Se hibridó el cebador inverso (5'-TTTCTTGAGGCACTCCTCCTTG-3') con el conjunto de ADNc monocatenario y se extendió usando ADN polimerasa T7 o T4. Se transformaron *E. coli* con el ADN bicatenario 45 sintetizado y se criaron colonias usando procedimientos de hibridación en filtro estándar. Se analizó el tamaño del inserto por PCR y digestión con endonucleasa de restricción, XbaI. Se identificaron clones de longitud completa de HAI-2 y se confirmaron por secuenciación de ADN. Se produjo una forma soluble de HAI-2 (sHAI-2) construyendo un ADNc que codifica el dominio extracelular (Ala28 - Lys197; sistema de numeración según Kawaguchi y col., 1997 (39)) de HAI-2 y adición de una marca de His₈ del extremo C con un espaciador Gly. A continuación, el ADNc 50 obtenido se insertó en un vector de expresión de baculovirus derivado de pVL1393 (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA). Se expresó sHAI-2 en un sistema de expresión de baculovirus y se purificó por cromatografía de afinidad en Ni-NTA esencialmente como se ha descrito para la producción de la cadena β de HGF (44). Se determinaron concentraciones de proteína por análisis cuantitativo de aminoácidos.

55 Ensayos de activación de FVII y de plasminógeno

60 Se activó FVII a una concentración de 0,11 mg/ml por hepsina 230 nM en Tris-HCl 30 mM, pH 8,4, imidazol 30 mM, NaCl 200 mM (tampón Tris) en presencia de vesículas de PCPS 0,5 mM y CaCl₂ 5 mM a 37 °C. Las alícuotas de reacción tomadas en diferentes momentos de tiempo se analizaron por SDS-PAGE (condiciones reductoras) usando un gel con gradiente del 4 - 20 % (Invitrogen, Carlsbad, CA). Los geles se tiñeron con Simply Blue Safe Stain (Invitrogen).

65 Se incubó plasminógeno a 0,12 mg/ml con hepsina 40 nM o t-PA 40 nM (control positivo) en HEPES 20 mM a pH 7,5, NaCl 150 mM (tampón HEPES) a 37 °C. Las alícuotas de reacción tomadas a diferentes momentos de tiempo se analizaron por SDS-PAGE como se describe para los ensayos de activación de FVII.

Activación de pro-HGF por hepsina y HGFA

Se incubó pro-HGF (0,3 mg/ml) en tampón HEPES con hepsina 40 nM o con HGFA 40 nM durante 4 h a 37 °C y se guardó a -20 °C hasta el uso posterior. El análisis del material digerido, HGF_{hepsina} y HGF_{HGFA}, por SDS-PAGE indicó que >95 % de pro-HGF se convirtió en HGF bicatenario.

Se llevaron a cabo ensayos de activación de pro-HGF y el marcado con ¹²⁵I de pro-HGF como se ha descrito (34, 45). Brevemente, se incubó pro-HGF marcado con ¹²⁵I a 0,05 mg/ml en tampón HEPES con concentraciones crecientes (0,16 - 40 nM) de hepsina o HGFA a 37 °C. Después de 4 h, se tomaron alícuotas y se analizaron por SDS-PAGE (gel al 4-20 % de gradiente) (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). Para los estudios de inhibición, se incubó hepsina (15 nM) en tampón HEPES con 1 μM de sHAI-1B, sHAI-1B(K401A), sHAI-1B(R260A) o sHAI-2 a 37 °C. Después de 4 h, las muestras se analizaron por SDS-PAGE y se tiñeron con Simply Blue Safe Stain (Invitrogen).

Ensayos de inhibición de enzimas

Las condiciones de ensayo fueron similares a aquellas descritas por Somoza y col. 2003 (5) usando el sustrato cromogénico S2366 (clorhidrato de L-piroglutamil-L-prolil-L-arginina-p-nitroanilina). Se incubó hepsina (concentración final de 0,4 nM) con concentraciones crecientes de inhibidores en tampón Tris durante 30 min a temperatura ambiente. Se añadió sustrato S2366 y se midió el cambio en la absorbancia a 405 nm en un lector de microplacas cinético (Molecular Devices, Sunnyvale CA). Las concentraciones de hepsina y S2366 en esta mezcla de reacción final fueron 0,4 nM y 0,2 mM (K_m determinada = 0,2 mM), respectivamente. Las actividades inhibitorias se expresaron como actividad fraccionaria (v_i/v_0) de la actividad enzimática no inhibida. Se calcularon las concentraciones de inhibidor que dan el 50 % de inhibición (CI_{50}) ajustando los datos a un programa de ajuste de curvas de regresión de cuatro parámetros (Kaleidagraph, Synergy Software, Reading, PA). Se realizaron al menos tres experimentos independientes para cada inhibidor.

Ensayos de proliferación y migración celular

Se llevaron a cabo ensayos de proliferación con la línea celular de adenocarcinoma pancreático humano BxPC3 obtenida de la Colección Europea de Cultivos Celulares (CAMR, Centro de Microbiología Aplicada e Investigación, Salisbury, Wiltshire, RU). Se cultivaron células en medio RPMI que contenía 10 % de SBF (Sigma, St. Louis, MO), HEPES 10 mM, glutamina 2 mM, penicilina-estreptomicina (Invitrogen, Carlsbad, CA) y 250 μg/ml de G418 (Invitrogen). Se lavaron capas de células confluentes con PBS seguido de EDTA/PBS 10 mM y se desprendieron después de la incubación con tripsina. Las células se resuspendieron en medio de crecimiento y se sembraron (10.000 - 15.000 células/pocillo) en placas MT de fondo blanco de 96 pocillos (Cultur Plate™, Packard/PerkinElmer, Boston, MA). Después de 24 h, el medio de crecimiento se sustituyó con RPMI-0,1 % de BSA. Después de 24 h adicionales, el medio se retiró y se añadieron diversas concentraciones de HGF_{hepsina} y HGF_{HGFA} en RPMI-0,1 % de BSA y se dejó que las células se cultivaran durante 72 h. A continuación se cuantificó la proliferación celular usando el kit luminiscente CellTiter-Glo (Promega, Madison, WI) según instrucciones del fabricante. La luminiscencia se midió en un luminómetro de microplacas Tropic TR717 (Berthold 75323, Bad Wildbad, Alemania). Después de restar los valores del ruido de fondo (proliferación en ausencia de HGF), las actividades de HGF_{hepsina} y HGF_{HGFA} se expresaron como el porcentaje de proliferación de BxPC3 por 100 ng/ml de una preparación de control de HGF (obtenida del Dr. Ralph Schwall, Genentech).

Se llevaron a cabo ensayos de migración celular con la línea de células de cáncer de mama MDA-MB435 (HTB-129, ATCC, Manassas, VA) como se ha descrito (44). Brevemente, se añadieron 0,2 ml de una suspensión de células en medio sin suero ($0,6-0,8 \times 10^6$ células/ml) a las cámaras superiores de placas Transwell de 24 pocillos (8 μm de tamaño de poro) (sistema de inserto HTS Multiwell™, Falcon, Franklin Lakes, NJ) previamente recubiertas con 10 ng/ml de colágeno de cola de rata tipo I (Upstate, Lake Placid, NY). Se añadieron preparaciones de HGF a la cámara inferior en medio sin suero. Después de la incubación durante 13-14 h, se eliminaron las células sobre el lado apical de la membrana y aquellas que migraron al lado basal se fijaron en 4 % de paraformaldehído, seguido de tinción con una solución al 0,5 % de cristal violeta. Las células se solubilizaron en 10 % de ácido acético y la A_{560} se midió en un lector de microplacas de Molecular Devices. Las actividades pro-migratorias de mutantes de HGF se expresaron como el porcentaje de una preparación de control de HGF después de restar la migración basal en ausencia de HGF.

Ensayo de fosforilación de receptores de Met

Se llevó a cabo el ensayo de activación de receptores de cinasas (KIRA) como se ha descrito (44). Brevemente, se sembraron células A549 de carcinoma de pulmón (CCL-185, ATCC, Manassas, VA) en placas de 96 pocillos a una densidad de 50.000 células por pocillo. Después de la incubación durante la noche a 37 °C, se eliminó el medio de crecimiento y las células se privaron de suero durante 30 a 60 min en medio que contenía 0,1 % de SBF. Se añadieron concentraciones crecientes de HGF_{hepsina} y HGF_{HGFA} en medio que contenía 0,1 % de SBF. Como control, los presentes inventores usaron un forma monocatenaria no escindible de HGF (scHGF) en la que el sitio de escisión estaba mutado (Arg494Glu) (44). Después de 10 min de incubación a 37 °C, se eliminó el medio y las células se lisaron con tampón de lisis (Cell Signaling Technologies, Beverly, MA) complementado con mezcla de

inhibidores de proteasa. Se añadieron a los lisados celulares el anticuerpo 4G10 marcado con BV-TAG y el anticuerpo anti-Met biotinilado. Después de la incubación durante 1,5 a 2 h, se añadieron perlas magnéticas de estreptavidina (Dynabeads, Bio Veris) y se incubaron durante 45 min. Las perlas con material unido (anticuerpo anti-Met/Met/anticuerpo anti-fosfotirosina) se capturaron por un imán externamente aplicado. Después de una etapa de lavado, la señal quimioluminiscente generada por la fuente de luz se midió como unidades luminiscentes relativas en un instrumento Bio Veris. Para cada experimento, la fosforilación de Met por HGF_{hepsina}, HGF_{HGFA} o scHGF se expresó como el porcentaje de la máxima señal obtenida con una preparación de control de HGF.

Resultados

Procesamiento proteolítico de pro-HGF por hepsina

Se expresó una forma soluble de hepsina que engloba el dominio extracelular entero (Arg45 - Leu417; sistema de numeración según Somoza y col., 2003 (5)) y una marca de His₈ del extremo C en células CHO. Durante el procedimiento de purificación, se convirtió espontáneamente el zimógeno de hepsina en su forma de dos cadenas (Fig. 1A), lo más probablemente debido a una auto-activación (4). La secuenciación del extremo N del dominio de proteasa de -30 kDa (¹⁶³IVGGRDTSLGR¹⁷³) confirmó la escisión en el enlace peptídico Arg162-Ile163 esperado que convierte la enzima activa. La hepsina convirtió activamente el zimógeno de FVII en FVIIa de dos cadenas (Fig. 1B), de acuerdo con experimentos informados por Kazama y col., 1995 (9) usando hepsina expresada en la superficie celular para determinar la activación de FVII. Se examinó la actividad de hepsina hacia pro-HGF midiendo la conversión de pro-HGF marcado con ¹²⁵I en HGF de dos cadenas. Los resultados mostraron que pro-HGF se escindió por hepsina en un modo dependiente de la concentración (Fig. 2A). La actividad de hepsina fue comparable a la de HGFA (Fig. 2B), alcanzando ambas enzimas la conversión completa de pro-HGF a una concentración de 4 - 13 nM. En el mismo sistema de ensayo, los activadores de pro-HGF el factor XIa, factor XIIIa y la calicreína del plasma requieren aproximadamente concentraciones 5-6 veces mayores para la conversión completa de pro-HGF (45). La secuenciación del extremo N de las cadenas β de HGF de ~36k Da y ~39 kDa dio secuencias idénticas (⁴⁹⁵VVNGIPTRTNIG⁵⁰⁶), que muestran que la hepsina procesó pro-HGF en el enlace peptídico Arg494 - Val495 esperado. A diferencia del factor XIa y la calicreína del plasma, la hepsina no produjo el fragmento de cadena α2 de HGF (por escisión entre Arg424 - His425) (45), incluso después de periodos de reacción prolongados. Además, la hepsina (40 nM) careció completamente de la capacidad para activar plasminógeno durante una reacción de 5 h (Fig. 2C). En comparación, el t-PA procesó eficazmente el plasminógeno con aproximadamente el 50 % de zimógeno ya escindido después de 0,5 h (Fig. 2C).

Actividad biológica de HGF generado por digestión con hepsina

Se convirtió completamente pro-HGF no marcado (0,3 mg/ml) (>95 %) en HGF con hepsina 40 nM o con HGFA 40 nM (Fig. 3A) para dar HGF_{hepsina} y HGF_{HGFA}, respectivamente. En un ensayo de receptores de cinasa (KIRA) con células de carcinoma de pulmón A549, ambas preparaciones de HGF indujeron aumentos dependientes de la concentración similares en la fosforilación de Met, alcanzando la actividad máxima a 250 ng/ml (Fig. 3B). Como se muestra previamente (44), una forma monocatenaria no escindible de HGF (scHGF) con un sitio de escisión cambiado (R494E) no tuvo actividad (Fig. 3B). Los experimentos de control mostraron que la hepsina o HGFA solo no tuvieron efecto (datos no mostrados). Además, HGF_{hepsina} promovió eficazmente la proliferación de células de cáncer pancreático BxPC3. La actividad fue comparable a la de HGF_{HGFA} en el intervalo examinado de 5 - 100 ng/ml (Fig. 4A). Se obtuvieron resultados similares en un ensayo de migración celular con células MDA-MB435 usando un sistema de migración Transwell recubierto con colágeno. Como se encuentra en ensayos de proliferación celular, los efectos pro-migratorios de HGF_{hepsina} fueron dependientes de la concentración e indistinguibles de la actividad de HGF_{HGFA} (Fig. 4B).

Inhibición de la actividad enzimática de hepsina por sHAI-1B y sHAI-2

Un cribado inicial de 26 sustratos cromogénicos comercialmente disponibles mostró que S2366, un sustrato informado por Somoza y col., 2003 (5), se hidrolizó por hepsina a la mayor tasa (datos no mostrados). Usando S2366 como sustrato, se midieron las actividades inhibitoras de formas solubles altamente purificadas de HAI-1B no mutante (sHAI-1B) y HAI-2 (sHAI-2). Además, los presentes inventores produjeron los dos mutantes de sHAI-1B sHAI-1B(R260A) y sHAI-1B(K401A) en los que los dominios de Kunitz individuales se inactivaron reemplazando los residuos P₁ (Arg260 en KD1 y Lys401 en KD2) con alanina (34). Los resultados mostraron que tanto sHAI-1B como sHAI-2 inhibieron potentemente la actividad enzimática de hepsina con valores de CI₅₀ de 21,1 ± 2,7 nM y 1,3 ± 0,3 nM, respectivamente (Fig. 5). Además, sHAI-1B(K401A) mutante que contenía un KD2 no funcional fue igualmente de potente que sHAI-1B de tipo salvaje, mientras que sHAI-1B(R260A) tuvo actividad >47 veces reducida (Fig. 5). Los valores obtenidos de CI₅₀ se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Inhibición de hepsina por inhibidores del dominio de Kunitz

Inhibidores	CI ₅₀ (nM)
sHAI-1B wt	21,1 ± 2,7
sHAI-1B(K401A)	18,2 ± 3,7
sHAI-1B(R260A)	> 1000
sHAI-2	1,3 ± 0,3

Inhibición de la activación de pro-HGF mediada por hepsina

- 5 Se midió la capacidad de sHAI-1B y sHAI-2 para interferir con el procesamiento de sustrato macromolecular en un ensayo de activación de ¹²⁵I-pro-HGF. Los resultados obtenidos estuvieron totalmente de acuerdo con sus actividades inhibitoras determinadas en ensayos amidolíticos. A concentraciones 1 μM de sHAI-2, sHAI-1B no mutante y sHAI-1B(K401A), hubo inhibición completa de la escisión de pro-HGF (Fig. 6). A diferencia, sHAI-1B(R260A) 1 μM no mostró inhibición y la activación de pro-HGF avanzó hasta la conversión completa (Fig. 6).

Discusión

15 La ruta de señalización de HGF/Met desempeña una función importante en la fisiología y patología humana, que incluye invasión y metástasis tumoral. La disponibilidad local de HGF activo está controlada por serina proteasas similares a quimotripsina y sus inhibidores relacionados, que regulan el procesamiento de pro-HGF inactivo en el entorno extracelular. Por tanto, las perturbaciones de esta ruta de pro-HGF convertasa 'en la dirección 5' en cáncer pueden promover el crecimiento tumoral acelerando el procesamiento de pro-HGF. Aquí, los presentes inventores demuestran que la hepsina, una serina proteasa altamente regulada por incremento en cáncer de próstata y de ovario, es un potente activador de pro-HGF. Así, la hepsina desempeña probablemente una función importante en efectuar el crecimiento tumoral activando la ruta de señalización de HGF/Met, que participa en cáncer de próstata (46-48), además de cáncer de ovario (49, 50).

25 La hepsina escindió proteolíticamente pro-HGF en el enlace peptídico Arg494 - Val495 sin ninguna escisión adicional en Arg424-His425 en el dominio 4 de Kringle, un sitio reconocido por el factor XIa y la calicreína del plasma (45). El HGF de dos cadenas generado por hepsina fue completamente funcional, induciendo la fosforilación de receptores de Met y promoviendo la proliferación y migración celular con actividades comparables a HGF generado por HGFA. El mecanismo molecular subyacente a la conversión mediada por hepsina de pro-HGF inactivo en un factor de crecimiento activo tiene similitud con el zimógeno proteolítico para la conversión enzimática de serina proteasas similares a quimotripsina. Esto está respaldado por estudios recientes sobre las consecuencias estructurales de la activación de pro-HGF, demostrando que la escisión en Arg494 - Val495 conduce a cambios conformacionales en la cadena β de HGF similar a proteasa y la maduración completa de un sitio de unión de receptores de Met (44, 51). Este sitio de unión de Met, que está centrado sobre la 'región de sitio activo' y 'dominio de activación' de HGF, posee un sorprendente parecido a la región de procesamiento de sustrato de serina proteasas (44, 51). Así, la escisión de pro-HGF por hepsina afecta las transposiciones estructurales sobre HGF β que permiten la formación de complejos de señalización de HGF/Met productivos. La actividad proteolítica de la hepsina hacia pro-HGF parece altamente específica, ya que no escindió plasminógeno, el homólogo estructural más cercano de pro-HGF. La hepsina no tuvo actividad proteolítica hacia otros sustratos de serina proteasa, tales como protrombina, proteína C, factor X y factor IX (9).

40 Estudios con ratones deficientes en HGF muestran que la ruta de HGF/Met es esencial para el desarrollo embrionario normal y la supervivencia (52, 53). A diferencia, ratones deficientes en el gen hepsina se desarrollan normalmente, que indica que es improbable que la hepsina sea el principal activador de HGF durante la embriogénesis. Similar a la hepsina, las deficiencias de las otras convertasas de pro-HGF conocidas, la matriptasa (54), factor XI (55), precalicreína (56) y u-PA (57), no son mortales para el embrión. Debido a su importancia en la embriogénesis y la fisiología postnatal, la actividad de HGF puede regularse de una manera concertada por múltiples sistemas de pro-HGF convertasa. Si es así, las deficiencias del gen de pro-HGF convertasa combinadas deben producir defectos del desarrollo similares a ratones deficientes en HGF. Alternativamente, el procesamiento de HGF que regula pro-HGF durante la embriogénesis puede no haberse identificado todavía.

50 HAI-1B, HAI-1 y HAI-2 son inhibidores de la superficie celular epitelial y se expresan en muchos tejidos normales y en tumores (34, 58-63). Como tales, están idealmente localizados para regular la actividad enzimática de TTSP expresadas en células epiteliales y posiblemente otras serina proteasas asociadas a la superficie celular. De hecho, las variantes de corte y empalme de HAI-1 HAI-1 y HAI-1B inhiben potentemente la TTSP matriptasa (MT-SP1) y se han encontrado complejos de HAI-1 con matriptasa en leche materna humana (38). Aquí, los presentes inventores demuestran que tanto sHAI-1B como sHAI-2 también son potentes inhibidores de la actividad enzimática de hepsina. Además, los experimentos de mutagénesis dirigidos a residuos P₁ demostraron que la inhibición de hepsina está completamente mediada por KD1 de sHAI-B, ya que el sHAI-1B(R260A) mutante fue inactivo en ensayos de pro-HGF y tuvo < 1 % de actividad no mutante y mutante de KD2 en ensayos amidolíticos. Así, la hepsina, matriptasa y HGFA no solo tienen actividades conversoras de pro-HGF comparables (34), sino que también se inhiben por sHAI-1B con potencias iguales (16-30 nM) en un modo específico de KD1 (34,64). Las variantes de corte y empalme HAI-1 y HAI-1B solo se diferencian por la ausencia o presencia de 16 aminoácidos localizados en el extremo C para

KD1. Su patrón de expresión en tejidos, que incluye tumores de próstata y ovario, es idéntico y hasta la fecha no se han encontrado diferencias significativas en la potencia y patrón de proteasa diana. Por tanto, los presentes inventores consideran las funciones *in vivo* de las dos variantes de corte y empalme como equivalentes. La función de los dominios de Kunitz de HAI-2 no se trató específicamente en el estudio de los inventores. Para la mayoría de sus enzimas diana, HAI-2 utiliza tanto dominios de Kunitz del extremo N como C (41, 65).

La asociación funcional de hepsina con HAI-1B y HAI-2 *in vitro* junto con su localización en superficies celulares epiteliales *in vivo* sugiere que pueden constituir un sistema de enzima-inhibidor fisiológicamente relevante. Por ejemplo, las dos variantes de corte y empalme de HAI-1 y HAI-2 se expresan en próstata normal y líneas de células de cáncer de próstata (34, 59, 61) y el antígeno HAI-1 se localizó en la capa de células secretoras de epitelio glandular de próstata (59). Curiosamente, la expresión de hepsina en tumores de próstata se localizó en el mismo compartimento epitelial (19, 20), respaldando la idea de que HAI-1 y posiblemente HAI-2 se asocian con hepsina *in vivo*. Aunque la expresión de hepsina está fuertemente regulada por incremento en cáncer de próstata (17-22), HAI-1 y HAI-2 aumentan solo ligeramente (aproximadamente 1,5 veces) según los resultados de expresión génica informados por Welsh y col., 2001 (17). Como consecuencia, la actividad enzimática de hepsina en tumores puede controlarse inadecuadamente y podría conducir a potenciar el procesamiento de pro-HGF y la progresión tumoral. Se han descrito desequilibrios similares de sistemas de pro-HGF convertasa/inhibidor para matriptasa/HAI-1 en cáncer de ovario (62, 63), HGFA/HAI-1 en cáncer colorrectal (66, 67) y HGFA/HAI-1 en carcinoma de células renales (68). La expresión regulada por incremento de hepsina en algunos de estos cánceres sugiere que ciertos sistemas de convertasa/inhibidor comprenden múltiples enzimas y, por tanto, elevadas relaciones de enzima/inhibidor podrían ampliar las consecuencias del tumor maligno.

En conclusión, los resultados presentados muestran que la hepsina activa eficazmente pro-HGF, relevando así un enlace funcional entre la hepsina sobre la superficie epitelial del tumor y la matriz extracelular que contiene precursor del factor de crecimiento inactivo. El hallazgo de que HAI-1B y HAI-2 son potentes inhibidores de hepsina, que está regulado por incremento en cáncer de próstata y de ovario, proporciona nuevos enfoques para el tratamiento del cáncer. Por ejemplo, los dominios de Kunitz funcionales de HAI-1B o HAI-2 podrían servir de andamiajes para generar inhibidores de enzimas más específicos y/o más potentes usando tecnología de expresión en fago, que se ha aplicado satisfactoriamente a otros andamiajes de dominios de Kunitz (69, 70).

Acotaciones/Abreviaturas

¹Factor VIIa, FVIIa; tampón HEPES, HEPES 20 mM a pH 7,5, NaCl 150 mM; tampón Tris, Tris-HCl 30 mM, pH 8,4, imidazol 30 mM, NaCl 200 mM; pro-HGF, factor de crecimiento de hepatocitos monocatenario, HGF, factor de crecimiento de hepatocitos bicatenario; HGFA, activador del factor de crecimiento de hepatocitos; HAI-1, inhibidor-1 del activador del factor de crecimiento de hepatocitos; HAI-1B, una variante de corte y empalme del inhibidor-1 del activador del factor de crecimiento de hepatocitos; HAI-2, inhibidor-2 del activador del factor de crecimiento de hepatocitos; KD1 y KD2, dominio de Kunitz del extremo N y C de HAI-1B; sHAI-1B, forma soluble de HAI-1B que engloba el dominio extracelular; sHAI-2, forma soluble de HAI-2 que engloba el dominio extracelular; HGF_{hepsina}, HGF producido por la activación de pro-HGF con hepsina; HGF_{HGFA}, HGF producido por la activación de pro-HGF con HGFA; scHGF, HGF monocatenario no escindible con un sitio de escisión mutado (Arg494Glu); u-PA, activador del plasminógeno tipo urocinasa; t-PA, activador del plasminógeno tipo tejido. Ni-NTA, níquel-ácido nitrilotriacético.

Lista parcial de referencias

1. Szabo, R., Wu, Q., Dickson, R. B., Netzel-Arnett, S., Antalis, T. M. y Bugge, T. H. (2003) *Thromb. Haemost.* 90,185-193
2. Tsuji, A., Torres-Rosado, A., Arai, T., Le Beau, M. M., Lemons, R. S., Chou, S.-H. y Kurachi, K. (1991) *J Biol Chem* 266, 16948-16953
3. Leytus, S. P., Loeb, K. R., Hagen, F. S., Kurachi, K. y Davie, E. W. (1988) *Biochemistry* 27, 1067-1074
4. Vu, T.-K. H., Liu, R. W., Haaksma, C. J., Tomasek, J. J. y Howard, E. W. (1997) *J Biol Chem* 272, 31315-31320
5. Somoza, J. R., Ho, J. D., Luong, C., Ghate, M., Sprengeler, P. A., Mortara, K., Shrader, W. D., Sperandio, D., Chan, H., McGrath, M. E. y Katz, B. A. (2003) *Structure* 11, 1123-1131
6. McCallum, C. D., Hapak, R. C., Neuenschwander, P. F., Morrissey, J. H. y Johnson, A. E. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 28168-28175
7. Mutucumarana, V. P., Duffy, E. J., Lollar, P. y Johnson, A. E. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 17012-17021
8. Husten, E. J., Esmon, C. T. y Johnson, A. E. (1987) *J. Biol. Chem.* 262, 12953-12961
9. Kazama, Y., Hamamoto, T., Foster, D. C. y Kisiel, W. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 66-72
10. Wu, Q., Yu, D., Post, J., Halks-Miller, M., Sadler, J. E. y Morser, J. (1998) *J. Clin. Invest.* 101, 321-326
11. Yu, I.-S., Chen, H.-J., Lee, Y.-S. E., Huang, P.-H., Lin, S.-R., Tsai, T.-W. y Lin, S.-W. (2000) *Thromb. Haemost.* 84, 865-870
12. Zacharski, L. R., Ornstein, D. L., Memoli, V. A., Rousseau, S. M. y Kisiel, W. (1998) *Thromb. Haemost.* 79, 876-877
13. Rapaport, S. I. y Rao, L. V. M. (1995) *Thromb. Haemost.* 74, 7-17
14. Mann, K. G. (1999) *Thromb. Haemost.* 82, 165-174

15. Torres-Rosado, A., O'Shea, K. S., Tsuji, A., Chou, S.-H. y Kurachi, K. (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7181-7185
16. Srikantan, V., Valladares, M., Rhim, J. S., Moul, J. W. y Srivastava, S. (2002) *Cancer Res.* 62, 6812-6816
17. Welsh, J. B., Sapinoso, L. M., Su, A. I., Kern, S. G., Wang-Rodriguez, J., Moskaluk, C. A., Frierson Jr., H. F. y Hampton, G. M. (2001) *Cancer Res.* 61, 5974-5978
18. Stamey, T. A., Warrington, J. A., Caldwell, M. C., Chen, Z., Fan, Z., Mahadevappa, M., McNeal, J. E., Nolley, R. y Zhang, Z. (2001) *J. Urol.* 166, 2171-2177
19. Magee, J. A., Araki, T., Patil, S., Ehrig, T., True, L., Humphrey, P. A., Catalona, W. J., Watson, M. A. y Milbrandt, J. (2001) *Cancer Res.* 61, 5692-5696
20. Dhanasekaran, S. M., Barrette, T. R., Ghosh, D., Shah, R., Varambally, S., Kurachi, K., Pienta, K. J., Rubin, M. A. y Chinnaiyan, A. M. (2001) *Nature* 412, 822-826
21. Luo, J., Duggan, D. J., Chen, Y., Sauvageot, J., Ewing, C. M., Bittner, M. L., Trent, J. M. y Isaacs, W. B. (2001) *Cancer Res.* 61, 4683-4688
22. Stephan, C., Yousef, G. M., Scorilas, A., Jung, K., Jung, M., Kristiansen, G., Hauptmann, S., Kishi, T., Nakamura, T., Loening, S. A. y Diamandis, E. P. (2004) *J. Urol.* 171, 187-191
23. Tanimoto, H., Yan, Y., Clarke, J., Korourian, S., Shigemasa, K., Parmley, T. H., Parham, G. P. y O'Brien, T. J. (1997) *Cancer Res.* 57, 2884-2887
24. Lin, C.-Y., Anders, J., Johnson, M., Sang, Q. A. y Dickson, R. B. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 18231-18236
25. Takeuchi, T., Shuman, M. A. y Craik, C. S. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 11054-11061
26. Birchmeier, C., Birchmeier, W., Gherardi, E. y Vande Woude, G. F. (2003) *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 915-925
27. Trusolino, L. y Comoglio, P. M. (2002) *Nature Rev. Cancer* 2, 289-300
28. Hartmann, G., Naldini, L., Weidner, K. M., Sachs, M., Vigna, E., Comoglio, P. M. y Birchmeier, W. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 11574-11578
29. Lokker, N. A., Mark, M. R., Luis, E. A., Bennett, G. L., Robbins, K. A., Baker, J. B. y Godowski, P. J. (1992) *EMBO J* 11, 2503-2510
30. Naka, D., Ishii, T., Yoshiyama, Y., Miyazawa, K., Hara, H., Hishida, T. y Kitamura, N. (1992) *J. Biol. Chem.* 267, 20114-20119
31. Gak, E., Taylor, W. G., Chan, A. M.-L. y Rubin, J. S. (1992) *FEBS Lett.* 311, 17-21
32. Miyazawa, K., Shimomura, T., Kitamura, A., Kondo, J., Morimoto, Y. y Kitamura, N. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 10024-10028
33. Lee, S.-L., Dickson, R. B. y Lin, C.-Y. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 36720-36725
34. Kirchhofer, D., Peek, M., Li, W., Stamos, J., Eigenbrot, C., Kadkhodayan, S., Elliott, J. M., Corpuz, R. T., Lazarus, R. A. y Moran, P. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 36341-36349
35. Naldini, L., Tamagnone, L., Vigna, E., Sachs, M., Hartmann, G., Birchmeier, W., Daikuhara, Y., Tsubouchi, H., Blasi, F. y Comoglio, P. M. (1992) *EMBO J.* 11, 4825-4833
36. Shimomura, T., Miyazawa, K., Komiyama, Y., Hiraoka, H., Naka, D., Morimoto, Y. y Kitamura, N. (1995) *Eur. J. Biochem.* 229, 257-261
37. Shimomura, T., Denda, K., Kitamura, A., Kawaguchi, T., Kito, M., Kondo, J., Kagaya, S., Qin, L., Takata, H., Miyazawa, K. y Kitamura, N. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 6370-6376
38. Lin, C.-Y., Anders, J., Johnson, M. y Dickson, R. B. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 18237-18242
39. Kawaguchi, T., Qin, L., Shimomura, T., Kondo, J., Matsumoto, K., Denda, K. y Kitamura, N. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 27558-27564
40. Marlor, C. W., Delaria, K. A., Davis, G., Muller, D. K., Greve, J. M. y Tamburini, P. P. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 12202-12208
41. Delaria, K. A., Muller, D. K., Marlor, C. W., Brown, J. E., Das, R. C., Roczniak, S. O. y Tamburini, P. P. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 12209-12214
42. Kelley, R. F., Yang, J., Eigenbrot, C., Moran, P., Peek, M., Lipari, M. T. y Kirchhofer, D. (2004) *Biochemistry* 43, 1223-1229
43. Mimms, L. T., Zampighi, G., Nozaki, Y., Tanford, C. y Reynolds, J. A. (1981) *Biochemistry* 20, 833-840
44. Kirchhofer, D., Yao, X., Peek, M., Eigenbrot, C., Lipari, M. T., Billeci, K. L., Maun, H. R., Moran, P., Santell, L., Wiesmann, C. y Lazarus, R. A. (2004) *J. Biol. Chem.* (**en prensa**)
45. Peek, M., Moran, P., Mendoza, N., Wickramasinghe, D. y Kirchhofer, D. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 47804-47809
46. Gmyrek, G. A., Walburg, M., Webb, C. P., Yu, H.-M., You, X., Darracott Vaughan, E., Vande Woude, G. F. y Kundsén, B. S. (2001) *Am. J. Pathol.* 159, 579-590
47. Knudsen, B. S., Gmyrek, G. A., Inra, J., Scherr, D. S., Vaughan, E. D., Nanus, D. M., Kattan, M. W., Gerald, W. L. y Vande Woude, G. F. (2002) *Urology* 60, 1113-1117
48. Zhu, X. y Humphrey, P. A. (2000) *Urology* 56, 1071-1074
49. Huntsman, D., Resau, J. H., Klineberg, E. y Auersperg, N. (1999) *Am. J. Pathol.* 155, 343-348
50. Wong, A. S. T., Pelech, S. L., Woo, M. M. M., Yim, G., Rosen, B., Ehlen, T., Leung, P. C. K. y Auersperg, N. (2001) *Oncogene* 20, 1318-1328
51. Stamos, J., Lazarus, R. A., Yao, X., Kirchhofer, D. y Wiesmann, C. (2004) *EMBO J.* 23, 2325-2335
52. Schmidt, C., Bladt, F., Goedecke, S., Brinkmann, V., Zschiesche, W., Sharpe, M., Gherardi, E. y Birchmeier, C. (1995) *Nature (London)* 373, 699-702
53. Uehara, Y., Minowa, O., Mori, C., Shiota, K., Kuno, J., Noda, T. y Kitamura, N. (1995) *Nature (London)* 373,

702-705

54. List, K., Haudenschild, C. C., Szabo, R., Chen, W., Wahl, S. M., Swaim, W., Engelholm, L. H., Behrendt, N. y Bugge, T. H. (2002) *Oncogene* 21, 3765-3779
55. Gailani, D., Lasky, N. M. y Broze Jr., G. J. (1997) *Blood Coag. Fibrinol.* 8, 134-144
- 5 56. Hathaway, W. E., Wuepper, K. D., Weston, W. L., Humbert, J. R., Rivers, R. P. A., Genton, E., August, C. S., Montgomery, R. R. y Mass, M. F. (1976) *Am. J. Med.* 60, 654-664
57. Carmeliet, P., Schoonjans, L., Kieckens, L., Ream, B., Degen, J., Bronson, R., De Vos, R., van den Oord, J. J., Collen, D. y Mulligan, R. C. (1994) *Nature* 368, 419-424
- 10 58. Hamasuna, R., Kataoka, H., Meng, J.-Y., Itoh, H., Moriyama, T., Wakisaka, S. y Koono, M. (2001) *Int. J. Cancer* 93, 339-345
59. Kataoka, H., Sukanuma, T., Shimomura, T., Itoh, H., Kitamura, N., Nabeshima, K. y Koono, M. (1999) *J. Histochem. Cytochem.* 47, 673-682
60. Kataoka, H., Itoh, H., Uchino, H., Hamasuna, R., Kitamura, N., Nabeshima, K. y Koono, M. (2000) *Cancer Lett.* 148, 127-134
- 15 61. Parr, C. y Jiang, W. G. (2001) *Int. J. Oncol.* 19, 857-863
62. Oberst, M., Anders, J., Xie, B., Singh, B., Ossandon, M., Johnson, M., Dickson, R. B. y Lin, C.-Y. (2001) *Am. J. Pathol.* 158, 1301-1311
63. Oberst, M. D., Johnson, M. D., Dickson, R. B., Lin, C.-Y., Singh, B., Stewart, M., Williams, A., al-Nafussi, A., Smyth, J. F., Gabra, H. y Sellar, G. C. (2002) *Clin. Cancer Res.* 8, 1101-1107
- 20 64. Denda, K., Shimomura, T., Kawaguchi, T., Miyazawa, K. y Kitamura, N. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 14053-14059
65. Qin, L., Denda, K., Shimomura, T., Kawaguchi, T. y Kitamura, N. (1998) *FEBS Lett.* 436, 111-114
66. Kataoka, H., Hamasuna, R., Itoh, H., Kitamura, N. y Koono, M. (2000) *Cancer Res.* 60, 6148-6159
67. Kataoka, H., Uchino, H., Denda, K., Kitamura, N., Itoh, H., Tsubouchi, H., Nabeshima, K. y Koono, M. (1998)
- 25 *Cancer Lett.* 128, 219-227
68. Yamauchi, M., Kataoka, H., Itoh, H., Seguchi, T., Hasui, Y. y Osada, Y. (2004) *J. Urol.* 171, 890-896
69. Dennis, M. S. y Lazarus, R. A. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 22129-22136
70. Dennis, M. S., Herzka, A. y Lazarus, R. A. (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 25411-25417

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de identificación de una sustancia inhibidora candidata que inhibe la activación por hepsina del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), comprendiendo dicho procedimiento: (a) poner en contacto una sustancia candidata con una primera muestra que comprende hepsina y un sustrato de pro-HGF, y (b) comparar la cantidad de activación del sustrato de pro-HGF en la muestra con la cantidad de activación del sustrato de pro-HGF en una muestra de referencia que comprende cantidades similares de hepsina y sustrato de pro-HGF como la primera muestra, pero que no se ha puesto en contacto con dicha sustancia candidata, por lo que una disminución en la cantidad de activación del sustrato de pro-HGF en la primera muestra en comparación con la muestra de referencia indica que la sustancia candidata es capaz de inhibir la activación por hepsina de HGF monocatenario (pro-HGF).
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la sustancia se une a hepsina o a pro-HGF.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que la sustancia compite con hepsina para unirse a pro-HGF.
4. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que la sustancia compite con pro-HGF para unirse a hepsina.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que la sustancia comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente el 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o el 99 % de identidad de secuencias con pro-HGF.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la secuencia de aminoácidos carece de al menos una porción de la cadena β de HGF.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la hepsina en la muestra está en una cantidad eficaz para activar dicho pro-HGF.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el sustrato de pro-HGF es un polipéptido que comprende HGF o fragmento del mismo que comprende una forma de tipo salvaje del enlace peptídico R494-V495.
9. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el sustrato de pro-HGF comprende un sitio de escisión de HGF humano que se ajusta al sitio de escisión consenso de proteasas en donde el sitio de escisión comprende residuo básico en la posición P_1 y dos residuos de aminoácidos hidrófobos en las posiciones P_1' y P_2' .
10. Una molécula antagonista que inhibe la activación de pro-HGF por hepsina y puede unirse a pro-HGF o hepsina para su uso en inhibir la activación de pro-HGF por hepsina en el tratamiento de una afección patológica asociada a la activación de c-met en un sujeto, en donde la molécula:
- (i) es un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a pro-HGF o hepsina;
 - (ii) comprende un polipéptido que comprende una secuencia del dominio de Kunitz (KD) que es capaz de inhibir la activación de pro-HGF por hepsina;
 - (iii) comprende al menos una porción del inhibidor-1, -1 B o -2 del activador del factor de crecimiento de hepatocitos humano (HAI-1, HAI-1B o HAI-2), o variante de los mismos;
 - (iv) compite con pro-HGF para unirse a hepsina y comprende un fragmento de HGF que puede unirse a hepsina y que carece de al menos una porción de la cadena β de HGF y tiene actividad de activación de c-met reducida en comparación con HGF de tipo salvaje; o
 - (v) compite con pro-HGF por unirse a hepsina y comprende un HGF mutante que tiene una secuencia de aminoácidos que tienen al menos aproximadamente el 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o el 99 % de identidad de secuencias con pro-HGF que puede unirse a hepsina y carece de capacidad para activar c-met.
11. La molécula antagonista para su uso según la reivindicación 10, en la que la secuencia del dominio de Kunitz (KD) comprende una secuencia del dominio 1 de Kunitz (KD-1).
12. La molécula antagonista para su uso según la reivindicación 10, en la que la porción del inhibidor-1, -1 B o -2 del activador del factor de crecimiento de hepatocitos humano (HAI-1, HAI-1 B o HAI-2), o variante de los mismos, comprende una secuencia del dominio de Kunitz (KD) que es capaz de inhibir la activación de pro-HGF por hepsina.
13. La molécula antagonista para su uso según las reivindicaciones 10 o 12, en la que la secuencia del dominio de Kunitz (KD) es:
- (i) la secuencia del dominio 1 de Kunitz (KD-1) del inhibidor-1,-1 B del activador del factor de crecimiento de hepatocitos humano (HAI-1, HAI-1B), o variante de los mismos; o
 - (ii) uno o ambos de los dominios de Kunitz del inhibidor-2 del activador del factor de crecimiento de hepatocitos humano (HAI-2), o variante del mismo.

14. La molécula antagonista para su uso según la reivindicación 10(v), en la que la cadena β de HGF está mutada o la molécula carece de al menos una porción de la cadena β de HGF.
- 5 15. La molécula antagonista para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, en donde la molécula está ligada a una toxina.
16. Uso de una molécula antagonista como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15 en la preparación de un medicamento para inhibir la activación de pro-HGF por hepsina en el tratamiento de una afección patológica asociada a la activación de c-met en un sujeto.
- 10 17. La molécula antagonista para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15 o el uso de la reivindicación 16, en donde la afección es un cáncer, un tumor, un trastorno proliferativo de células, un trastorno inmunitario o un trastorno relacionado con la angiogénesis.
- 15 18. La molécula antagonista para su uso según la reivindicación 17, en donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, carcinoma papilar, cáncer de colon, cáncer pancreático, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino, cáncer del sistema nervioso central, cáncer de próstata, sarcoma osteogénico, carcinoma renal, carcinoma hepatocelular, cáncer de vejiga, carcinoma gástrico, carcinoma escamoso de cabeza y cuello, melanoma o leucemia.
- 20 19. Una composición que comprende una molécula como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15 y un vehículo para su uso en el tratamiento como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 10 o 16 a 18.
- 25 20. La composición para su uso según la reivindicación 19, en la que el vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable.

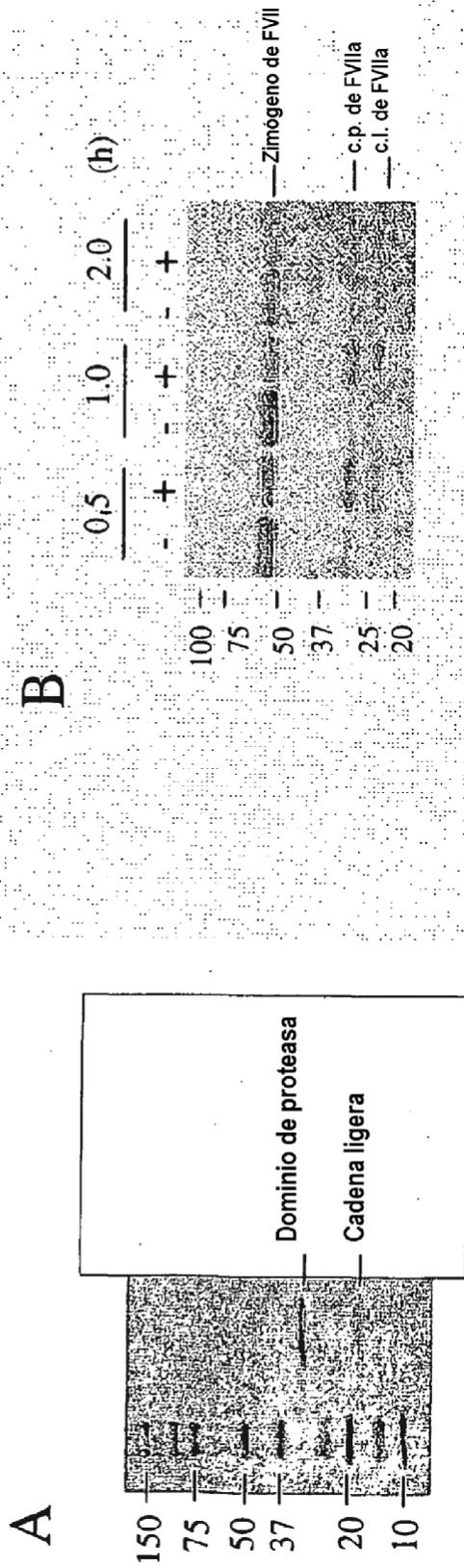


FIG._1

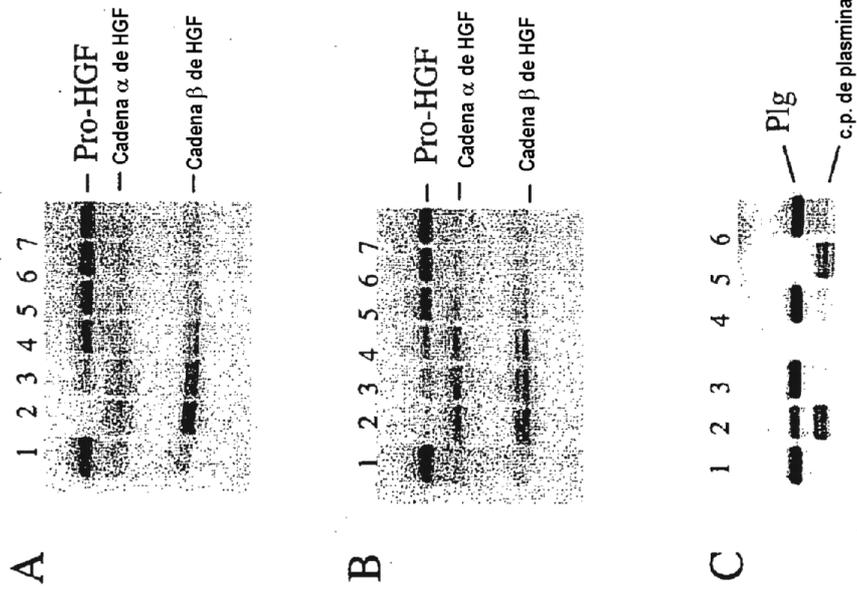


Fig._2

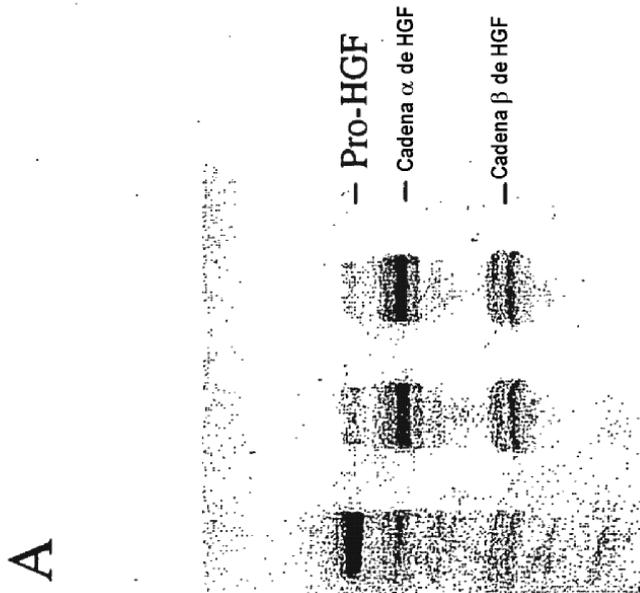
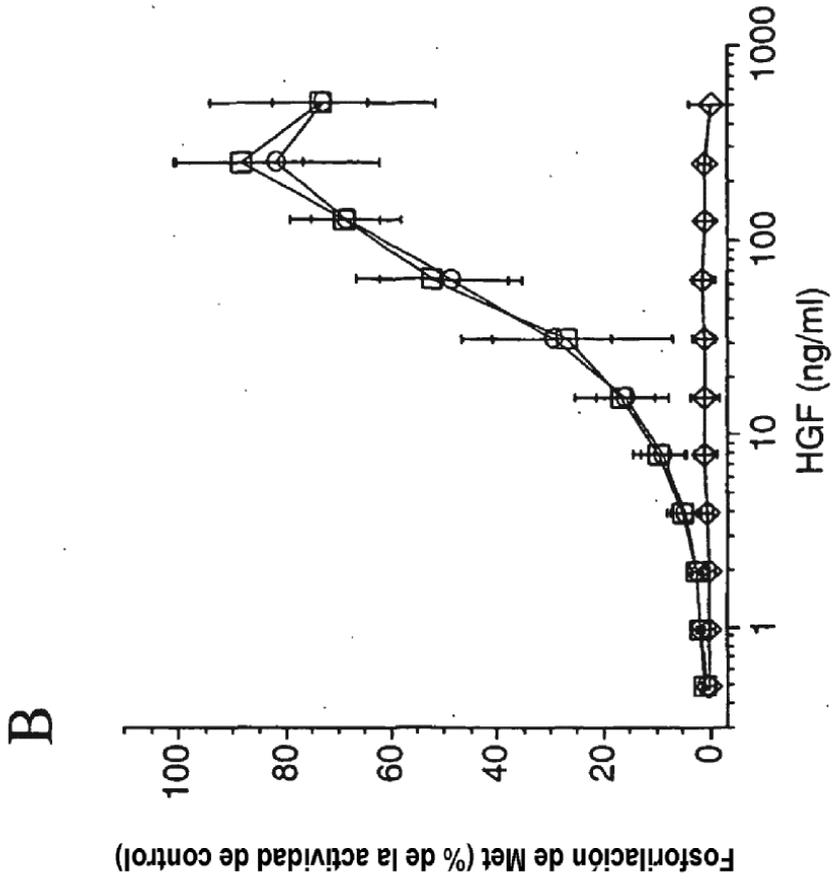


FIG. 3

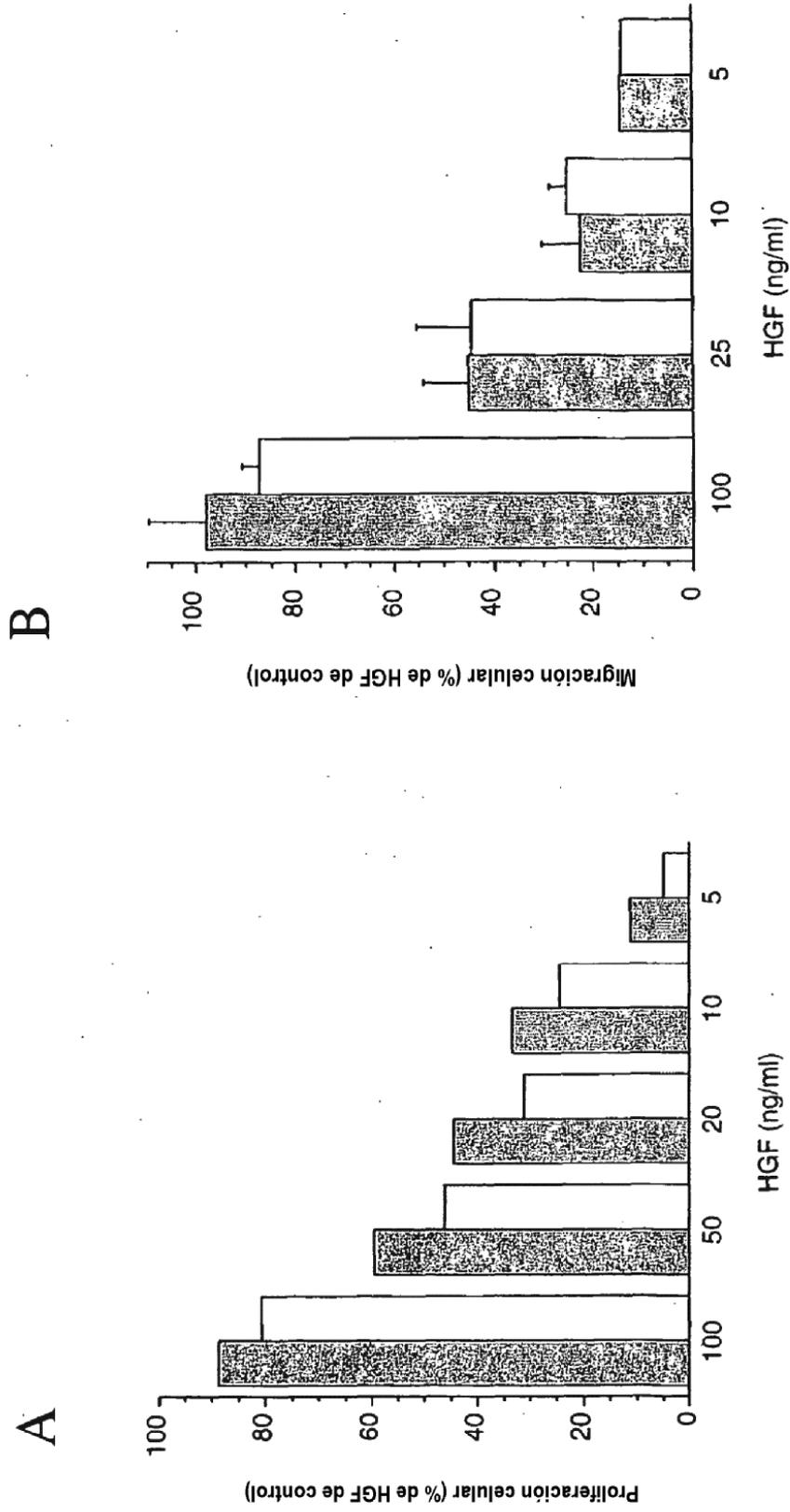


FIG._4

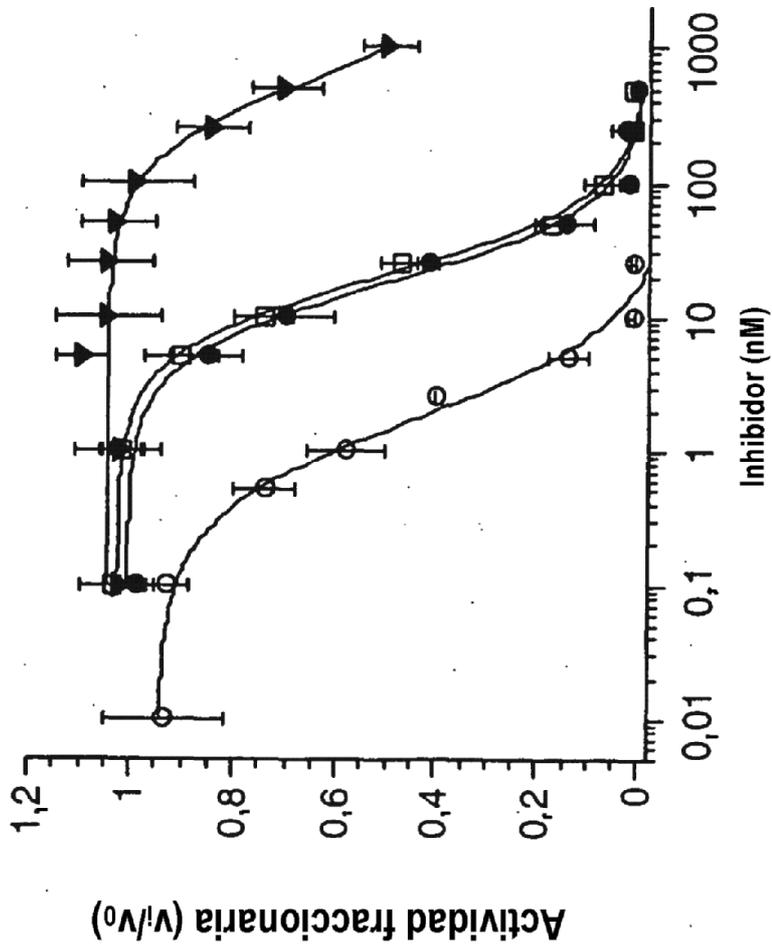


FIG._5

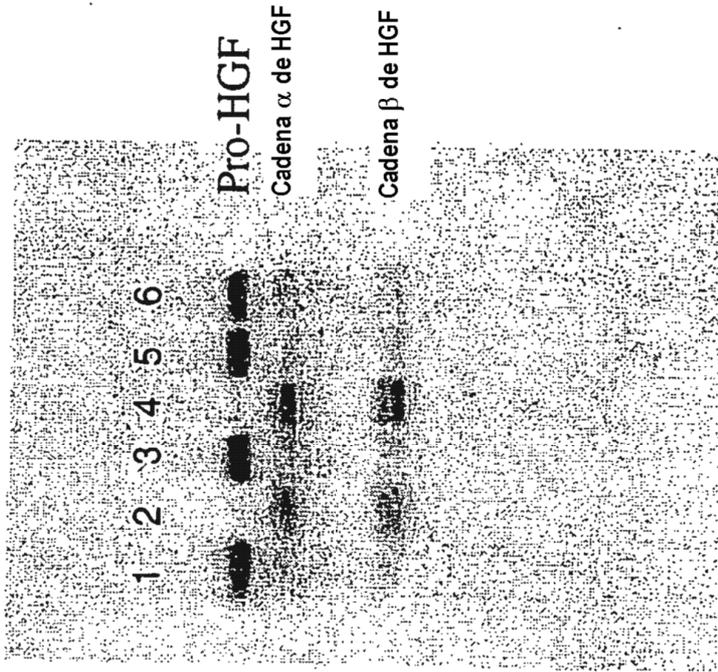


FIG._6

MAQKEGGRTPCCSRPKVAALTAGTLLLLTAIGAASWAJVAVLLRSDQEPLYPVQVSSAD
ARLMVFDKTEGTWRLLCSSRSNARVAGLSCEEMGFLRALTHSELDVRTAGANGTSGFFCV
DEGRLPHTQRLLLEVISVDCPCRGRFLAICQDCGRRKLPVDRIVGGRDTSLSRWPWQVSL
RYDGAHLCGGSLLSGDWVLTAAHCFPERNRVLSRWRVFAGAVAQASPHGLQLGVQAVVYH
GGYLPFRDPNSEENSNDIALVHLSPLPLTEYIQVPVCLPAAGQALVDGKICTVTGWGNTQ
YYGQAGVLEARVPIISNDVCSGADFYGNQIKPKMFCAGYPEGGIDACQGDSSGGPFVCE
DSISRTPRWRLCGIVSWGTCALAQKPGVYTKVSDFREWIFQAIKTHSEASGMVTQL

(SEC ID N°: 1)

FIG. 7

FIG._8A

Met	Ala	Gln	Lys	Glu	Gly	Gly	Arg	Thr	Val	Pro	Cys	Cys	Ser	Arg	Pro
1			5						10					15	
Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Thr	Ala	Gly	Thr	Leu	Leu	Leu	Leu	Thr	Ala	Ile
		20						25					30		
Gly	Ala	Ala	Ser	Trp	Ala	Ile	Val	Ala	Val	Leu	Leu	Arg	Ser	Asp	Gln
	35				40							45			
Glu	Pro	Leu	Tyr	Pro	Val	Gln	Val	Ser	Ser	Ala	Asp	Ala	Arg	Leu	Met
	50				55					60					
Val	Phe	Asp	Lys	Thr	Glu	Gly	Thr	Trp	Arg	Leu	Leu	Cys	Ser	Ser	Arg
	65				70				75					80	
Ser	Asn	Ala	Arg	Val	Ala	Gly	Leu	Ser	Cys	Glu	Glu	Met	Gly	Phe	Leu
			85						90					95	
Arg	Ala	Leu	Thr	His	Ser	Glu	Leu	Asp	Val	Arg	Thr	Ala	Gly	Ala	Asn
	100							105						110	
Gly	Thr	Ser	Gly	Phe	Phe	Cys	Val	Asp	Glu	Gly	Arg	Leu	Pro	His	Thr
	115						120						125		
Gln	Arg	Leu	Leu	Glu	Val	Ile	Ser	Val	Cys	Asp	Cys	Pro	Arg	Gly	Arg
	130				135						140				
Phe	Leu	Ala	Ala	Ile	Cys	Gln	Gly	Glu	Ile	Leu	Lys	Leu	Arg	Thr	Leu
	145				150					155				160	
Ser	Phe	Arg	Pro	Leu	Gly	Arg	Pro	Arg	Pro	Leu	Lys	Leu	Pro	Arg	Met
			165					170						175	
Gly	Pro	Cys	Thr	Phe	Arg	Pro	Pro	Arg	Ala	Gly	Pro	Ser	Leu	Gly	Ser
			180					185					190		
Gly	Asp	Leu	Gly	Ser	Ser	Pro	Pro	Leu	Ser	Pro	Pro	Pro	Ala	Asp	Pro
	195							200					205		
Pro	Thr	Asp	Cys	Gly	Arg	Arg	Lys	Leu	Pro	Val	Asp	Arg	Ile	Val	Gly
	210					215							220		
Gly	Arg	Asp	Thr	Ser	Leu	Gly	Arg	Trp	Pro	Trp	Gln	Val	Ser	Leu	Arg
	225					230				235					240

FIG. 8B

Tyr Asp Gly Ala His Leu Cys Gly Gly Ser Leu Leu Ser Gly Asp Trp
 245 250 255
 Val Leu Thr Ala Ala His Cys Phe Pro Glu Arg Asn Arg Val Leu Ser
 260 265 270
 Arg Trp Arg Val Phe Ala Gly Ala Val Ala Gln Ala Ser Pro His Gly
 275 280 285
 Leu Gln Leu Gly Val Gln Ala Val Tyr His Gly Gly Tyr Leu Pro
 290 295 300
 Phe Arg Asp Pro Asn Ser Glu Glu Asn Ser Asn Asp Ile Ala Leu Val
 305 310 315 320
 His Leu Ser Ser Pro Leu Pro Leu Thr Glu Tyr Ile Gln Pro Val Cys
 325 330 335
 Leu Pro Ala Ala Gly Gln Ala Leu Val Asp Gly Lys Ile Cys Thr Val
 340 345 350
 Thr Gly Trp Gly Asn Thr Gln Tyr Tyr Gly Gln Gln Ala Gly Val Leu
 355 360 365
 Gln Glu Ala Arg Val Pro Ile Ile Ser Asn Asp Val Cys Asn Gly Ala
 370 375 380
 Asp Phe Tyr Gly Asn Gln Ile Lys Pro Lys Met Phe Cys Ala Gly Tyr
 385 390 395 400
 Pro Glu Gly Gly Ile Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Phe
 405 410 415
 Val Cys Glu Asp Ser Ile Ser Arg Thr Pro Arg Trp Arg Leu Cys Gly
 420 425 430
 Ile Val Ser Trp Gly Thr Gly Cys Ala Leu Ala Gln Lys Pro Gly Val
 435 440 445
 Tyr Thr Lys Val Ser Asp Phe Arg Glu Trp Ile Phe Gln Ala Ile Lys
 450 455 460
 Thr His Ser Glu Ala Ser Gly Met Val Thr Gln Leu
 465 470 475

(SEC ID N°: 2)