

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 646**

51 Int. Cl.:

C07K 16/40 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.10.2010 E 10771616 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 2491059**

54 Título: **Anticuerpos anti-hepsina y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

22.10.2009 US 253953 P

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

27.04.2015

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse, 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**GANESAN, RAJKUMAR;
KIRCHHOFER, DANIEL;
MORAN, PAUL M. y
ZHANG, YINGNAN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 534 646 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

Anticuerpos anti-hepsina y métodos de uso de los mismos

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere generalmente al campo de la biología molecular. Más específicamente, la invención se refiere a anticuerpos anti-hepsina, y a usos de los mismos.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La hepsina es una serina proteasa de transmembrana de tipo II (TTSP) expresada sobre la superficie de células epiteliales. La proteína de 417 aminoácidos está compuesta por un dominio citoplásmico del extremo N corto, un dominio transmembrana y un único dominio rico en cisteína de receptor depurador que se compacta estrechamente contra el dominio de proteasa del extremo C (Somoza y col. (2003) Structure 11(9), 1123-1131). La función fisiológica de la hepsina no está clara. A pesar de su expresión en las fases muy tempranas de la embriogénesis (Vu y col. (1997) J Biol Chem 272 (50), 31315-31320), los ratones deficientes en hepsina fueron viables y se desarrollaron normalmente (Yu y col. (2000) Thromb Haemost 84(5), 865-870; Wu y col. (1998) J Clin Invest 101(2), 321-326). Se encontró que la hepsina no era esencial para la regeneración del hígado y para las funciones fisiológicas relacionadas con la coagulación (ídem). Un estudio reciente demostró que los ratones inactivados en hepsina están auditivamente alterados. Guipponi y col. (2007) Am J Pathol 171:608-616. Sin embargo, la hepsina participa en el cáncer de ovario [(Tanimoto y col. (1997) Cancer Res 57(14), 2884-2887); documento WO2001/62271] y de próstata. Varios estudios de expresión génica identificaron la hepsina como uno de los genes más altamente inducidos en cáncer de próstata (Dhanasekaran y col. (2001) Nature 412, 822-826; Luo y col. (2001) Cancer Res 61(12), 4683-4688; Magee y col. (2001) Cancer Res 61(15), 5692-5696; Stamey y col. (2001) J Urol 166(6), 2171-2177; Stephan y col. (2004) J Urol 171(1), 187-191; Welsh y col. (20010) Cancer Res 61(16), 5974-5978). Se encontró que los niveles de ARN de hepsina eran bajos en próstata normal e hiperplasia benigna, pero fuertemente elevados en carcinoma de próstata, particularmente en estadios avanzados ((Dhanasekaran y col. (2001) Nature 412, 822-826; Luo y col. (2001) Cancer Res 61(12), 4683-4688; Magee y col. (2001) Cancer Res 61(15), 5692-5696; Stamey y col. (2001) J Urol 166(6), 2171-2177; Stephan y col. (2004) J Urol 171(1), 187-191; Welsh y col. (20010) Cancer Res 61(16), 5974-5978). La tinción de la proteína hepsina con un anticuerpo anti-hepsina monoclonal mostró que la expresión de la hepsina era la mayor en sitios de metástasis al hueso y en tumores primarios de estadio tardío (Xuan y col. (2006) Cancer Res 66(7), 3611-3619), que está de acuerdo con el hallazgo de que niveles de ARN de hepsina elevados se correlacionaron con mayores grados de Gleason y progresión tumoral ((Luo y col. (2001) Cancer Res 61(12), 4683-4688; Magee y col. (2001) Cancer Res 61(15), 5692-5696; Stamey y col. (2001) J Urol 166(6), 2171-2177; Stephan y col. (2004) J Urol 171(1), 187-191; Chen y col. (2003) J Urol 169(4), 1316-1319).

La evidencia experimental de una función de la hepsina en el cáncer de próstata provino de un estudio por Klezovitch y col. (Klezovitch y col. (2004) Cancer Cell 6(2), 185-195) que demostró que en un modelo de ratón de cáncer de próstata no metastatizante, la expresión en exceso de hepsina condujo a la progresión de tumor primario y metástasis. Curiosamente, la expresión en exceso de hepsina se asoció a rotura de la membrana basal (ídem), indicando hacia la posibilidad de que la actividad de la hepsina estuviera algo asociada a la degradación de componentes de la membrana basal. *In vitro*, la hepsina puede convertir el factor de crecimiento latente el pro-factor de crecimiento de hepatocitos (pro-HGF) en su forma bicatenaria activa (HGF), que indujo la señalización del receptor de Met (Herter y col. (2005) Biochem J 390 (Pt 1), 125-136; Kirchhofer y col. (2005) FEBS Lett 579(9), 1945-1950; documento WO2006/014928). La hepsina también es capaz de convertir pro-uPA en su forma activa (Moran y col., (2006) J Biol Chem. 281(41):30439-46) y escindir lamina *in vitro* (Tripathi y col. (2008) J Biol Chem. 283:30576). Debido a que la ruta de HGF/Met participa en el crecimiento tumoral invasivo y la metástasis, es posible que la expresión en exceso de la hepsina active el eje de HGF/Met en cáncer de próstata (Herter y col. (2005) Biochem J 390 (Pt 1), 125-136; Kirchhofer y col. (2005) FEBS Lett 579(9), 1945-1950; documento WO2006/014928). También se mostró que la hepsina escindía otros sustratos *in vitro*, principalmente proteínas relacionadas con la coagulación (Herter y col., ídem; Kazama y col. (1995) J Biol Chem 270(1), 66-72). Sin embargo, no se conoce su función en la tumorigénesis.

Xuan y col. (2006) Cancer Res 66(7), 3611-3619, desvelan anticuerpos murinos monoclonales para una forma activable de hepsina, que neutralizaron parcialmente la actividad proteolítica en ensayos enzimáticos con el sustrato pNA.

El documento WO2004/33630 desvela anticuerpos producidos contra moléculas de hepsina modificadas, que bloquearon parcialmente la actividad proteolítica en ensayos enzimáticos con el sustrato cromogénico.

El documento WO2007/149932 desvela anticuerpos anti-hepsina monoclonales, que no afectan la actividad proteolítica de la hepsina.

65

Es evidente que sigue existiendo una necesidad de agentes que tengan atributos clínicos que sean óptimos para el desarrollo como agentes terapéuticos. La invención descrita en el presente documento satisface esta necesidad y proporciona otros beneficios.

5 SUMARIO DE LA INVENCION

La invención se basa en parte en la identificación de una variedad de agentes de unión a hepsina (tales como anticuerpos, y fragmentos de los mismos). La hepsina presenta una diana terapéutica importante y ventajosa, y la invención proporciona composiciones y métodos basados en la unión de los agentes a hepsina. Los agentes de unión a hepsina de la invención, como se describen en el presente documento, proporcionan importantes agentes terapéuticos y de diagnóstico para su uso en elegir como diana afecciones patológicas asociadas a la expresión y/o actividad de las rutas de señalización de hepsina. Por consiguiente, la invención proporciona métodos, composiciones, kits y artículos de fabricación relacionados con la unión a hepsina.

El sitio activo de las serina proteasas similares a tripsina, tales como hepsina, está formado por varios bucles intrínsecamente móviles (el 'dominio de activación') (Huber y Bode, 1978). En particular, el bucle 220 forma parte del bolsillo S1 y pueden adoptar diversos estados conformacionales en algunas serina proteasas (Johnson y col., 2005; Shia y col., 2005; Spraggon y col., 2009; Wilken y col., 2004). Sin embargo, las estructuras co-cristalinas de las serina proteasas con un inhibidor del sitio activo mostraron sitios activos apropiadamente formados, lo más probablemente debido a fuerzas estabilizantes aplicadas por el inhibidor (Ami y col., 1994; Shia y col., 2005; Spraggon y col., 2009). Se razonó que la ocupación del bolsillo S1 por un inhibidor de serina proteasa podía aplicar fuerzas estabilizantes sobre la flexibilidad del bucle del sitio activo de la serina proteasa, facilitando el reconocimiento de anticuerpos del sitio activo de la serina proteasa. Así, para identificar anticuerpos anti-hepsina que bloquean la actividad enzimática de hepsina, se obtuvieron anticuerpos que se unen a hepsina en el complejo con un inhibidor de serina proteasa que ocupa el bolsillo S1, 3,4-dicloro-isocumarina (DCI).

La presente invención proporciona anticuerpos que se unen a hepsina. En un aspecto, la invención caracteriza un anticuerpo aislado que se une a hepsina.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-hepsina aislado, en el que una forma monovalente (tal como una forma Fab) del anticuerpo se une específicamente a hepsina humana con una afinidad de unión de aproximadamente 10 nM o mejor. En algunas realizaciones, el anticuerpo se une específicamente a hepsina humana con una afinidad de unión de aproximadamente 6 nM o mejor. Como está bien establecido en la técnica, la afinidad de unión de un ligando a su receptor puede determinarse usando cualquiera de una variedad de ensayos, y expresarse en términos de una variedad de valores cuantitativos. Por consiguiente, en una realización, la afinidad de unión se expresa como valores de Kd y refleja afinidad de unión intrínseca (por ejemplo, con efectos de avididad minimizados). Generalmente y preferentemente, la afinidad de unión se mide *in vitro*, tanto en un entorno libre de células como asociado a células. Puede usarse cualquiera de varios ensayos conocidos en la técnica, que incluyen aquellos descritos en el presente documento, para obtener mediciones de afinidad de unión, que incluyen, por ejemplo, Biacore, radioinmunoensayo (RIA) y ELISA.

En otro aspecto, la invención proporciona anticuerpos anti-hepsina que se unen a la región de unión del dominio Kunitz de hepsina. En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-hepsina aislado que compite con un dominio Kunitz para unirse a hepsina. En una realización, dicha secuencia del dominio Kunitz es el dominio Kunitz 1 (KD1) de HAI-1 o HAI-1B. En una realización, la secuencia del dominio Kunitz es una secuencia de KD1 de variante que tiene al menos aproximadamente el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad de secuencias con KD1 no mutante de HAI-1 humano, en la que dicha secuencia de variante tiene al menos capacidad comparable a KD1 no natural en inhibir la actividad de hepsina. En una realización, dicha secuencia del dominio Kunitz es uno o ambos de los dominios Kunitz de HAI-2. En una realización, una secuencia del dominio Kunitz de HAI-2 de variante tiene entre aproximadamente el 70 % y el 99 %, aproximadamente el 75 % y el 98 %, aproximadamente el 80 % y 97 %, 85 % y el 95 % de identidad de secuencias con el (los) dominio(s) Kunitz correspondientes de HAI-2 humano natural, en el que dichas secuencias tienen al menos capacidad comparable a HAI-2 no mutante en actividad de hepsina inhibidora.

En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos anti-hepsina que se unen al sitio catalítico de hepsina.

En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos anti-hepsina que se unen a hepsina fuera del subsitio s1. En algunas realizaciones, los anticuerpos se unen al subsitio s2 y/o s3 de hepsina.

En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos anti-hepsina que se unen catalíticamente a hepsina inactivada.

En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos anti-hepsina que son resistentes a la proteólisis de la hepsina. En algunas realizaciones, los anticuerpos se exponen a hepsina durante 24 horas en condiciones que permiten la escisión de la hepsina del sustrato de hepsina.

65

5 En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos anti-hepsina que se unen a hepsina presente en un complejo que comprende hepsina y un inhibidor de serina proteasa que se une al subsitio S1 de hepsina. En algunas realizaciones, la hepsina presente en el complejo se inactiva. En algunas realizaciones, el inhibidor de serina proteasa es 3,4-dicloro-isocumarina (DCI). En algunas realizaciones, el inhibidor de serina proteasa se une a los residuos de aminoácidos catalíticos de hepsina Ser195 y His 57, por lo que la hepsina se inactiva.

10 En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos anti-hepsina que se unen específicamente a hepsina humana e inhiben sustancialmente la actividad enzimática de la hepsina *in vivo* y/o *in vitro*. En una realización, la actividad enzimática comprende la escisión del sustrato de polipéptido de hepsina. En una realización, el sustrato de polipéptido de hepsina es uno o más de pro-proteína estimulante de macrófagos (pro-MSP), pro-uPA, factor VII y pro-HGF. La activación por hepsina de pro-MSP se describe en la solicitud de patente provisional de EE. UU. del mismo solicitante en tramitación junto con la presente n.º 61/253.990, presentada el 22 de octubre de 2009. En una realización, la actividad enzimática comprende la escisión de un sustrato sintético de hepsina. En algunas realizaciones, el sustrato sintético de hepsina es un sustrato mostrado en la Tabla 1.

15 En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos anti-hepsina, en el que los anticuerpos inhiben sustancialmente la actividad catalítica de hepsina humana y/o de ratón. En algunas realizaciones, una forma monovalente de un anticuerpo anti-hepsina inhibe la actividad catalítica de hepsina humana con una Ki de aproximadamente (en algunas realizaciones, inferior a o igual a) 4 nM. En algunas realizaciones, una forma monovalente de un anticuerpo anti-hepsina inhibe la actividad catalítica de hepsina de ratón con una Ki de aproximadamente (en algunas realizaciones, inferior a o igual a) 330 nM.

20 En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos anti-hepsina, en el que los anticuerpos inhiben sustancialmente la escisión por hepsina de pro-uPA. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-hepsina inhiben la escisión por hepsina de pro-uPA con una CI₅₀ de aproximadamente 3 nM o más fuerte.

25 En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos anti-hepsina, en el que los anticuerpos inhiben sustancialmente la migración de células dependiente de laminina.

30 En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos anti-hepsina, en el que los anticuerpos se generaron por un método que comprende seleccionar anticuerpos que se unen al complejo que comprende (a) hepsina y (b) un inhibidor de serina proteasa que se une al subsitio S1 de hepsina. En algunas realizaciones, la hepsina presente en el complejo se inactiva. En algunas realizaciones, el inhibidor de serina proteasa es 3,4-dicloro-isocumarina (DCI). En algunas realizaciones, el inhibidor de serina proteasa se une a residuos de aminoácidos catalíticos de hepsina Ser195 e His 57, por lo que la hepsina se inactiva. En algunas realizaciones, antes de seleccionarse el anticuerpo, el anticuerpo se incuba con hepsina y el inhibidor de serina proteasa. En algunas realizaciones, el método comprende además la etapa de seleccionar anticuerpos que compiten por la unión a hepsina con un dominio Kunitz. En algunas realizaciones, el dominio Kunitz es KD1.

40 En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos anti-hepsina, en el que los anticuerpos se generaron por un método que comprende seleccionar (identificar) anticuerpos que compiten con un dominio Kunitz por la unión a hepsina. En algunas realizaciones, el dominio Kunitz es KD1.

45 En un aspecto, la invención proporciona anticuerpos anti-hepsina que no se escinden sustancialmente por hepsina. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-hepsina son sustancialmente resistentes a la escisión por hepsina.

Generalmente, los anticuerpos anti-hepsina de la presente invención son anticuerpos antagonistas.

50 En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-hepsina que comprende: seis regiones hipervariables (HVR) que consisten en:

- (a) HVR-L1 que comprende la secuencia RASQSVSSAVA (SEQ ID NO:1),
- (b) HVR-L2 que comprende la secuencia SASSLYS (SEQ ID NO:2),
- (c) HVR-L3 que comprende la secuencia QQYYSSYLLT (SEQ ID NO:3),
- 55 (d) HVR-H1 que comprende la secuencia GFNFYSYMH (SEQ ID NO:4),
- (e) HVR-H2 que comprende la secuencia ASIYSYGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:5), y
- (f) HVR-H3 que comprende la secuencia ARSDSWSYKSGYTQKIYSKGLDY (SEQ ID NO:6).

60 En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-hepsina que comprende (a) una cadena ligera que comprende (i) HVR-L1 que comprende la secuencia RASQSVSSAVA (SEQ ID NO:1); (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia SASSLYS (SEQ ID NO:2); y (iii) HVR-L3 que comprende la secuencia QQYYSSYLLT (SEQ ID NO:3);

y (b) una cadena pesada que comprende (i) HVR-H1 que comprende la secuencia GFNFSYSYMH (SEQ ID NO:4); (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia ASIYSYYGSTYYADSVK (SEQ ID NO:5); y (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia ARSDSWSYKSGYTQKIYSKGLDY (SEQ ID NO:6).

5 Las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1-6 están numeradas con respecto a HVR individuales (es decir, H1, H2 o H3) como se indica en la Figura 1, siendo la numeración de acuerdo con el sistema de numeración de Kabat como se describe más adelante.

10 Los anticuerpos de la invención pueden comprender cualquier secuencia del dominio variable de la región estructural adecuada, siempre que la actividad de unión a hepsina se retenga sustancialmente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención comprenden una secuencia consenso de la región estructural de la cadena pesada del subgrupo III humana. En una realización de estos anticuerpos, la secuencia consenso de la región estructural comprende una sustitución en la posición 71, 73 y/o 78. En algunas realizaciones de estos anticuerpos, la posición 71 es A, 73 es T y/o 78 es A. En una realización, estos anticuerpos comprenden secuencias de la región estructural del dominio variable de la cadena pesada de huMAb4D5-8 (HERCEPTIN[®], Genentech, Inc., South San Francisco, CA, EE. UU.) (también citadas en las patentes de EE. UU. n.º 6.407.213 y 5.821.337, y Lee y col., J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-1093). En una realización, estos anticuerpos comprenden además una secuencia consenso de la región estructural de la cadena ligera kl humana. En algunas realizaciones, la secuencia consenso de la región estructural comprende una sustitución en una posición 66. En algunas realizaciones, la posición 66 es G. En una realización particular, estos anticuerpos comprenden secuencias de HVR de la cadena ligera de huMAb4D5-8 como se describe en las patentes de EE. UU. n.º 6.407.213 y 5.821.337. En una realización, estos anticuerpos comprenden secuencias del dominio variable de la cadena ligera de huMAb4D5-8 (HERCEPTIN[®], Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA) (también citadas en las patentes de EE. UU. n.º 6.407.213 y 5.821.337, y Lee y col., J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-1093).

25 En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena pesada, en el que la secuencia de la región estructural comprende las secuencias desveladas en las Figuras 2A-B, y las secuencias de H1, H2 y H3 de HVR son SEQ ID NO: 4, 5 y/o 6, respectivamente.

30 En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena pesada, en el que la secuencia de la región estructural comprende la secuencia de SEQ ID NO 14-15, 48 y/o 16, y las secuencias de H1, H2 y H3 de HVR son SEQ ID NO: 4, 5 y/o 6, respectivamente. En otra realización, la secuencia de la región estructural comprende la secuencia de SEQ ID NO 14-15, 43 y/o 16, y las secuencias de H1, H2 y H3 de HVR son SEQ ID NO: 4, 5 y/o 6, respectivamente.

35 En una realización particular, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena ligera, en el que la secuencia de la región estructural comprende la secuencia de SEQ ID NO 17-20; 49-51 y 20; 52-54 y 20; y/o 55-57 y 20, respectivamente, y las secuencias de L1, L2 y L3 de HVR son SEQ ID NO: 1, 2 y/o 3, respectivamente. En otra realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena ligera, en el que la secuencia de la región estructural comprende la secuencia de SEQ ID NO 17-18, 58 y/o 20, y las secuencias de L1, L2 y L3 de HVR son SEQ ID NO: 1, 2 y/o 3, respectivamente. En otra realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena ligera, en el que la secuencia de la región estructural comprende la secuencia de SEQ ID NO 17, 18, 19 y/o 20, y las secuencias de L1, L2 y L3 de HVR son SEQ ID NO: 1, 2 y/o 3, respectivamente.

45 En una realización, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena pesada, en el que la secuencia de la región estructural comprende la secuencia de SEQ ID NO 14-15, 43 y/o 16, y las secuencias de H1, H2 y H3 de HVR son SEQ ID NO: 4, 5 y/o 6, respectivamente, y un dominio variable de la cadena ligera, en el que la secuencia de la región estructural comprende la secuencia de SEQ ID NO 17-18, 58 y/o 20, y las secuencias de L1, L2 y L3 de HVR son SEQ ID NO: 1, 2 y/o 3, respectivamente.

50 En otro aspecto, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 10 y/o un dominio variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 9.

55 En otro aspecto, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 10 y un dominio variable de la cadena ligera.

60 En otro aspecto, un anticuerpo de la invención comprende un dominio variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 9 y un dominio variable de la cadena pesada.

En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-hepsina que compite con cualquiera de los anticuerpos anteriormente mencionados para unirse a hepsina. En un aspecto, la invención proporciona un anticuerpo anti-

hepsina que se une al mismo epítipo o un epítipo similar sobre hepsina como cualquiera de los anticuerpos anteriormente mencionados.

5 Como se conoce en la técnica, y como se describe en mayor detalle en el presente documento más adelante, la posición/límite de aminoácido que delinea una región hipervariable de un anticuerpo puede variar, dependiendo del contexto y las diversas definiciones conocidas en la técnica (como se describe más adelante). Algunas posiciones dentro de un dominio variable pueden visualizarse como posiciones hipervariables híbridas porque estas posiciones pueden considerarse que están dentro de una región hipervariable bajo un conjunto de criterios, mientras que se consideran que están fuera de una región hipervariable bajo un conjunto diferente de criterios. Una o más de estas posiciones también pueden encontrarse en regiones hipervariables extendidas (como se define adicionalmente más adelante).

15 En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En otras realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo está seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo quimérico, un anticuerpo madurado por afinidad, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo humano. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂ o scFv.

20 En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, por ejemplo, un anticuerpo que comprende secuencias de unión al antígeno de un donante no humano injertado en una secuencia heteróloga no humana, humana o humanizada (por ejemplo, secuencias de la región estructural y/o del dominio constante). En una realización, el donante no humano es un ratón. En otra realización, una secuencia de unión al antígeno es sintética, por ejemplo, obtenida por mutagénesis (por ejemplo, cribado de expresión en fago, etc.). En una realización particular, un anticuerpo quimérico de la invención tiene regiones V murinas y una región C humana. En una realización, la región de la cadena ligera V murina está fusionada con una cadena ligera kappa humana. En otra realización, la región de la cadena pesada V murina está fusionada con una región C de IgG1 humana.

30 Los anticuerpos humanizados de la invención incluyen aquellos que tienen sustituciones de aminoácidos en la región estructural (FR) y variantes de maduración por afinidad con cambios en las CDR injertadas. Los aminoácidos sustituidos en CDR o FR no se limitan a aquellos presentes en el anticuerpo donante o receptor. En otras realizaciones, los anticuerpos de la invención comprenden además cambios en residuos de aminoácidos en la región Fc que conducen a función efectora mejorada que incluye función de CDC y/o ADCC potenciada y destrucción de linfocitos B. Otros anticuerpos de la invención incluyen aquellos que tienen cambios específicos que mejoran la estabilidad. En otras realizaciones, los anticuerpos de la invención comprenden cambios en residuos de aminoácidos en la región Fc que conducen a función efectora reducida, por ejemplo, función de CDC y/o ADCC reducida y/o destrucción de linfocitos B reducida. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se caracterizan por unión reducida (tal como ausencia de unión) al factor del complemento humano C1q y/o receptor de Fc humano sobre linfocitos citolíticos espontáneos (NK). En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se caracterizan por unión reducida (tal como la ausencia de unión) a Fc γ RI, Fc γ RIIA y/o Fc γ RIIIA humano. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención son de la clase IgG (por ejemplo, IgG1 o IgG4) y comprenden al menos una mutación en E233, L234, G236, D265, D270, N297, E318, K320, K322, A327, A330, P331 y/o P329 (numeración según el índice EU). En algunas realizaciones, los anticuerpos comprenden las mutaciones L234A/L235A o D265A/N297A.

45 En un aspecto, la invención proporciona polipéptidos de unión a hepsina que comprenden cualquiera de las secuencias de unión al antígeno proporcionadas en el presente documento, en los que los polipéptidos de unión a hepsina se unen específicamente a una hepsina, por ejemplo, una hepsina humana y/o de cinomolgo y/o de ratón.

50 Los anticuerpos de la invención se unen (tal como se unen específicamente) a hepsina, y en algunas realizaciones, pueden modular (por ejemplo inhibir) uno o más aspectos de la actividad de hepsina (tal como actividad enzimática de la hepsina) y/o rotura de cualquier hepsina biológicamente relevante y/o ruta biológica de sustrato de polipéptido de hepsina, y/o tratamiento y/o prevención de un tumor, trastorno proliferativo de células o un cáncer; y/o tratamiento o prevención de un trastorno asociado a la expresión y/o actividad de hepsina (tal como elevada expresión y/o actividad de hepsina). En algunas realizaciones, el anticuerpo para hepsina se une específicamente a un polipéptido que consiste en o que consiste esencialmente en una hepsina (por ejemplo, una hepsina humana y/o de ratón). En una realización, la actividad enzimática de la hepsina comprende la escisión de sustrato de polipéptido de hepsina. En una realización, el sustrato de polipéptido de hepsina es uno o más de pro-proteína estimulante de macrófagos (pro-MSP), pro-uPA, factor VII y pro-HGF.

60 En una realización, un anticuerpo de la invención no es un anticuerpo anti-hepsina descrito en Cancer Research, volumen 66, páginas 3611-3619, publicado en 2006 (por ejemplo, anticuerpo 1A12, 85B11, 94A7, A6, A174, A21 y/o A24 como se ejemplifica en la Figura 4), o un anticuerpo para hepsina aislado desvelado en las publicaciones PCT WO2004/033630 (por ejemplo, anticuerpo 47A5, 14C7, 46D12, 38E2, 37G10, 31C1, 11C1 y/o 72H6 citado en la página 93 y en las Figuras 15A-D) o un anticuerpo para hepsina aislado desvelado en Xuan y col. (2006) Cancer Res 66(7), 3611, o un anticuerpo para hepsina desvelado en el documento WO2007/149932.

5 En una realización, un anticuerpo de la invención no compite para unirse a hepsina humana con un anticuerpo anti-hepsina descrito en Cancer Research, volumen 66, páginas 3611-3619, publicado en 2006 (por ejemplo, anticuerpo 1A12, 85B11, 94A7, A6, A174, A21 y/o A24 como se ejemplifica en la Figura 4), o un anticuerpo para hepsina aislado desvelado en las publicaciones PCT WO2004/033630 (por ejemplo, anticuerpo 47A5, 14C7, 46D12, 38E2, 37G10, 31C1, 11C1 y/o 72H6 citado en la página 93 y en las Figuras 15A-D) o un anticuerpo para hepsina aislado desvelado en Xuan y col. (2006) Cancer Res 66(7), 3611, o un anticuerpo para hepsina desvelado en el documento WO2007/149932.

10 En una realización, un anticuerpo de la invención no se une al mismo epítipo sobre hepsina humana que un anticuerpo anti-hepsina descrito en Cancer Research, volumen 66, páginas 3611-3619, publicado en 2006 (por ejemplo, anticuerpo 1A12, 85B11, 94A7, A6, A174, A21 y/o A24 como se ejemplifica en la Figura 4), o un anticuerpo para hepsina aislado desvelado en las publicaciones PCT WO2004/033630 (por ejemplo, anticuerpo 47A5, 14C7, 46D12, 38E2, 37G10, 31C1, 11C1 y/o 72H6 citado en la página 93 y en las Figuras 15A-D) o un anticuerpo para hepsina aislado desvelado en Xuan y col. (2006) Cancer Res 66(7), 3611, o un anticuerpo para hepsina desvelado en el documento WO2007/149932.

15 En un aspecto, la invención proporciona composiciones que comprenden uno o más anticuerpos de la invención y un vehículo. En una realización, el vehículo es farmacéuticamente aceptable.

20 En otro aspecto, la invención proporciona ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo para hepsina de la invención.

En otro aspecto más, la invención proporciona vectores que comprenden un ácido nucleico de la invención.

25 En otro aspecto, la invención proporciona composiciones que comprenden uno o más ácidos nucleicos de la invención y un vehículo. En una realización, el vehículo es farmacéuticamente aceptable.

30 En un aspecto, la invención proporciona células huésped que comprenden un ácido nucleico o un vector de la invención. Un vector puede ser de cualquier tipo, por ejemplo, un vector recombinante tal como un vector de expresión. Puede usarse cualquiera de una variedad de células huésped. En una realización, una célula huésped es una célula procariota, por ejemplo, *E. coli*. En otra realización, una célula huésped es una célula eucariota, por ejemplo, una célula de mamífero tal como célula de ovario de hámster chino (CHO).

35 En otro aspecto, la invención proporciona métodos de preparación de un anticuerpo de la invención. Por ejemplo, la invención proporciona métodos de preparación de un anticuerpo anti-hepsina (que, como se define en el presente documento, incluye anticuerpo de longitud completa y fragmentos del mismo), comprendiendo dicho método cultivar una célula huésped que comprende ácido nucleico que codifica el anticuerpo humanizado de manera que el ácido nucleico se exprese. En algunas realizaciones, el método comprende además recuperar el anticuerpo del cultivo de células huésped. En algunas realizaciones, el anticuerpo se recupera del medio de cultivo de células huésped. En algunas realizaciones, el método comprende además combinar el anticuerpo recuperado con un vehículo, excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable para preparar una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo humanizado. En algunas realizaciones, la invención proporciona métodos de preparación de un anticuerpo anti-hepsina, comprendiendo dicho método seleccionar anticuerpos que se unen al complejo que comprende (a) hepsina y (b) un inhibidor de serina proteasa que se une al subsitio S1 de hepsina. En algunas realizaciones, la hepsina presente en el complejo se inactiva. En algunas realizaciones, el inhibidor de serina proteasa es 3,4-dicloro-isocumarina (DCI). En algunas realizaciones, el inhibidor de serina proteasa se une a los residuos de aminoácidos catalíticos de hepsina Ser195 e His 57, por lo que se inactiva la hepsina. En algunas realizaciones, antes de seleccionar el anticuerpo, el anticuerpo se incuba con hepsina y el inhibidor de serina proteasa. En algunas realizaciones, el método comprende además la etapa de seleccionar anticuerpos que compiten por la unión a hepsina con un dominio Kunitz. En algunas realizaciones, el dominio Kunitz es KD1.

50 En un aspecto, la invención proporciona un artículo de fabricación que comprende un recipiente; y una composición contenida dentro del recipiente, en el que la composición comprende uno o más anticuerpos para hepsina de la invención. En una realización, la composición comprende un ácido nucleico de la invención. En otra realización, una composición que comprende un anticuerpo comprende además un vehículo, que en algunas realizaciones es farmacéuticamente aceptable. En una realización, un artículo de fabricación de la invención comprende además instrucciones para administrar la composición (por ejemplo, el anticuerpo) a un individuo (tal como instrucciones para cualquiera de los métodos descritos en el presente documento).

60 En otro aspecto, la invención proporciona un kit que comprende un primer recipiente que comprende una composición que comprende uno o más anticuerpos anti-hepsina de la invención; y un segundo recipiente que comprende un tampón. En una realización, el tampón es farmacéuticamente aceptable. En una realización, una composición que comprende un anticuerpo comprende además un vehículo, que en algunas realizaciones, es farmacéuticamente aceptable. En otra realización, un kit comprende además instrucciones para administrar la composición (por ejemplo, el anticuerpo) a un individuo.

65

La ruta de hepsina participa en múltiples funciones biológicas y fisiológicas, que incluyen, por ejemplo, activación de la ruta de HGF/c-met, activación de la ruta de MSP/Ron, rotura/degradación de la membrana basal, degradación de matrices, etc. Estas funciones están a su vez frecuentemente desreguladas en trastornos tales como cáncer. Así, en otro aspecto, la invención proporciona un método para inhibir la rotura/degradación de la membrana basal y/o degradación de matrices, comprendiendo dicho método poner en contacto una célula o tejido con un antagonista de la invención, por lo que se inhibe la rotura/degradación de la membrana basal y/o degradación de matrices. En otro aspecto más, la invención proporciona un método para inhibir la rotura/degradación de la membrana basal y/o degradación de matrices, comprendiendo dicho método administrar a una célula, tejido y/o sujeto con una afección asociada a rotura/degradación anormal de la membrana basal y/o degradación de matrices un antagonista de la invención, por lo que se inhibe la rotura/degradación de la membrana basal y/o degradación de matrices.

En un aspecto, la invención proporciona un método para tratar o prevenir un trastorno asociado a elevada actividad de hepsina, comprendiendo dicho método administrar a un sujeto en necesidad de tal tratamiento una cantidad eficaz de un antagonista de la invención, tratándose o previniéndose así eficazmente dicho trastorno. En una realización, dicho trastorno es cáncer.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de un anticuerpo anti-hepsina de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de un trastorno, tal como un cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo de células. En algunas realizaciones, el cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo de células es cáncer de próstata. En algunas realizaciones, el cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo de células es cáncer de ovario o renal.

En un aspecto, la invención proporciona el uso de un ácido nucleico de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de un trastorno, tal como un cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo de células. En algunas realizaciones, el cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo de células es cáncer de próstata. En algunas realizaciones, el cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo de células es cáncer de ovario o renal.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de un vector de expresión de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de un trastorno, tal como un cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo de células. En algunas realizaciones, el cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo de células es cáncer de próstata. En algunas realizaciones, el cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo de células es cáncer de ovario o renal.

En otro aspecto más, la invención proporciona el uso de una célula huésped de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de un trastorno, tal como un cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo de células. En algunas realizaciones, el cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo de células es cáncer de próstata. En algunas realizaciones, el cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo de células es cáncer de ovario o renal.

En otro aspecto, la invención proporciona el uso de un artículo de fabricación de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de un trastorno, tal como un cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo de células. En algunas realizaciones, el cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo de células es cáncer de próstata. En algunas realizaciones, el cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo de células es cáncer de ovario o renal.

En un aspecto, la invención también proporciona el uso de un kit de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de un trastorno, tal como un cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo de células. En algunas realizaciones, el cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo de células es cáncer de próstata. En algunas realizaciones, el cáncer, un tumor y/o un trastorno proliferativo de células es cáncer de ovario o renal.

La invención proporciona métodos y composiciones útiles para modular trastornos asociados a la expresión y/o señalización de hepsina, tal como elevada expresión y/o señalización o expresión y/o señalización no deseada.

Pueden usarse métodos de la invención para afectar cualquier estado patológico adecuado. Trastornos a modo de ejemplo se describen en el presente documento, e incluyen un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de ovario, cáncer de tiroides, cáncer testicular, cáncer endometrial, cáncer de cabeza y cuello (por ejemplo, carcinoma de células escamosas de la cabeza y el cuello), cáncer cerebral (por ejemplo, neuroblastoma o meningioma), cáncer de piel (por ejemplo, melanoma, carcinoma de células basales o carcinoma de células escamosas), cáncer de vejiga (por ejemplo, carcinoma de células transitorias), carcinoma de mama, cáncer gástrico, cáncer colorrectal (CRC), carcinoma hepatocelular, cáncer de cuello uterino, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer de próstata y cáncer renal, y cáncer endometrial.

En una realización, una célula que es elegida como diana en un método 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 (por ejemplo, una célula de cáncer de pulmón de células no pequeñas), una célula de cáncer de tiroides, una célula de mieloma múltiple, una célula de

5 cáncer testicular, una célula de carcinoma papilar, una célula de cáncer de colon, una célula de cáncer pancreático, una célula de cáncer de ovario, una célula de cáncer cervical, una célula de cáncer del sistema nervioso central, una célula de sarcoma osteogénico, una célula de carcinoma renal, una célula de carcinoma hepatocelular, una célula de

10 cáncer de vejiga (por ejemplo, una célula de carcinoma de células transitorias), una célula de carcinoma gástrico, una célula de carcinoma escamoso de la cabeza y el cuello, una célula de melanoma, una célula de leucemia, una célula de cáncer endometrial y una célula de adenoma de colon. En una realización, una célula que es elegida como diana en un método de la invención es una célula hiperproliferativa y/o hiperplásica. En otra realización, una célula que es elegida como diana en un método de la invención es una célula displásica. En otra realización más, una célula que es elegida como diana en un método de la invención es una célula metastásica.

15 Los métodos de la invención pueden comprender además etapas de tratamiento adicionales. Por ejemplo, en una realización, un método comprende además una etapa en la que una célula y/o tejido elegido como diana (por ejemplo, una célula cancerosa) se expone a tratamiento con radiación o un agente quimioterapéutico.

En un aspecto, la invención proporciona métodos que comprenden la administración de una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-hepsina en combinación con una cantidad eficaz de otro agente terapéutico (tal como un agente antiangiogénesis, otro anticuerpo, un agente quimioterapéutico, un agente citotóxico, un agente inmunosupresor, un profármaco, una citocina, radioterapia citotóxica, un corticosteroide, un antiemético, una vacuna para el cáncer, un analgésico, o un agente inhibidor del crecimiento). Por ejemplo, los anticuerpos anti-hepsina se usan en

20 combinaciones con un agente antineoplásico o un agente antiangiogénico para tratar diversas afecciones neoplásicas o no neoplásicas.

Dependiendo de la indicación específica del cáncer que va a tratarse, la terapia de combinación de la invención puede combinarse con agentes terapéuticos adicionales, tales como agentes quimioterapéuticos, o terapias

30 adicionales tales como radioterapia o cirugía. Pueden usarse muchos agentes quimioterapéuticos conocidos en la terapia de combinación de la invención. Preferentemente, se usarán aquellos agentes quimioterapéuticos que son estándar para el tratamiento de las indicaciones específicas. La dosificación o frecuencia de cada agente terapéutico que va a usarse en la combinación es preferentemente la misma que, o inferior a, la dosificación o frecuencia del agente correspondiente cuando se usa sin el (los) otro(s) agente(s).

35 En otro aspecto, la invención proporciona cualquiera de los anticuerpos anti-hepsina descritos en el presente documento, en los que el anticuerpo anti-hepsina comprende una marca detectable.

En otro aspecto, la invención proporciona un complejo de cualquiera de los anticuerpos anti-hepsina descritos en el presente documento y hepsina. En algunas realizaciones, el complejo es *in vivo* o *in vitro*. En algunas realizaciones,

40 el complejo comprende una célula cancerosa. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-hepsina está detectablemente marcado.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

45 FIGURAS 1: Secuencias del bucle de HVR de la cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo anti-hepsina. La figura muestra las secuencias de HVR de la cadena pesada, H1, H2 y H3, y las secuencias de HVR de la cadena ligera, L1, L2 y L3. La numeración de secuencias es del siguiente modo:

50 Clon 25 (HVR-H1 es SEQ ID NO: 4; HVR-H2 es SEQ ID NO: 5; HVR-H3 es SEQ ID NO: 6; HVR-L1 es SEQ ID NO: 1; HVR-L2 es SEQ ID NO: 2; HVR-L3 es SEQ ID NO: 3);
Las posiciones de aminoácidos están numeradas según el sistema de numeración de Kabat como se describe más adelante.

55 FIGURAS 2A, 2B y 3: Representan secuencias de la región estructural consenso humanas aceptoras a modo de ejemplo para su uso en la puesta en práctica de la presente invención con identificadores de secuencia del siguiente modo:

60 Regiones estructurales consenso pesadas variables (VH) (FIG. 2A, 2B)
región estructural consenso del subgrupo I de VH humana menos las CDR de Kabat (SEQ ID NO 21-23 y 16, respectivamente)
región estructural consenso del subgrupo I de VH humana menos las regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NO 24-25, 23 y 16; 24-26 y 16; y 24-25, 27 y 16, respectivamente)
región estructural consenso del subgrupo II de VH humana menos las CDR de Kabat (SEQ ID NO 28-30 y 16, respectivamente)

región estructural consenso del subgrupo II de VH humana menos las regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NO 31-32, 30 y 16; 31-33 y 16; y 31-32, 34 y 16, respectivamente)

región estructural consenso del subgrupo II de VH humana menos las extendidas

5 región estructural consenso del subgrupo III de VH humana menos las CDR de Kabat (SEQ ID NO 35-37 y 16, respectivamente)

región estructural consenso del subgrupo III de VH humana menos las regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NO 14-15, 37 y 16; 14-15, 38 y 16; y 14-15, 43 y 16, respectivamente)

región estructural aceptora de VH humana menos las CDR de Kabat (SEQ ID NO 39, 36, 40 y 16, respectivamente)

10 región estructural aceptora de VH humana menos las regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NO 14-15, 40 y 16; y 14-15, 41 y 16, respectivamente)

región estructural aceptora 2 de VH humana menos las CDR de Kabat (SEQ ID NO 39, 36, 42 y 16, respectivamente)

región estructural aceptora 2 de VH humana menos las regiones hipervariables extendidas (SEQ ID NO 14-15, 42 y 16; 14-15, 44 y 16; y 14-15, 48 y 16, respectivamente)

15 Regiones estructurales consenso ligeras variables (VL) (FIG. 3)

región estructural consenso del subgrupo I de VL kappa humana (SEQ ID NO 17-20, respectivamente)

región estructural consenso del subgrupo II de VL kappa humana (SEQ ID NO 49-51 y 20, respectivamente)

20 región estructural consenso del subgrupo III de VL kappa humana (SEQ ID NO 52-54 y 20, respectivamente)

región estructural consenso del subgrupo IV de VL kappa humana (SEQ ID NO 55-57 y 20, respectivamente)

FIGURA 4: Representa secuencias de la región estructural de cadenas ligeras de huMAb4D5-8 (SEQ ID NO 17-18, 58 y 20, respectivamente, en orden de aparición) y pesadas (SEQ ID NO 14-15, 48 y 16, respectivamente, en orden de aparición). Los números en superíndice/negrita indican posiciones de aminoácidos según Kabat.

FIGURA 5: Representa secuencias de la región estructural modificadas/variantes de cadenas ligeras de huMAb4D5-8 (SEQ ID NO 17-20, respectivamente, en orden de aparición) y pesadas (SEQ ID NO 14-15, 43 y 16, respectivamente, en orden de aparición). Los números en superíndice/negrita indican posiciones de aminoácidos según Kabat.

FIGURA 6: Representa la región variable de la cadena pesada del anticuerpo anti-hepsina mab 25 (SEQ ID NO: 10) y la región variable de la cadena ligera (SEQ ID NO: 9).

FIGURA 7: Una realización de una secuencia de aminoácidos de hepsina humana nativa.

35 FIGURA 8A y B: Otra realización de una secuencia de aminoácidos de hepsina humana nativa.

FIGURA 9: Inactivación de hepsina por 3,4-dicloro-isocumarina (DCI). A. Inhibición dependiente de la concentración de la actividad enzimática hacia el sustrato S2765 después de una incubación de 40 min de hepsina con concentraciones de DCI crecientes. B. Estructura química de DCI y sus posibles aductos con hepsina según (Powers y col., 1989).

FIGURA 10: KD1 compete con el Fab-fago anti-hepsina para unirse a hepsina. Unión de Fab25-fago a hepsina en presencia de concentraciones crecientes de KD1.

FIGURA 11: Inhibición de la actividad enzimática de la hepsina humana y murina por Fab25. Se incubaron hepsina humana (hu) y murina (mu) con Fab25 o un Fab de control (Fab ctrl) durante 40 min antes de la adición del sustrato S2765. Se midieron las velocidades lineales iniciales en un lector de microplacas cinético y se expresó la actividad enzimática como actividad fraccionaria (v_i/v_0).

45 FIGURA 12: Especificidad de Fab25. Se incubó Fab25 (1 μ M) con hepsina y 9 serina proteasas similares a tripsina durante 40 min antes de la adición de sustratos de para-nitroanilida (pNA) sintéticos. Se midieron las velocidades lineales iniciales en un lector de microplacas cinético y se expresó la actividad enzimática como actividad fraccionaria (v_i/v_0).

50 FIGURA 13: Inhibición por Fab25 del procesamiento del sustrato macromolecular por hepsina. A. Inhibición de la activación de pro-uPA por Fab25. El efecto de Fab25 sobre el procesamiento mediado por hepsina de pro-uPA se determinó en un ensayo enzimático de dos etapas. Se midieron las velocidades lineales iniciales en un lector de microplacas cinético y se expresó la actividad enzimática como actividad fraccionaria (v_i/v_0). Por uso de una curva patrón de uPA, se determinó que la tasa sin inhibir de la formación de uPA por hepsina era $0,81 \pm 0,22 \mu$ M de uPA/min (n=3). La inhibición del procesamiento del sustrato de hepsina por Fab25 se realizó para 3 sustratos conocidos: B. factor VII (FVII); C. pro-HGF; y D. pro-MSP. La escisión del factor VII por hepsina se llevó a cabo durante 0,5 h y 2,0 h en presencia o ausencia de Fab25 y un Fab de control (Fab ctrl), mientras que los experimentos de escisión de pro-HGF y pro-MSP se realizaron durante 30 min. Las alícuotas de reacción se analizaron por SDS-PAGE (condiciones reductoras) y geles teñidos.

60 FIGURA 14: Efectos de la integridad de Fab25 después de la exposición prolongada a hepsina. El bucle de CDR-H3 en Fab25 contiene tres lisinas y un residuo de arginina que podría ser posiblemente escindido por hepsina, pero no se observó procesamiento proteolítico de Fab25 por hepsina cuando se incubó durante 24 h tanto a pH 6,0 como a pH 8,0. La proteólisis se monitorizó por desplazamiento de la movilidad del gel en un gel de gradiente de 4-20 % (peso/volumen) de poli(acrilamida) y se teñió con azul brillante de Coomassie.

FIGURA 15: Inhibición por Fab25 de la migración dependiente de laminina de células DU145. A. Se añadieron células DU145 (2×10^4) en medio Eagle modificado por Dulbecco libre de suero a cámaras superiores pretratadas de insertos FluoroBlok y se dejaron migrar durante 5 h a 37 °C. Después de la incubación, se lavaron células no migratorias y medios y aquellas células que migraron al fondo de los filtros se fijaron, se tiñeron con YO-PRO-1 y se obtuvieron imágenes usando un microscopio invertido. Se tomaron imágenes representativas de filtros pretratados (laminina, laminina co-incubada con hepsina, complejo de laminina co-incubada con hepsina:Fab25 o control de PBS) con células fijadas. B. Medida de unidades relativas de fluorescencia (U.R.F) de células teñidas con los sustratos YO-PRO que se restan de la referencia para pocillos de PBS. Las células DU145 tratadas con laminina procesada con hepsina tuvieron marcados aumentos en la migración en comparación con células que se tratan con laminina sola. La ausencia de procesamiento de laminina por hepsina en presencia de Fab25 da DU145 que son menos migratorias.

FIGURA 16: A. Activación de pro-MSP por hepsina expresada en la superficie celular en células LnCap-34. Las células LnCap-34 que expresan establemente en exceso hepsina se privaron de suero y se trataron con ^{125}I -pro-MSP solo o en combinación con diferentes inhibidores durante 3 h. Se usó hepsina recombinante (10 nM) como control positivo. Se observó un aumento significativo en el procesamiento de pro-MSP después de 3 h en comparación con el inicio del experimento. Los inhibidores KQLR (SEQ ID NO: 12), KD1 y anticuerpo anti-hepsina Fab25 bloquearon eficazmente la activación de pro-MSP. B. Activación de pro-HGF por hepsina expresada en la superficie celular en células LnCap-34. Se trataron células LnCap-34 con ^{125}I -pro-HGF en presencia de diversa concentración de Fab25 (20 nM - 0,15 nM) y se incubaron durante 3 horas. Se usó hepsina recombinante (10 nM) como control positivo. Se observó un aumento significativo en el procesamiento de pro-HGF después de 3 h en comparación con el inicio del experimento. El anticuerpo anti-hepsina Fab25 bloqueó eficazmente la activación de pro-HGF en un modo dependiente de la concentración dependiente.

FIGURA 17: A. Se usó resonancia de plasmones superficiales para medir la afinidad de unión del Ab25 con hepsina humana activa. Se inyectaron diluciones sucesivas de hepsina (0,39 nM a 200 nM) a un chip biosensor CM5 con Ab25 capturado durante 3 minutos y la disociación se monitorizó durante 15 minutos. El ajuste de los datos experimentales dio la constante de disociación en equilibrio (K_D) de 10,6 nM. B. Como la unión de Ab25 a pro-hepsina mostró una cinética rápida, la afinidad de unión se midió por mediciones de afinidad en estado estacionario. Se inyectaron diluciones sucesivas de pro-hepsina (195 nM a 80 μM) a un chip biosensor CM5 con Ab25 capturado durante 2 minutos. Se determinó la constante de disociación en equilibrio (K_D) de 5,52 μM por análisis en estado estacionario de una representación R_{eq} contra la concentración de pro-hepsina.

FIGURA 18: Experimento calorimétrico de valoración isotérmica de la unión de Fab25 a hepsina activa. La reacción de asociación es exotérmica y la estequiometría de la unión es 1:1 como era de esperar. La constante de disociación (K_D) de ITC es 6,1 nM que se correlaciona excelentemente con los datos previos de BIAcore. La entalpía (ΔH) y entropía ($T\Delta S$) de la unión son -27,5 kcal/mol y -16,3 kcal/mol que muestran que la unión es entálpicamente accionada con entropía desfavorable.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La invención en el presente documento proporciona anticuerpos anti-hepsina que son útiles para, por ejemplo, el tratamiento o prevención de estados de enfermedad asociados a la expresión y/o actividad de hepsina, tales como elevada expresión y/o actividad o expresión y/o actividad no deseada. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención se usan para tratar un tumor, un cáncer y/o un trastorno proliferativo de células.

En otro aspecto, los anticuerpos anti-hepsina de la invención encuentran utilidad como reactivos para la detección y/o aislamiento de hepsina, tal como la detección de hepsina en diversos tejidos y tipo de células.

La invención proporciona además métodos de preparación y uso de anticuerpos anti-hepsina, y polinucleótidos que codifican anticuerpos anti-hepsina.

Técnicas generales

Las técnicas y procedimientos descritos o citados en el presente documento son generalmente bien entendidos y se emplean comúnmente usando metodología convencional por aquellos expertos en la materia, tales como, por ejemplo, las metodologías ampliamente utilizadas descritas en Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3ª. edición (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY* (F. M. Ausubel, y col. eds., (2003)); las series *METHODS IN ENZYMOLOGY* (Academic Press, Inc.): *PCR 2: A PRACTICAL APPROACH* (M. J. MacPherson, B. D. Hames y G. R. Taylor eds. (1995)), Harlow y Lane, eds. (1988) *ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL*, y *ANIMAL CELL CULTURE* (R. I. Freshney, ed. (1987)).

Definiciones

Un anticuerpo "aislado" es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado a partir de un componente de su entorno natural. Componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos de diagnóstico o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no

proteínicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) a más del 95 % en peso del anticuerpo como se ha determinado por el método de Lowry, y lo más preferentemente más del 99 % en peso, (2) a un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos del extremo N o interna usando un secuenciador de taza giratoria, o (3) a homogeneidad por SDS-PAGE (electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida) bajo condiciones reductoras o no reductoras usando tinción con azul de Coomassie o, preferentemente, con plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Sin embargo, generalmente, el anticuerpo aislado se preparará por al menos una etapa de purificación.

Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una molécula de ácido nucleico que se identifica y separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que está generalmente asociada en la fuente natural del ácido nucleico. Una molécula de ácido nucleico aislada es distinta en la forma o entorno en el cual se encuentra en la naturaleza. Por tanto, las moléculas de ácido nucleico aisladas se diferencian de la molécula de ácido nucleico que existe en células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico aislada incluye una molécula de ácido nucleico contenida en células que generalmente expresan el ácido nucleico (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica anticuerpo) en el que, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de células naturales.

El término "numeración de residuos del dominio variable como en Kabat" o "numeración de la posición de aminoácidos como en Kabat" y variaciones de los mismos se refiere al sistema de numeración usado para dominios variables de la cadena pesada o dominios variables de la cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Usando esta numeración, la presente secuencia de aminoácidos lineal puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales correspondientes a un acortamiento de, o inserción en, una FR o CDR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de la cadena pesada puede incluir un inserto de un único aminoácido (residuo 52a según Kabat) después del residuo 52 de H2 y residuos insertados (por ejemplo, residuos 82a, 82b y 82c, etc. según Kabat) después del residuo de FR de la cadena pesada 82. La numeración de residuos de Kabat puede determinarse para un anticuerpo dado por alineamiento en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "convencional".

La expresión "sustancialmente similar" o "sustancialmente los mismos", como se usa en el presente documento, denota un grado suficientemente alto de similitud entre dos valores numéricos (generalmente uno asociado a un anticuerpo de la invención y el otro asociado a un anticuerpo de referencia/comparador), de forma que un experto en la materia consideraría que la diferencia entre los dos valores es de poca o ninguna significancia biológica y/o estadística dentro del contexto de la característica biológica medida por dichos valores (por ejemplo, valores de Kd). La diferencia entre dichos dos valores es preferentemente inferior a aproximadamente el 50 %, preferentemente inferior a aproximadamente el 40 %, preferentemente inferior a aproximadamente el 30 %, preferentemente inferior a aproximadamente el 20 %, preferentemente inferior a aproximadamente el 10 % en función del valor para el anticuerpo de referencia/comparador.

"Afinidad de unión" generalmente se refiere a la fuerza de la suma total de interacciones no covalentes entre un único sitio de unión de una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) y su componente de unión (por ejemplo, un antígeno). A menos que se indique lo contrario, como se usa en el presente documento, "afinidad de unión" se refiere a la afinidad de unión intrínseca que refleja una interacción 1:1 entre miembros de un par de unión (por ejemplo, anticuerpo y antígeno). La afinidad de una molécula X por su componente Y puede representarse generalmente por la constante de disociación (Kd). Deseablemente, Kd es 1×10^{-7} , 1×10^{-8} , 5×10^{-8} , 1×10^{-9} , 3×10^{-9} , 5×10^{-9} , o incluso 1×10^{-10} o más fuerte. La afinidad puede medirse por métodos comunes conocidos en la técnica, que incluyen aquellos descritos en el presente documento. Los anticuerpos de baja afinidad se unen generalmente al antígeno lentamente y tienden a disociarse fácilmente, mientras que los anticuerpos de alta afinidad generalmente se unen al antígeno más rápidamente y tienden a permanecer unidos durante más tiempo. En la técnica se conoce una variedad de métodos de medición de la afinidad de unión, cualquiera de los cuales puede usarse para los fines de la presente invención. A continuación se describen realizaciones ilustrativas específicas.

En una realización, "Kd" o "valor de Kd" según la presente invención se mide por un ensayo de unión al antígeno radiomarcado (RIA) realizado en la versión de Fab de un anticuerpo de interés y su antígeno como se describe por el siguiente ensayo que mide la afinidad de unión en disolución de Fab por antígeno se mide equilibrando el Fab con una concentración mínima de antígeno marcado con (125 I) en presencia de una serie de valoraciones de antígeno sin marcar, luego capturando el antígeno unido con una placa recubierta de anticuerpo anti-Fab (Chen, y col., (1999) *J. Mol. Biol.* 293:865-881). Para establecer condiciones para el ensayo, placas de microtitulación (Dyner) se recubren durante la noche con 5 µg/ml de un anticuerpo anti-Fab de captura (Cappel Labs) en carbonato sódico 50 mM (pH 9,6), y posteriormente se bloquean con 2 % (peso/volumen) de albúmina de suero bovino en PBS durante dos a cinco horas a temperatura ambiente (aproximadamente 23 °C). En una placa no adsorbente (Nunc n.º 269620), [125 I]-antígeno 100 pM o 26 pM se mezcla con diluciones sucesivas de un Fab de interés (por ejemplo, de acuerdo con la evaluación del anticuerpo anti-VEGF, Fab-12, en Presta y col., (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599). Entonces, el Fab de interés se incubaba durante la noche; sin embargo, la incubación puede continuar durante un periodo

prolongado (por ejemplo, aproximadamente 65 horas) para garantizar que se alcance el equilibrio. Después, las mezclas se transfieren a la placa de captura para incubación a temperatura ambiente (por ejemplo, durante una hora). Entonces, la disolución se elimina y la placa se lava ocho veces con 0,1 % de Tween-20 en PBS. Cuando las placas se han secado se añaden 150 μ l/pocillo de centelleante (MicroScint-20; Packard) y las placas se cuentan en un contador gamma Topcount (Packard) durante diez minutos. Las concentraciones de cada Fab que dan menos de o igual al 20 % de unión máxima se eligen para su uso en ensayos de unión competitivos. Según otra realización, Kd o el valor de Kd se mide usando ensayos de resonancia de plasmones superficiales usando un BIAcore™-2000 o un BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con chips CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (UR). Brevemente, pastillas de biosensor de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore® Inc.) se activan con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) según las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato sódico 10 mM, pH 4,8, a 5 μ g/ml (~0,2 μ M) antes de la inyección a una velocidad de flujo de 5 μ l/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Tras la inyección de antígeno se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para medidas cinéticas, diluciones sucesivas dobles de Fab (0,78 nM a 500 nM) se inyectan en PBS con 0,05 % de Tween 20 (PBST) a 25 °C a una velocidad de flujo de aproximadamente 25 μ l/min. En algunas realizaciones, se usan las siguientes modificaciones para el método de ensayo de resonancia de plasmones superficiales: se inmoviliza anticuerpo en chips biosensores CM5 para lograr aproximadamente 400 UR, y para mediciones cinéticas, se inyectan diluciones sucesivas dobles de proteína diana (por ejemplo, hepsina-IIIb o -IIIc) (a partir de 67 nM) en tampón PBST a 25 °C con una velocidad de flujo de aproximadamente 30 μ l/minuto. Las constantes de asociación (k_{as}) y las constantes de disociación (k_{dis}) se calculan usando un modelo de unión de Langmuir uno a uno simple (software de evaluación BIAcore® versión 3.2) ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio (Kd) se calcula como la relación k_{dis}/k_{as} . Véase, por ejemplo, Chen, Y., y col., (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881. Si la constante de asociación supera $106 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ por el ensayo de resonancia de plasmones superficiales anterior, entonces la constante de asociación puede determinarse usando una técnica de extinción fluorescente que mide el aumento o la disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, 16 nm de paso banda) a 25 °C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma de Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno como se mide en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con flujo de parada (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-Aminco serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta con agitación.

Una "constante de asociación" o " k_{as} " según la presente invención también puede determinarse con la misma técnica de resonancia de plasmones superficiales descrita anteriormente usando BIAcore™-2000 o a BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) a 25 °C con chips CM5 de antígeno inmovilizado a ~10 unidades de respuesta (UR). Brevemente, pastillas de biosensor de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore® Inc.) se activan con clorhidrato de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) según las instrucciones del proveedor. El antígeno se diluye con acetato sódico 10 mM, pH 4,8, a 5 μ g/ml (~0,2 μ M) antes de la inyección a una velocidad de flujo de 5 μ l/minuto para lograr aproximadamente 10 unidades de respuesta (UR) de proteína acoplada. Tras la inyección de antígeno se inyecta etanolamina 1 M para bloquear los grupos sin reaccionar. Para medidas cinéticas, diluciones sucesivas dobles de Fab (0,78 nM a 500 nM) se inyectan en PBS con 0,05 % de Tween 20 (PBST) a 25 °C a una velocidad de flujo de aproximadamente 25 μ l/min. En algunas realizaciones, se usan las siguientes modificaciones para el método de ensayo de resonancia de plasmones superficiales: se inmoviliza anticuerpo en chips biosensores CM5 para lograr aproximadamente 400 UR, y para mediciones cinéticas, se inyectan diluciones sucesivas dobles de proteína diana (por ejemplo, hepsina-IIIb o -IIIc) (a partir de 67 nM) en tampón PBST a 25 °C con una velocidad de flujo de aproximadamente 30 μ l/minuto. Las constantes de asociación (k_{as}) y las constantes de disociación (k_{dis}) se calculan usando un modelo de unión de Langmuir uno a uno simple (software de evaluación BIAcore® versión 3.2) ajustando simultáneamente los sensogramas de asociación y disociación. La constante de disociación de equilibrio (Kd) se calcula como la relación k_{dis}/k_{as} . Véase, por ejemplo, Chen, Y., y col., (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881. Si la constante de asociación supera $106 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ por el ensayo de resonancia de plasmones superficiales anterior, entonces la constante de asociación puede determinarse usando una técnica de extinción fluorescente que mide el aumento o la disminución en la intensidad de emisión de fluorescencia (excitación = 295 nm; emisión = 340 nm, 16 nm de paso banda) a 25 °C de un anticuerpo anti-antígeno 20 nM (forma de Fab) en PBS, pH 7,2, en presencia de concentraciones crecientes de antígeno como se mide en un espectrómetro, tal como un espectrofotómetro equipado con flujo de parada (Aviv Instruments) o un espectrofotómetro SLM-Aminco serie 8000 (ThermoSpectronic) con una cubeta con agitación.

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 vírico, en el que segmentos de ADN adicionales pueden ligarse en el genoma vírico. 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

recombinantes”). 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.

5 “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
 10 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
 20 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 básicos 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, alquenilo, cicloalquilo, cicloalquenilo o araldilo. No todos los enlaces en un polinucleótido necesitan ser
 25 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 cortos, 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.

“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 específica, 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 técnica, 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, en el que el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se proporciona en la Tabla A más adelante. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue autorizado por Genentech, Inc., y el código fuente ha sido presentado con documentación de usuario en la Oficina estadounidense para los derechos de autor, Washington D.C., 20559, en la que está registrado bajo el registro estadounidense para los derechos de autor n.º TXU510087. El programa ALIGN-2 está públicamente disponible de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o puede compilarse a partir del código fuente proporcionado en, por ejemplo, el documento WO2007/001851. El programa ALIGN-2 debería compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, preferentemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias están fijados por el programa ALIGN-2 y no varían.

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

100 veces la fracción X/Y

en la que X es el número de residuos de aminoácidos puntuados como apareamientos idénticos por el programa de alineamiento de secuencias ALIGN-2 en el alineamiento de ese programa de A y B, y en la que Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Se apreciará que si la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de la secuencia de aminoácidos A con respecto a B no será igual al % de identidad de la secuencia de aminoácidos B con respecto a A.

En algunas realizaciones, dos o más secuencias de aminoácidos son al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o el 90 % idénticas. En algunas realizaciones, dos o más secuencias de aminoácidos son al menos el 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, o incluso el 100 % idénticas. A menos que se establezca específicamente de otro modo, todos los valores de % de identidad de secuencias de aminoácidos usados en el presente documento se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente precedente usando el programa informático ALIGN-2.

El término "hepsina", como se usa en el presente documento, se refiere, a menos que se indique específicamente o contextualmente de otro modo, a cualquier polipéptido de hepsina nativo o de variante. El término "secuencia nativa" engloba específicamente formas truncadas que se producen naturalmente (por ejemplo, una secuencia del dominio extracelular o una secuencia de subunidad de transmembrana), formas de variante que se producen naturalmente (por ejemplo, formas alternativamente cortadas y empalmadas) y variantes alélicas que se producen naturalmente. El término "hepsina no mutante" generalmente se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína hepsina que se produce naturalmente. El término "secuencia de hepsina no mutante" generalmente se refiere a una secuencia de aminoácidos encontrada en una hepsina que se produce naturalmente. En una realización, un polipéptido de hepsina de secuencia nativa comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46 (véase la Figura 7). En una realización, un polipéptido de hepsina de secuencia nativa comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47 (véase la Figura 8)

"Variante de polipéptido de hepsina", o variaciones del mismo, significa un polipéptido de hepsina, generalmente un polipéptido de hepsina activa, 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 la secuencia nativa como se ha desvelado en el presente documento. Tales variantes de polipéptido 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 polipéptido de hepsina tendrá al menos aproximadamente el 80 % de identidad de secuencias de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente el 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % de identidad de secuencias de aminoácidos, con una secuencia de polipéptidos de hepsina de secuencia nativa como se ha desvelado en el presente documento. Generalmente, los polipéptidos de variante 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 en longitud, o más. Opcionalmente, los polipéptidos de variante 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.

Un "inhibidor de tirosina cinasas" es una molécula que inhibe hasta cierto punto la actividad de tirosina cinasas de una tirosina cinasa tal como un receptor de hepsina.

"Inhibir" es disminuir o reducir una actividad, función y/o cantidad en comparación con una referencia.

"Expresión" de proteína se refiere a la conversión de la información codificada en un gen en ARN mensajero (ARNm) y luego a la proteína.

En el presente documento, una muestra o célula que "expresa" una proteína de interés (tal como hepsina) es una en la que se determina que el ARNm que codifica la proteína, o la proteína, que incluye fragmentos de la misma, está presente en la muestra o célula.

Un "inmunoconjugado" (indistintamente denominado "conjugado de anticuerpo-fármaco", o "ADC") significa un anticuerpo conjugado con uno o más agentes citotóxicos, tales como un agente quimioterapéutico, un fármaco, un

agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo, una toxina de proteína, una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, de planta o animal, o fragmentos de la misma), o un isótopo radiactivo (es decir, un radioconjugado).

5 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 o anticuerpos antagonistas preferidos inhiben completamente la actividad biológica del antígeno.

10 Un “anticuerpo desnudo” es un anticuerpo que no está conjugado con una molécula heteróloga, tal como un resto citotóxico o radiomarca.

15 Un anticuerpo que tiene una “característica biológica” de un anticuerpo designado es uno que posee una o más de las características biológicas de ese anticuerpo que lo distinguen de otros anticuerpos que se unen al mismo antígeno.

20 Con el fin de cribar anticuerpos que se unen a un epítipo sobre un antígeno 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).

25 Para aumentar la semivida de los anticuerpos o polipéptido que contiene las secuencias de aminoácidos de la presente invención, puede unirse un epítipo de unión al receptor de rescate al anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo), como se describe, por ejemplo, en la patente de EE. UU. 5.739.277. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que codifica el epítipo de unión al receptor de rescate puede unirse en marco a un ácido nucleico que codifica una secuencia de polipéptidos de la presente invención de manera que la proteína de fusión expresada por la molécula de ácido nucleico manipulada comprenda el epítipo de unión al receptor de rescate y una secuencia de polipéptidos de la presente invención. Como se usa en el presente documento, el término “epítipo de unión al receptor de rescate” se refiere a un epítipo 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 (por ejemplo, Ghetie y col., *Ann. Rev. Immunol.* 18:739-766 (2000), Tabla 1). También se describen anticuerpos con sustituciones en una región Fc de los mismos y elevadas semividas en suero en los documentos WO00/42072, WO 02/060919; Shields y col., *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604 (2001); Hinton, *J. Biol. Chem.* 279:6213-6216 (2004)). En otra realización, la semivida en suero puede también aumentarse, por ejemplo, uniendo otras secuencias de polipéptidos. Por ejemplo, anticuerpos u otros polipéptidos útiles en los métodos de la invención pueden unirse a albúmina de suero o una porción de albúmina de suero que se une al receptor FcRn o un péptido de unión a la albúmina de suero de manera que la albúmina de suero se una al anticuerpo o polipéptido, por ejemplo, tales secuencias de polipéptidos se desvelan en el documento WO01/45746. En una realización preferida, el péptido de albúmina de suero que va a unirse comprende una secuencia de aminoácidos de D₁C₁L₁P₁R₁W₁G₁C₁L₁W (SEQ ID NO: 13). En otra realización, la semivida de un Fab se aumenta por estos métodos. Véase también Dennis y col. *J. Biol. Chem.* 277:35035-35043 (2002) para secuencias de péptidos de unión a albúmina de suero.

40 Por “fragmento” se indica una porción de un polipéptido o molécula de ácido nucleico que contiene, preferentemente, al menos el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, o más de la longitud entera de la molécula de ácido nucleico de referencia o polipéptido. Un fragmento puede contener 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, o 100, 200, 300, 400, 500, 600, o más nucleótidos o 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 190, 200 aminoácidos o más.

45 Los términos “anticuerpo” e “inmunoglobulina” se usan indistintamente en el sentido más amplio e incluyen anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales de longitud completa o intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multispecíficos (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 humano, humanizado y/o madurado por afinidad.

50 El término “variable” se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables se diferencien ampliamente en la secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y la especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está uniformemente distribuida por todos los dominios variables de anticuerpos. Se concentra en tres segmentos llamados regiones hipervariables o determinantes de la complementariedad (CDR) o regiones hipervariables tanto en los dominios variables de las cadenas ligeras como de las cadenas pesadas. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se llaman las regiones estructurales (FR). Los dominios variables de cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan en gran parte una configuración de hoja β , conectadas por tres CDR que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte, de la estructura de hoja β . Las CDR en cada cadena se mantienen juntas en una estrecha proximidad por las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de anticuerpos (véase Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, National Institute of Health, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no participan

directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpo.

La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos de unión al antígeno idénticos llamados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión al antígeno, y un fragmento "Fc" residual cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina da un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de combinación con antígeno y que todavía puede reticular el antígeno.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento y unión al antígeno completo. En una especie de Fv bicatenaria, esta región consiste en un dímero de un dominio variable de las cadenas pesadas y ligeras en estrecha asociación no covalente. En una especie de Fv monocatenaria, un dominio variable de las cadenas pesadas y ligeras puede estar covalentemente ligado por un conector de péptido flexible de forma que las cadenas ligeras y pesadas puedan asociarse en un análogo de estructura "dimérica" con el de en una especie de Fv bicatenaria. En esta configuración, las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión al antígeno sobre la superficie del dímero de VH-VL. En conjunto, las seis CDR confieren especificidad de unión del antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que sólo comprende tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad para reconocer y unirse a antígeno, aunque a una menor afinidad que el sitio de unión entero.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' se diferencian de los fragmentos Fab por la adición de algunos residuos en el extremo carboxi del dominio de las cadenas pesadas CH1 que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para Fab' en el que el (los) residuo(s) de cisteína de los dominios constantes llevan un grupo tiol libre. Los fragmentos $F(ab')_2$ de anticuerpos se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tenían cisteínas de bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

Las "cadenas ligeras" de anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de vertebrado pueden asignarse a uno de los dos tipos claramente distintos llamados kappa (κ) y lambda (λ) basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de éstas pueden dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG_1 , IgG_2 , IgG_3 , IgG_4 , IgA_1 e IgA_2 . Los dominios constantes de la cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las estructuras de subunidad y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son muy conocidas. "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. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenario; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. En una realización, un fragmento de anticuerpo comprende un sitio de unión al 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 "región hipervariable", "HVR" o "HV", cuando se usa en el presente documento, se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son hipervariables en secuencia y/o forman bucles estructuralmente definidos. Generalmente, los anticuerpos comprenden seis regiones hipervariables; tres en VH (H1, H2, H3) y tres en VL (L1, L2, L3). Varias delineaciones de la región hipervariable están en uso y están englobadas en el presente documento. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de Kabat se basan en la variabilidad de secuencias y son las más comúnmente usadas (Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia se refiere por el contrario a la localización de los bucles estructurales (Chothia y Lesk J. *Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Las regiones hipervariables de AbM representan un compromiso entre CDR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia, y son usadas por el software de modelado de anticuerpos Oxford Molecular's AbM. Las regiones hipervariables de "contacto" se basan en un análisis de las complejas estructuras cristalinas disponibles. Los residuos de cada una de estas regiones hipervariables se anotan a continuación.

Bucle	Kabat	AbM	Chothia	Contacto
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36

ES 2 534 646 T3

L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
		(numeración de Kabat)		
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
		(numeración de Chothia)		
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

Las regiones hipervariables pueden comprender "regiones hipervariables extendidas" del siguiente modo: 24-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en VL y 26-35 (H1), 50-65 o 49-65 (H2) y 93-102, 94-102 o 95-102 (H3) en VH. Los residuos del dominio variable están numerados según Kabat y col., arriba, para cada una de estas definiciones.

Residuos de la "región estructural" o "FR" son aquellos residuos del dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable como se define en el presente documento.

Formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en los 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 pueden ser 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).

Los anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) tienen una porción de la cadena pesada y/o ligera 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. n.º 4.816.567; y Morrison y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)). El anticuerpo humanizado como se usa en el presente documento es un subconjunto de anticuerpos quiméricos.

Los fragmentos de anticuerpos "Fv monocatenario" o "scFv" comprenden los dominios de anticuerpo V_H y V_L, estando estos dominios presentes en una única cadena de polipéptidos. Generalmente, el polipéptido de scFv comprende además un conector de polipéptidos entre los dominios V_H y V_L que permite que scFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de scFv véase Plückthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pág. 269-315 (1994).

Un "antígeno" es un antígeno predeterminado al que un anticuerpo puede unirse selectivamente. El antígeno diana puede ser polipéptido, hidrato de carbono, ácido nucleico, lípido, hapteno u otro compuesto que se produce naturalmente o sintético. Preferentemente, el antígeno diana es un polipéptido.

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos con dos sitios de unión al antígeno, fragmentos que comprenden un dominio variable (V_H) de las cadenas pesadas conectado a un dominio variable (V_L) de las cadenas ligeras en la misma cadena de polipéptidos (V_H - V_L). Usando un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, los dominios son obligados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, los documentos EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993).

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 al 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).

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

"Citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la que Ig secretada unida sobre receptores de Fc (FcR) presentes en ciertas células citotóxicas (por ejemplo, linfocitos citolíticos espontáneos (NK), neutrófilos y macrófagos) permiten que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana que lleva antígeno y posteriormente destruyan la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos "arman" a las células citotóxicas y se requieren absolutamente para tal destrucción. Las células primarias para mediar en ADCC, linfocitos NK, expresan FcγRIII solo, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés puede realizarse un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en la patente de EE. UU. n.º 5.500.362 o 5.821.337 o la patente de EE. UU. de Presta n.º 6.737.056. Células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y linfocitos citolíticos espontáneos (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el desvelado en Clynes y col. *PNAS (USA)* 95:652-656 (1998).

"Células efectoras humanas" son leucocitos que expresan una o más FcR y realizan funciones efectoras. Preferentemente, las células expresan al menos FcγRIII y realizan función efectora de ADCC. Ejemplos de leucocitos humanos que median en ADCC incluyen células mononucleares de sangre periférica (CMSP), linfocitos citolíticos espontáneos (NK), monocitos, linfocitos T citotóxicos y neutrófilos; prefiriéndose las células CMSP y NK. Las células efectoras pueden aislarse de una fuente nativa, por ejemplo, de sangre.

"Receptor de Fc" o "FcR" describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferido es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, que incluyen variantes alélicas y formas alternativamente cortadas y empalmadas de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activante") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor") que tienen secuencias de aminoácidos similares que se diferencian principalmente en los dominios citoplásmicos del mismo. El receptor activante FcγRIIA contiene un motivo de activación basado en tirosina inmunorreceptora (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición basado en tirosina inmunorreceptora (ITIM) en su dominio citoplásmico (véase la revisión M. en Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). Los FcR son revisados en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991); Capel y col., *Immunomethods* 4:25-34 (1994); y de Haas y col., *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Otras FcR, que incluyen aquellos que van a identificarse en el futuro, están englobados por el término "FcR" en el presente documento. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer y col., *J. Immunol.* 117:587 (1976); y Kim y col., *J. Immunol.* 24:249 (1994)) y regula la homeostasis de inmunoglobulinas. El documento W000/42072 (Presta) describe variantes de anticuerpos con unión mejorada o disminuida a FcR. Véase, por tanto, Shields y col. *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001).

Se conocen métodos de medición de la unión a FcRn (véase, por ejemplo, Ghetie 1997, Hinton 2004). La unión a FcRn humano *in vivo* y la semivida en suero de polipéptidos de unión con alta afinidad a FcRn humano pueden ensayarse, por ejemplo, en ratones transgénicos o líneas celulares humanas transfectadas que expresan FcRn humano, o en primates administrados con los polipéptidos de variante de Fc.

"Citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula diana en presencia de complemento. La activación de la ruta del complemento clásica se inicia por la unión del primer componente del

sistema de complemento (C1q) a anticuerpos (de la subclase apropiada) que están unidos a su antígeno relacionado. Para evaluar la activación del complemento puede realizarse un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro y col., J. Immunol. Methods 202:163 (1996).

- 5 Variantes de polipéptidos con secuencias de aminoácidos de la región Fc alteradas y capacidad de unión a C1q elevada o disminuida se describen en la patente de EE. UU. n.º 6.194.551B1 y WO 99/51642. Por tanto, véase, Idusogie y col. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

10 El término “polipéptido que comprende región Fc” se refiere a un polipéptido, tal como un anticuerpo o inmunoadhesina, que comprende una región Fc. La lisina del extremo C (residuo 447 según el sistema de numeración EU) de la región Fc puede eliminarse, por ejemplo, durante la purificación del polipéptido o por ingeniería recombinante del ácido nucleico que codifica el polipéptido. Por consiguiente, una composición que comprende un polipéptido que tiene una región Fc según la presente invención puede comprender polipéptidos con K447, con todos los K447 eliminados, o una mezcla de polipéptidos con y sin el residuo K447.

15 Una “región estructural humana del aceptor” para los fines en el presente documento es una región estructural que comprende la secuencia de aminoácidos de una región estructural VL o VH derivada de una región estructural de inmunoglobulina humana, o de una región estructural consenso humana. Una región estructural humana del aceptor “derivada de” una región estructural de inmunoglobulina humana o región estructural consenso humana puede comprender la misma secuencia de aminoácidos de la misma, o puede contener cambios de secuencias de aminoácidos preexistentes. Si están presentes cambios de aminoácidos preexistentes, están presentes preferentemente no más de 5 y preferentemente 4 o menos, o 3 o menos, cambios de aminoácidos preexistentes. Si los cambios de aminoácidos preexistentes están presentes en una VH, preferentemente aquellos cambios son solo en tres, dos o una de las posiciones 71H, 73H y 78H; por ejemplo, los residuos de aminoácidos en aquellas posiciones pueden ser 71A, 73T y/o 78A. En una realización, la región estructural humana del aceptor VL es idéntica en secuencia a la secuencia de la región estructural de inmunoglobulina humana VL o secuencia de la región estructural consenso humana.

20 Una “región estructural consenso humana” es una región estructural que representa el residuo de aminoácidos que se produce más comúnmente en una selección de secuencias de la región estructural VL o VH de inmunoglobulina humana. Generalmente, la selección de secuencias de VL o VH de inmunoglobulina humana es de un subgrupo de secuencias del dominio variable. Generalmente, el subgrupo de secuencias es un subgrupo como en Kabat y col. En una realización, para VL, el subgrupo es el subgrupo kappa I como en Kabat y col. En una realización, para VH, el subgrupo es el subgrupo III como en Kabat y col.

25 Una “región estructural consenso del subgrupo III de VH” comprende la secuencia consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo III pesado variable de Kabat y col. En una realización, la secuencia de aminoácidos de la región estructural consenso del subgrupo III de VH comprende al menos una parte o todas de cada una de las siguientes secuencias:

30 **EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 14)-H1-WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 15)-H2-RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO: 43)-H3-WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 16).**

35 Una “región estructural consenso del subgrupo I de VL” comprende la secuencia consenso obtenida de las secuencias de aminoácidos en el subgrupo I kappa ligero variable de Kabat y col. En una realización, la secuencia de aminoácidos de la región estructural consenso del subgrupo I de VH comprende al menos una parte o todas de cada una de las siguientes secuencias:

40 **DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 17)-L1-WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 18)-L2-GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 19)-L3-FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 20).**

45 Como se usa en el presente documento, “mutante de anticuerpo” o “variante de anticuerpo” se refiere a una variante de secuencia de aminoácidos de un anticuerpo en el que se han modificado uno o más de los residuos de aminoácidos del anticuerpo dependiente de especie. Tales mutantes tienen necesariamente menos del 100 % de identidad de secuencias o similitud con el anticuerpo dependiente de especie. En una realización, el mutante de anticuerpo tendrá una secuencia de aminoácidos que tienen al menos el 75 % de identidad de secuencias de aminoácidos o similitud con la secuencia de aminoácidos de tanto el dominio variable de la cadena pesada como ligera del anticuerpo dependiente de especie, más preferentemente al menos el 80 %, más preferentemente al

menos el 85 %, más preferentemente al menos el 90 %, y lo más preferentemente al menos el 95 %. La identidad o similitud con respecto a esta secuencia se define en el presente documento como el porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos (es decir, el mismo residuo) o similares (es decir, residuo de aminoácido del mismo grupo basado en propiedades de la cadena lateral comunes, véase más adelante) a los residuos del anticuerpo dependiente de especie, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencias. Ninguno del extremo N, extremo C, o extensiones, deleciones, o inserciones internas en la secuencia de anticuerpos fuera del dominio variable, debe interpretarse como que afecta la identidad de secuencias o similitud.

Un “trastorno” o “enfermedad” es cualquier afección o enfermedad que se beneficiaría del tratamiento con una sustancia/molécula o método de la invención. Éste incluye trastornos crónicos y agudos o enfermedades 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; carcinoma, blastoma y sarcoma.

“Tratamiento” se refiere a tanto tratamiento terapéutico y profiláctico como a medidas preventivas. Aquellos en necesidad de tratamiento incluyen aquellos que ya tienen un tumor benigno, pre-canceroso o no metastásico, además de aquellos en los que la aparición o reaparición del cáncer va a prevenirse.

El término “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un agente terapéutico para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno en un mamífero. En el caso de cánceres, la cantidad terapéuticamente eficaz del agente terapéutico puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor primario; inhibir (es decir, ralentizar de algún modo y preferentemente detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar de algún modo y preferentemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, de algún modo, el crecimiento tumoral; y/o aliviar de algún modo uno o más de los síntomas asociados al trastorno. Hasta el punto de que el fármaco pueda prevenir el crecimiento y/o destruir células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. Para la terapia contra el cáncer, la eficacia *in vivo* puede medirse, por ejemplo, evaluando la duración de la supervivencia, tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP), las tasas de respuesta (RR), duración de la respuesta y/o calidad de vida.

Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren a o describen la afección fisiológica en mamíferos que normalmente se caracteriza por crecimiento celular no regulado. En esta definición se incluyen cánceres benignos y malignos. Por “cáncer en estadio temprano” o “tumor en estadio temprano” se indica un cáncer que no es invasivo o metastásico o se clasifica como un cáncer en estadio 0, I o II. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma (incluyendo meduloblastoma y retinoblastoma), sarcoma (incluyendo liposarcoma y sarcoma de células sinoviales), tumores neuroendocrinos (incluyendo tumores carcinoides, gastrinoma y cáncer de células de los islotes), mesotelioma, schwannoma (incluyendo neuroma acústico), meningioma, adenocarcinoma, melanoma, y leucemia o tumores malignos linfoides. Más ejemplos particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón que incluye cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP), cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago que incluye cáncer gastrointestinal, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama (incluyendo cáncer de mama metastásico), cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de las glándulas salivares, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, cáncer testicular, cáncer esofágico, tumores de las vías biliares, además de cáncer de cabeza y cuello y mieloma múltiple.

El término “pre-canceroso” se refiere a una afección o un crecimiento que normalmente precede o se desarrolla en un cáncer. Un crecimiento “pre-canceroso” tendrá células que se caracterizan por regulación anormal del ciclo celular, proliferación, o diferenciación, que pueden determinarse por marcadores de regulación del ciclo celular, proliferación celular, o diferenciación.

Por “displasia” se indica cualquier crecimiento o desarrollo anormal de tejido, órgano, o células. Preferentemente, la displasia es de alto grado o precancerosa.

Por “metástasis” se indica la diseminación del <http://en.wikipedia.org/wiki/Cancer> cáncer de su sitio primario a otros sitios en el cuerpo. Las células cancerosas pueden desprenderse de un tumor primario, penetrar en vasos linfáticos y sanguíneos, circular a través de la circulación sanguínea, y crecer en un foco distante (metastatizar) en tejidos normales en cualquier parte en el cuerpo. La metástasis puede ser local o distante. La metástasis es un proceso secuencial, dependiente de células tumorales que se desprenden del tumor primario, viajando a través de la circulación sanguínea, y deteniéndose en un sitio distante. En el nuevo sitio, las células establecen un riego sanguíneo y pueden crecer para formar una masa potencialmente mortal.

Tanto las rutas moleculares estimulantes como inhibitoras dentro de la célula tumoral regulan este comportamiento, y también son significativas las interacciones entre la célula tumoral y las células huésped en el sitio distante.

5 Por “no metastásico” se indica un cáncer que es benigno o que sigue en el sitio primario y no ha penetrado en el sistema de vasos linfáticos o sanguíneos o a tejidos distintos del sitio primario. Generalmente, un cáncer no metastásico es cualquier cáncer que es un cáncer de estadio 0, I o II, y ocasionalmente un cáncer de estadio III.

10 Por “tumor primario” o “cáncer primario” se indica el cáncer original y no una lesión metastásica localizada en otro tejido, órgano, u localización en el cuerpo del sujeto.

15 Por “tumor benigno” o “cáncer benigno” se indica un tumor que sigue localizado en el sitio de origen y no tiene la capacidad para infiltrar, invadir o metastatizar a un sitio distante.

20 Por “carga tumoral” se indica el número de células cancerosas, el tamaño de un tumor, o la cantidad de cáncer en el cuerpo. La carga tumoral también se denomina masa tumoral.

25 Por “número de tumores” se indica el número de tumores.

30 Por “sujeto” se indica un mamífero, que incluye, pero no se limita a, un mamífero humano o no humano, tal como un bovino, equino, canino, ovino o felino. Preferentemente, el sujeto es un ser humano.

35 El término “terapia antineoplásica” se refiere a una terapia útil en el tratamiento del cáncer. Ejemplos de agentes terapéuticos antineoplásicos incluyen, pero están limitados a, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos, agentes inhibidores del crecimiento, agentes citotóxicos, agentes usados en radioterapia, agentes antiangiogénesis, agentes apoptóticos, agentes anti-tubulina y otros agentes para tratar cáncer, anticuerpos anti-CD20, inhibidores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (por ejemplo, Gleevec™ (mesilato de imatinib)), un inhibidor de la COX-2 (por ejemplo, celecoxib), interferones, citocinas, antagonistas (por ejemplo, anticuerpos neutralizantes) que se unen a una o más de las siguientes dianas receptor(es) de ErbB2, ErbB3, ErbB4, PDGFR-beta, BlyS, APRIL, BCMA o VEGF, TRAIL/Apo2, y otros agentes químicos bioactivos y orgánicos, etc. Combinaciones de los mismos también se incluyen en la invención.

40 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. El término pretende incluir isótopos radiactivos (por ejemplo, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰ y Re¹⁸⁶), agentes quimioterapéuticos y toxinas tales como toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, de planta o animal, o fragmentos de las mismas.

45 Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen un compuesto químico útil en el tratamiento del 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, carbocuoona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolmelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecan); briostatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos de adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos, KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiatrina; 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 enedíina (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; bisfosfonatos, tales como clodronato; una esperamicina; además de cromóforo de neocarzinostatina y la cromoproteína relacionada cromóforos antibióticos de enedíina), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina ADRIAMYCIN® (incluyendo morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina y desoxidoxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metrotrexato, 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, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; antiadrenérgicos tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; recuperador de ácido fólico tal como ácido frolnico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulinico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato

de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiourea; lentinano; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; ácido podofilínico; 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; dacarbazina; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel TAXOL® (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), formulación de nanopartículas manipuladas con albúmina de paclitaxel sin Cremophor ABRAXANE™ (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) y docetaxel TAXOTERE® (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina GEMZAR®; 6-tioguanina; mercaptopurina; metrotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN®); oxaliplatino; leucovorina; vinorelbina NAVELBINE®; novantrona; tenipósido; edatrexato; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; irinotecan (Camptosar, CPT-11) (incluyendo la pauta de tratamiento de irinotecan con 5-FU y leucovorina); inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina; combretastatina; bortezomib VELCADE; lenalidomida REVLIMID; leucovorina (LV); oxaliplatino, que incluye el ciclo de tratamiento con oxaliplatino (FOLFOX); inhibidores de PKC-alfa, Raf, H-Ras, EGFR (por ejemplo, erlotinib (Tarceva™)) y VEGF-A que reducen la proliferación celular y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores.

En esta definición también se incluyen agentes antihormonales que actúan regulando o inhibiendo la acción de hormonas sobre tumores como antiestrógenos y moduladores de receptores de estrógenos selectivos (SERM) que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo el tamoxifeno NOLVADEX®), raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY 117018, onapristona y toremifeno FARESTON; inhibidores de aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, 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®; y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; 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 y H-Ras; ribozimas tales como un inhibidor de la expresión de VEGF (por ejemplo, ribozima ANGIOZYME®) y un inhibidor de la expresión de HER2; vacunas tales como vacunas de terapia génica, por ejemplo, vacuna ALLOVECTIN®, vacuna LEUVECTIN® y vacuna VAXID®; rIL-2 PROLEUKIN®; inhibidor de la topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; rmRH ABARELIX®; vinorelbina y esperamicinas (véase la patente de EE. UU. n.º 4.675.187), y sales farmacéuticamente aceptables, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores.

El término "profármaco", como se usa en la presente solicitud, se refiere a un precursor o forma derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica para células tumorales en comparación con el fármaco parental y puede activarse enzimáticamente o convertirse en la forma parental más activa. Véanse, por ejemplo, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" *Biochemical Society Transactions*, 14, pág. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) y Stella y col., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery", *Directed Drug Delivery*, Borchardt y col., (ed.), pág. 247-267, Humana Press (1985). Los profármacos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptidos, profármacos que contienen D-aminoácido, profármacos glucosilados, profármacos que contienen β-lactama, opcionalmente profármacos que contienen fenoxiacetamida sustituida u opcionalmente profármacos que contienen fenilacetamida sustituida, 5-fluorocitosina y otros profármacos de 5-fluorouridina que pueden convertirse en el fármaco libre citotóxico más activo. Ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden derivatizarse en una forma de profármaco para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, aquellos agentes quimioterapéuticos descritos anteriormente.

Por "radioterapia" se indica el uso de rayos gamma o rayos beta dirigidos para inducir daño suficiente a una célula de manera que se limite su capacidad para funcionar normalmente o para destruir la célula completamente. Se apreciará que habrá muchas formas conocidas en la técnica para determinar la dosificación y duración del tratamiento. Tratamientos típicos se administran como una administración de una vez y dosificaciones típicas oscilan de 10 a 200 unidades (Grays) por día.

Una "muestra biológica" (llamada indistintamente "muestra" o "muestra de tejido o de células") engloba una variedad de tipos de muestras obtenidas de un individuo y puede usarse en un ensayo de diagnóstico o de monitorización. La definición engloba sangre y otras muestras líquidas de origen biológico, muestras sólidas de tejido tales como un espécimen de biopsia o cultivos de tejido o células derivadas de los mismos, y la progenie de los mismos. La definición también incluye muestras que se han manipulado de algún modo después de su obtención, tal como mediante tratamiento con reactivos, solubilización o enriquecimiento en ciertos componentes, tales como proteínas o polinucleótidos, o incorporación en una matriz semisólida o sólida para fines de seccionamiento. El término "muestra biológica" engloba una muestra clínica, y también incluye células en cultivo, sobrenadantes de células, lisados celulares, suero, plasma, fluido biológico y muestras de tejido. La fuente de la muestra biológica puede ser tejido sólido como de un órgano fresco, congelado y/o preservado o muestra de tejido o biopsia o aspirado; sangre o

cualquier constituyente de la sangre; fluidos corporales tales como líquido cefalorraquídeo cerebral, líquido amniótico, líquido peritoneal o líquido intersticial; células de cualquier momento en la gestación o desarrollo del individuo. En algunas realizaciones, la muestra biológica se obtiene de un tumor primario o metastásico. La muestra biológica puede contener compuestos que no se entremezclan naturalmente con el tejido en la naturaleza tales como conservantes, anticoagulantes, tampones, fijadores, nutrientes, antibióticos o similares.

Para los fines en el presente documento, una "sección" de una muestra de tejido indica una única parte o trozo de una muestra de tejido, por ejemplo, una delgada rebanada de tejido o células cortadas de una muestra de tejido. Se entiende que pueden tomarse múltiples secciones de muestras de tejido y someterse a análisis según la presente invención. En algunas realizaciones, la misma sección de muestra de tejido se analiza a niveles tanto morfológicos como moleculares, o se analiza con respecto a tanto la proteína como el ácido nucleico.

La palabra "marca" cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o composición que está conjugado o fusionado directa o indirectamente con un reactivo tal como una sonda de ácido nucleico o un anticuerpo y facilita la detección del reactivo con el que está conjugado o fusionado. La marca puede ser por sí misma detectable (por ejemplo, marcas de radioisótopo o marcas fluorescentes) o, en el caso de una marca enzimática, puede catalizar la alteración química de un compuesto de sustrato o composición que es detectable.

Composiciones de la invención y métodos de preparación y uso de las mismas

La presente invención engloba composiciones, que incluyen composiciones farmacéuticas, que comprenden un anticuerpo anti-hepsina; y polinucleótidos que comprenden secuencias que codifican un anticuerpo anti-hepsina. Como se usa en el presente documento, las composiciones comprenden uno o más anticuerpos que se unen a hepsina, y/o uno o más polinucleótidos que comprenden secuencias que codifican uno o más anticuerpos que se unen a hepsina. Estas composiciones pueden comprender además vehículos adecuados, tales como excipientes farmacéuticamente aceptables que incluyen tampones, que son muy conocidos en la técnica.

La invención también engloba realizaciones de anticuerpo y polinucleótido aislados. La invención también engloba realizaciones de anticuerpos y polinucleótidos sustancialmente puros.

La invención también engloba un método para tratar un trastorno, por ejemplo, cáncer de próstata, usando un anticuerpo anti-hepsina (como se describe en el presente documento o como se conoce en la técnica).

Composiciones

Los anticuerpos anti-hepsina de la invención son preferentemente monoclonales. También están englobados dentro del alcance de la invención fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH y F(ab')₂ de los anticuerpos anti-hepsina proporcionados en el presente documento. Estos fragmentos de anticuerpos pueden crearse por medios tradicionales, tales como digestión enzimática, o pueden generarse por técnicas recombinantes. Tales fragmentos de anticuerpos pueden ser quiméricos o humanizados. Estos fragmentos son útiles para los fines de diagnóstico y terapéuticos expuestos más adelante.

Los anticuerpos monoclonales se obtienen 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. Así, el adjetivo "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos discretos.

Los anticuerpos anti-hepsina monoclonales de la invención pueden prepararse usando el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler y col., Nature, 256:495 (1975), o pueden prepararse por métodos de ADN recombinante (patente de EE. UU. n.º 4.816.567).

En el método de hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado tal como un hámster se inmuniza para provocar que los linfocitos produzcan o puedan producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada para la inmunización. Los anticuerpos para hepsina pueden producirse en animales por múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) de hepsina y un adyuvante. La hepsina puede producirse usando métodos muy conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen adicionalmente en el presente documento. Por ejemplo, la producción recombinante de hepsina humana y de ratón se describe más adelante. En una realización, los animales se inmunizan con una hepsina fusionada con la porción de Fc de una cadena pesada de la inmunoglobulina. En una realización preferida, los animales se inmunizan con una proteína de fusión de hepsina-IgG1. Los animales se inmunizan habitualmente contra conjugados inmunogénicos o derivados de hepsina con monofosforil lípido A (MPL)/dicrinomicolato de trehalosa (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT), y la disolución se inyecta intradérmicamente en múltiples sitios. Dos semanas después los animales se refuerzan. 7 a 14 días después los animales se sangran, y el suero se ensaya para título anti-hepsina. Los animales se refuerzan hasta las mesetas del título.

Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Entonces, los linfocitos se fusionan con 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)).

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

10 Células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan eficientemente, soportan producción de alto nivel estable de anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Entre éstas, 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 o X63-Ag8-653 disponibles de la Colección americana de cultivos tipo, Rockville, Maryland, 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); Brodeur y col., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

20 El medio de cultivo en el que las células de hibridoma están cultivándose se ensaya para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra hepsina. 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).

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

30 Después de identificarse 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 métodos 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.

35 Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, fluido ascítico o suero por procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

40 Los anticuerpos anti-hepsina de la invención pueden producirse usando bibliotecas combinatorias para cribar clones de anticuerpos sintéticos con la actividad o actividades deseadas. En principio, clones de anticuerpos sintéticos se seleccionan cribando bibliotecas de fagos que contienen el fago que muestra diversos fragmentos de la región variable (Fv) del anticuerpo fusionada con la proteína de la envoltura del fago. Tales bibliotecas de fagos son inmunopurificadas por cromatografía de afinidad contra el antígeno deseado. Los clones que expresan fragmentos de Fv que pueden unirse al antígeno deseado son adsorbidos al antígeno y, por tanto, se separan de los clones de no unión en la biblioteca. Entonces, los clones de unión se eluyen del antígeno y pueden enriquecerse adicionalmente por ciclos adicionales de adsorción/elución de antígenos. Cualquiera de los anticuerpos anti-hepsina de la invención puede obtenerse diseñando un procedimiento de cribado de antígenos adecuado para seleccionar el clon del fago de interés, seguido de la construcción de un clon del anticuerpo anti-hepsina de longitud completa usando las secuencias de Fv del clon del fago de interés y secuencias de la región constante (Fc) adecuadas descritas en Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vol. 1-3. Un método a modo de ejemplo para generar anticuerpos anti-hepsina se desvela en los ejemplos.

55 El dominio de unión al antígeno de un anticuerpo se forma a partir de dos regiones variables (V) de aproximadamente 110 aminoácidos, cada una de ellas de las cadenas ligeras (VL) y pesadas (VH), que presentan ambas tres bucles hipervariables o regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Los dominios variables pueden expresarse funcionalmente en fago, tanto como fragmentos de Fv monocatenarios (scFv), en los que VH y VL están covalentemente unidas mediante un péptido flexible corto, como fragmentos Fab, en los que cada uno está fusionado con un dominio constante e interactúan no covalentemente, como se describe en Winter y col., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Como se usa en el presente documento, los clones del fago que codifican scFv y los clones del fago que codifican Fab se denominan conjuntamente en lo sucesivo "clones del fago de Fv" o "clones de Fv".

65 Pueden clonarse por separado repertorios de genes VH y VL por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y recombinarse al azar en bibliotecas de fagos, que luego pueden buscarse para clones de unión al antígeno como se

describe en Winter y col., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994). Las bibliotecas de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de alta afinidad para el inmunogén sin el requisito de construir hibridomas. Alternativamente, el repertorio sin tratamiento previo puede clonarse para proporcionar una única fuente de anticuerpos humanos para un amplio intervalo de no auto- y también auto-antígenos sin ninguna inmunización como se describe por Griffiths y col., EMBO J, 12: 725-734 (1993). Finalmente, las bibliotecas sin tratamiento previo también pueden prepararse sintéticamente clonando los segmentos del gen V sin reorganizar de citoblastos y usando cebadores de PCR que contienen la secuencia al azar para codificar las regiones de CDR3 altamente variables y para realizar la reorganización *in vitro* como se describe por Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992).

Se usa fago filamentoso para expresar fragmentos de anticuerpos por fusión a la proteína de la envoltura menor pIII. Los fragmentos de anticuerpos pueden expresarse como fragmentos de Fv monocatenarios, en los que los dominios VH y VL están conectados en la misma cadena de polipéptidos por un espaciador de polipéptidos flexible, por ejemplo, como se describe por Marks y col., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991), o como fragmentos Fab, en los que una cadena está fusionada con pIII y la otra es secretada en el periplasma de células huésped bacterianas en las que el ensamblaje de una estructura de Fab-proteína de la envoltura que se expresa en la superficie del fago desplazando algunas de las proteínas de la envoltura natural, por ejemplo, como se describe en Hoogenboom y col., Nucl. Acids Res., 19: 4133-4137 (1991).

En general, los ácidos nucleicos que codifican fragmentos de genes de anticuerpos se obtienen de células inmunitarias recogidas de seres humanos o animales. Si se desea una biblioteca sesgada en favor de clones anti-hepsina, el individuo se inmuniza con hepsina para generar una respuesta de anticuerpos, y células del bazo y/o linfocitos B en circulación distintos de linfocitos de la sangre periférica (PBL) se recuperan para la construcción de bibliotecas. En una realización preferida, una biblioteca de fragmentos de genes de anticuerpos humanos sesgada en favor de clones anti-hepsina se obtiene generando una respuesta de anticuerpos anti-hepsina en ratones transgénicos que llevan una matriz de genes de inmunoglobulina humana funcional (y que carece de un sistema de producción de anticuerpos endógenos funcionales) de forma que la inmunización con hepsina da lugar a anticuerpos humanos productores de linfocitos B contra hepsina. La generación de ratones transgénicos productores de anticuerpos humanos se describe más adelante.

El enriquecimiento adicional en poblaciones de células reactivas anti-hepsina puede obtenerse usando un procedimiento de cribado adecuado para aislar linfocitos B que expresan anticuerpo unido a la membrana específico para hepsina, por ejemplo, por separación de células con cromatografía de afinidad por hepsina o adsorción de células a hepsina marcada con fluorocromo, seguido de citometría de flujo (FACS).

Alternativamente, el uso de células del bazo y/o linfocitos B u otros PBL de un donante no inmunizado proporciona una mejor representación del posible repertorio de anticuerpos, y también permite la construcción de una biblioteca de anticuerpos usando cualquier especie de animal (humana o no humana) en la que la hepsina no sea antigénica. Para bibliotecas que incorporan la construcción de genes de anticuerpos *in vitro*, los citoblastos se recogen del individuo para proporcionar ácidos nucleicos que codifican segmentos de genes de anticuerpos sin reorganizar. Las células inmunitarias de interés pueden obtenerse a partir de una variedad de especies de animales tales como especies humanas, de ratón, de rata, de lagomorfo, luprina, canina, felina, porcina, bovina, equina y aviar, etc.

Segmentos de genes variables de anticuerpos que codifican ácidos nucleicos (incluyendo segmentos de VH y VL) se recuperan de las células de interés y se amplifican. En el caso de bibliotecas de genes VH y VL reorganizadas, el ADN deseado puede obtenerse aislando ADN genómico o ARNm de linfocitos, seguido de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores que hacen coincidir los extremos 5' y 3' de los genes VH y VL reorganizados como se describe en Orlandi y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 3833-3837 (1989), produciendo así diversos repertorios de genes V para la expresión. Los genes V pueden amplificarse a partir de ADNc y ADN genómico, con cebadores inversos en el extremo 5' del exón que codifica el dominio V maduro y cebadores directos basados dentro del segmento J como se describe en Orlandi y col. (1989) y en Ward y col., Nature, 341: 544-546 (1989). Sin embargo, para amplificar a partir de ADNc, los cebadores inversos también pueden basarse en el exón conductor como se describe en Jones y col., Biotechnol., 9: 88-89 (1991), y los cebadores directos dentro de la región constante como se describe en Sastry y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 5728-5732 (1989). Para maximizar la complementariedad puede incorporarse degeneración en los cebadores como se describe en Orlandi y col. (1989) o Sastry y col. (1989). Preferentemente, la diversidad de bibliotecas se maximiza usando cebadores de PCR elegidos como diana para cada familia del gen V con el fin de amplificar todas las disposiciones de VH y VL disponibles presentes en la muestra de ácidos nucleicos de células inmunitarias, por ejemplo, como se describe en el método de Marks y col., J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991) o como se describe en el método de Orum y col., Nucleic Acids Res., 21: 4491-4498 (1993). Para clonar el ADN amplificado en vectores de expresión, sitios de restricción raros pueden introducirse dentro del cebador de PCR como una marca en un extremo como se describe en Orlandi y col. (1989), o por posterior amplificación por PCR con un cebador marcado como se describe en Clackson y col., Nature, 352: 624-628 (1991).

Pueden derivarse repertorios de genes V sintéticamente reorganizados *in vitro* de segmentos de genes V. La mayoría de los segmentos de genes VH humanos se han clonado y secuenciado (informado en Tomlinson y col., J. Mol. Biol., 227: 776-798 (1992)) y mapeado (informado en Matsuda y col., Nature Genet., 3: 88-94 (1993)); estos segmentos clonados (incluyendo todas las conformaciones principales del bucle H1 y H2) pueden usarse para generar diversos repertorios de genes VH con cebadores de PCR que codifican bucles H3 de diversa secuencia y longitud como se describe en Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992). Los repertorios de VH también pueden prepararse con toda la diversidad de secuencias centrada en un bucle H3 largo de una única longitud como se describe en Barbas y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457-4461 (1992). Los segmentos de V κ y V λ humanos se han clonado y secuenciado (informado en Williams y Winter, Eur. J. Immunol., 23: 1456-1461 (1993)) y pueden usarse para producir repertorios de cadenas ligeras sintéticas. Los repertorios de genes V sintéticos, basados en un intervalo de veces de VH y VL, y longitudes de L3 y H3, codificarán anticuerpos de considerable diversidad estructural. Tras la amplificación del gen V que codifica ADN, los segmentos del gen V de la línea germinal pueden reorganizarse *in vitro* según los métodos de Hoogenboom y Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992).

Pueden construirse repertorios de fragmentos de anticuerpos combinando repertorios de genes VH y VL juntos de varias formas. Cada repertorio puede crearse en diferentes vectores, y los vectores recombinarse *in vitro*, por ejemplo, como se describe en Hogrefe y col., Gene, 128: 119-126 (1993), o *in vivo* por infección combinatoria, por ejemplo, el sistema loxP descrito en Waterhouse y col., Nucl. Acids Res., 21: 2265-2266 (1993). El enfoque de recombinación *in vivo* explota la naturaleza bicatenaria de fragmentos Fab para superar el límite en el tamaño de biblioteca impuesto por la eficiencia de transformación de *E. coli*. Los repertorios de VH y VL sin tratamiento previo se clonan por separado, uno en un fagémido y el otro en un vector de fago. Entonces, las dos bibliotecas se combinan por infección en fago de bacterias que contienen fagémido de manera que cada célula contiene una combinación diferente y el tamaño de biblioteca está limitado sólo por el número de células presentes (aproximadamente 10^{12} clones). Ambos vectores contienen señales de recombinación *in vivo* de manera que los genes VH y VL se recombinan sobre un único replicón y se co-encapsidan en viriones de fago. Estas enormes bibliotecas proporcionan grandes números de diversos anticuerpos de buena afinidad (K_d^{-1} de aproximadamente 10^8 M).

Alternativamente, los repertorios pueden clonarse secuencialmente en el mismo vector, por ejemplo, como se describe en Barbas y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7978-7982 (1991), o ensamblarse juntos por PCR y luego clonarse, por ejemplo, como se describe en Clackson y col., Nature, 352: 624-628 (1991). El ensamblaje por PCR también puede usarse para unir ADN de VH y VL con ADN que codifica un espaciador de péptidos flexible para formar repertorios de Fv monocatenarios (scFv). En otra técnica más, "en ensamblaje por PCR en células" se usa para combinar genes VH y VL dentro de linfocitos por PCR y luego clonar repertorios de genes ligados como se describe en Embleton y col., Nucl. Acids Res., 20: 3831-3837 (1992).

Los anticuerpos producidos por bibliotecas sin tratamiento previo (tanto naturales como sintéticas) pueden ser de afinidad moderada (K_d^{-1} de aproximadamente 10^6 a 10^7 M $^{-1}$), pero la maduración por afinidad también puede imitarse *in vitro* construyendo y reseleccionando de bibliotecas secundarias como se describe en Winter y col. (1994), arriba. Por ejemplo, pueden introducirse mutaciones al azar *in vitro* usando polimerasa propensa a error (informado en Leung y col., Technique, 1: 11-15 (1989)) en el método de Hawkins y col., J. Mol. Biol., 226: 889-896 (1992) o en el método de Gram y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 3576-3580 (1992). Adicionalmente, la maduración por afinidad puede realizarse mutando al azar una o más CDR, por ejemplo, usando PCR con cebadores que llevan secuencia al azar que abarca la CDR de interés, en clones de Fv individuales seleccionados y cribando clones de afinidad superior. El documento WO 96/07754 (publicado el 14 de marzo de 1996) describe un método para inducir mutagénesis en una región determinante de la complementariedad de una cadena ligera de la inmunoglobulina para crear una biblioteca de genes de la cadena ligera. Otro enfoque eficaz es recombinar los dominios de VH o VL seleccionados por expresión en fago con repertorios de variantes del dominio de V que se producen naturalmente obtenidas a partir de donantes no inmunizados y cribar para mayor afinidad en varias rondas de rebarajado de cadenas como se describe en Marks y col., Biotechnol., 10: 779-783 (1992). Esta técnica permite la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos con afinidades en el intervalo de 10^9 M.

Se conocen en la técnica las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos de la hepsina. La secuencia de ácidos nucleicos que codifica la hepsina puede diseñarse usando la secuencia de aminoácidos de la región deseada de hepsina. Como es muy conocido en la técnica, hay dos isoformas de corte y empalme importantes de hepsina, hepsina IIIb y hepsina IIIc. Las secuencias de hepsina son muy conocidas en la técnica y pueden incluir las secuencias mostradas en las Figuras 7 y 8.

Los ácidos nucleicos que codifican hepsina pueden prepararse mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, síntesis química por cualquiera de los métodos descritos en Engels y col., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 28: 716-734 (1989), tales como los métodos de triéster, fosfito, fosforamido y H-fosfonato. En una realización, codones preferidos por la célula huésped de expresión se usan en el diseño del ADN que codifica la hepsina. Alternativamente, el ADN que codifica la hepsina puede aislarse de una biblioteca genómica o de ADNc.

Tras la construcción de la molécula de ADN que codifica la hepsina, la molécula de ADN está operativamente ligada a una secuencia de control de la expresión en un vector de expresión, tal como un plásmido, en el que la secuencia de control es reconocida por una célula huésped transformada con el vector. En general, los vectores plasmídicos contienen secuencias de replicación y de control que se derivan de especies compatibles con la célula huésped. El vector generalmente lleva un sitio de replicación, además de secuencias que codifican proteínas que pueden proporcionar selección fenotípica en células transformadas. Vectores adecuados para la expresión en células huésped procariontas y eucariotas se conocen en la técnica y algunos se describen adicionalmente en el presente documento. Pueden usarse organismos eucariotas, tales como levaduras, o células derivadas de organismos multicelulares, tales como mamíferos.

Opcionalmente, el ADN que codifica la hepsina está operativamente ligado a una secuencia conductora secretora que produce la secreción del producto de expresión por la célula huésped en el medio de cultivo. Ejemplos de secuencias conductoras secretoras incluyen stII, ecotina, lamB, herpes GD, lpp, fosfatasa alcalina, invertasa y factor alfa. También es adecuado para su uso en el presente documento la secuencia conductora de 36 aminoácidos de la proteína A (Abrahmsen y col., EMBO J., 4: 3901 (1985)).

Se transfectan células huésped y preferentemente se transforman con los vectores de expresión o de clonación anteriormente descritos de la presente invención y se cultivan en medios nutritivos convencionales modificados según convenga para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

La transfección se refiere a la captación de un vector de expresión por una célula huésped tanto si cualquier secuencia codificante se expresa de hecho como si no. El experto en la materia conoce numerosos métodos de transfección, por ejemplo, precipitación con CaPO_4 y electroporación. La transfección satisfactoria se reconoce generalmente cuando se produce cualquier indicación de la operación de este vector dentro de la célula huésped. Los métodos de transfección son muy conocidos en la técnica, y algunos se describen adicionalmente en el presente documento.

La transformación significa introducir ADN en un organismo de manera que el ADN sea replicable, tanto como un elemento extracromosómico como por integrante cromosómico. Dependiendo de la célula huésped usada, la transformación se hace usando técnicas convencionales apropiadas para tales células. Métodos para la transformación son muy conocidos en la técnica, y algunos se describen adicionalmente en el presente documento.

Las células huésped procariontas usadas para producir la hepsina pueden cultivarse como se describe generalmente en Sambrook y col., arriba.
Las células huésped de mamífero usadas para producir la hepsina pueden cultivarse en una variedad de medios, que es muy conocido en la técnica, y algunos de los cuales se describen en el presente documento.

Las células huésped citadas en la presente divulgación engloban células en cultivo *in vitro*, además de células que están dentro de un animal huésped.

La purificación de hepsina puede llevarse a cabo usando métodos reconocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen en el presente documento.

La hepsina purificada puede unirse a una matriz adecuada tal como perlas de agarosa, perlas de acrilamida, perlas de vidrio, celulosa, diversos copolímeros acrílicos, geles de metacrilato de hidroxilo, copolímeros poliacrílicos y polimetacrílicos, nailon, vehículos neutros e iónicos, y similares, para su uso en la separación cromatográfica por afinidad de clones de expresión en fago. La unión de la proteína hepsina a la matriz puede llevarse a cabo por los métodos descritos en *Methods in Enzymology*, vol. 44 (1976). Una técnica comúnmente empleada para unir ligandos de proteína a matrices de polisacárido, por ejemplo, agarosa, dextrano o celulosa, implica la activación del vehículo con haluros de cianógeno y el posterior acoplamiento de las aminas primarias alifáticas o aromáticas del ligando del péptido a la matriz activada.

Alternativamente, puede usarse hepsina para recubrir los pocillos de placas de adsorción, expresarse sobre células huésped fijadas a placas de adsorción o usarse en la clasificación de células, o conjugarse con biotina para la captura con perlas recubiertas de estreptavidina, o usarse en cualquier otro método conocido en la técnica para inmunopurificar bibliotecas de expresión en fago.

Las muestras de bibliotecas de fagos se ponen en contacto con hepsina inmovilizada en condiciones adecuadas para la unión de al menos una parte de las partículas de fago al adsorbente. Normalmente, las condiciones, que incluyen pH, fuerza iónica, temperatura y similares, se seleccionan para imitar condiciones fisiológicas. Los fagos unidos a la fase sólida se lavan y luego se eluyen con ácido, por ejemplo, como se describe en Barbas y col., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 88: 7978-7982 (1991), o con álcali, por ejemplo como se describe en Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), o por competencia de antígeno por hepsina, por ejemplo en un procedimiento similar al método

de competencia por antígeno de Clackson y col., *Nature*, 352: 624-628 (1991). Los fagos pueden enriquecerse 20-1.000 veces en una única ronda de selección. Además, los fagos enriquecidos pueden cultivarse en cultivo bacteriano y someterse a rondas adicionales de selección.

5 La eficiencia de la selección depende de muchos factores, que incluyen la cinética de disociación durante el lavado, y de si múltiples fragmentos de anticuerpos en un único fago pueden engranarse o no simultáneamente con el antígeno. Los anticuerpos con cinética de disociación rápida (y afinidades de unión débiles) pueden ser retenidos usando lavados cortos, expresión en fago multivalente y alta densidad de recubrimiento de antígeno en fase sólida. La alta densidad no sólo estabiliza el fago mediante interacciones multivalentes, sino que favorece la unión del fago
10 que se ha disociado. La selección de anticuerpos con cinética de disociación lenta (y buenas afinidades de unión) puede promoverse usando lavados largos y expresión en fago monovalente como se describe en Bass y col., *Proteínas*, 8: 309-314 (1990) y en el documento WO 92/09690, y una baja densidad de recubrimiento de antígeno como se describe en Marks y col., *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992).

15 Es posible seleccionar entre anticuerpos de fago de diferentes afinidades, incluso con afinidades que se diferencian ligeramente, para hepsina. Sin embargo, la mutación al azar de un anticuerpo seleccionado (por ejemplo, como se realiza en algunas de las técnicas de maduración por afinidad descritas anteriormente) es probable que dé lugar a muchos mutantes, la mayoría de los cuales une a antígeno, y algunos con mayor afinidad. Con hepsina limitante, fagos de alta afinidad raros podrían ser más competitivos. Para retener todos los mutantes de mayor afinidad, los
20 fagos pueden incubarse con hepsina biotinilada en exceso, pero con la hepsina biotinilada a una concentración de menor molaridad que la constante de afinidad molar diana para hepsina. Los fagos de unión por alta afinidad pueden entonces ser capturados por perlas paramagnéticas recubiertas de estreptavidina. Tal "captura en equilibrio" permite que los anticuerpos se seleccionen según sus afinidades de unión, con sensibilidad que permite el aislamiento de clones mutantes con afinidad de tan sólo dos veces superior a un gran exceso de fagos con menor afinidad. Las
25 condiciones usadas en el lavado de fagos unidos a una fase sólida también pueden manipularse para discriminar basándose en la cinética de disociación.

Pueden seleccionarse por actividad clones de hepsina. Los clones de Fv correspondientes a tales anticuerpos para hepsina pueden seleccionarse (1) aislando clones de hepsina de una biblioteca de fagos como se ha descrito
30 anteriormente y opcionalmente amplificando la población aislada de clones de fago cultivando la población en un huésped bacteriano adecuado; (2) seleccionando hepsina y una segunda proteína contra la que se desea actividad de bloqueo y de no bloqueo, respectivamente; (3) adsorbiendo los clones del fago anti-hepsina a hepsina inmovilizada; (4) usando un exceso de la segunda proteína para eluir cualquier clon no deseado que reconozca determinantes de unión a hepsina que solapan o son compartidos con los determinantes de unión de la segunda
35 proteína; y (5) eluyendo los clones que siguen adsorbidos tras la etapa (4). Opcionalmente, los clones con las propiedades de bloqueo/no bloqueo deseados pueden enriquecerse adicionalmente repitiendo una o más veces los procedimientos de selección descritos en el presente documento.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales derivados de hibridoma o clones de Fv de expresión en fago de la invención se aísla fácilmente y se secuencia usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando
40 cebadores de oligonucleótidos diseñados para amplificar específicamente las regiones codificantes de las cadenas pesadas y ligeras de interés del molde de ADN de hibridoma o fago). Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión, que luego se transfectan en células huésped tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otro modo no producen proteína de inmunoglobulina, para obtener la síntesis de los anticuerpos monoclonales deseados en las células huésped
45 recombinantes. Los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica anticuerpo incluyen Skerra y col., *Curr. Opin. Immunol.*, 5: 256 (1993) y Plückerthun, *Immunol. Revs.*, 130: 151 (1992).

El ADN que codifica los clones de Fv de la invención puede combinarse con secuencias de ADN conocidas que
50 codifican regiones constantes de las cadenas pesadas y/o ligeras (por ejemplo, las secuencias de ADN apropiadas pueden obtenerse de Kabat y col., arriba) para formar clones que codifican cadenas pesadas y/o ligeras de longitud completa o parcial. Se apreciará que regiones constantes de cualquier isotipo puedan usarse para este fin, que incluyen regiones constantes de IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, y que tales regiones constantes puedan obtenerse de cualquier especie humana o animal. Un clon de Fv se derivó del ADN del dominio variable de una especie animal (tal
55 como humana) y luego se fusionó con ADN de la región constante de otra especie animal para formar secuencia(s) codificante(s) para cadena pesada y/o cadena ligera de longitud completa "híbrida" se incluye en la definición de anticuerpo "quimérico" e "híbrido" como se usa en el presente documento. En una realización preferida, un clon de Fv derivado de ADN variable humano está fusionado con ADN de la región constante humana para formar secuencia(s) codificante(s) para todas las cadenas pesadas y/o ligeras humanas de longitud completa o parcial.

60 El ADN que codifica anticuerpo anti-hepsina derivado de un hibridoma de la invención también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante por dominios constantes de las cadenas pesadas y cadenas ligeras humanas en lugar de secuencias murinas homólogas derivadas del clon de hibridoma (por ejemplo, como en el método de Morrison y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)). El ADN que codifica un anticuerpo
65 o fragmento derivado de hibridoma o clon de Fv puede modificarse adicionalmente uniéndose covalentemente a la

secuencia codificante de la inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido de no inmunoglobulina. De este modo se preparan anticuerpos “quiméricos” o “híbridos” que tienen la especificidad de unión del clon de Fv o anticuerpos derivados del clon de hibridoma de la invención.

5 *Fragmentsos de anticuerpos*

La presente invención engloba 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.

10 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 de rescate se describe en la patente de EE. UU. n.º 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, por ejemplo, el documento WO 93/16185; las patentes de EE. UU. n.º 5.571.894; y 5.587.458). Fv y sFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos que carecen de regiones constantes; por tanto, son 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.º 5.641.870. Tales fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o

15

20

25

30

biespecíficos.

Anticuerpos humanizados

La presente invención engloba anticuerpos humanizados. En la técnica se conocen diversos métodos para humanizar anticuerpos no humanos. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado puede tener uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él de una fuente que es no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan frecuentemente en lo sucesivo residuos de “importación”, que se toman normalmente de un dominio variable de “importación”. La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones y col. (1986) Nature 321:522-525; Riechmann y col. (1988) Nature 332:323-327; Verhoeyen y col. (1988) Science 239:1534-1536) sustituyendo las secuencias de la región hipervariable por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales anticuerpos “humanizados” son anticuerpos quiméricos (patente de EE. UU. n.º 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido con la secuencia correspondiente de un especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de la región hipervariable y posiblemente algunos residuos de FR están sustituidos con residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

35

40

45

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que van a usarse en la producción de anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. Según el llamado método “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 humana que está más próxima a la del roedor es entonces aceptada como la región estructural humana para el anticuerpo humanizado (Sims y col. (1993) J. Immunol. 151:2296; Chothia y col. (1987) J. Mol. Biol. 196:901. Otro método 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. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285; Presta y col. (1993) J. Immunol., 151:2623.

50

55

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 método, 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

60

65

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 al antígeno.

5

Anticuerpos humanos

Los anticuerpos anti-hepsina humanos de la invención pueden construirse combinando secuencia(s) del dominio variable del clon de Fv seleccionada(s) de bibliotecas de expresión in fago derivadas de ser humano con secuencias(s) del dominio constante humano conocida(s) como se ha descrito anteriormente. Alternativamente, los anticuerpos anti-hepsina monoclonales humanos de la invención pueden producirse por el método de hibridoma. Se han descrito líneas de células de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos, por ejemplo, por Kozbor J. *Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur y col., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner y col., *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).

10

15

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 (JH) en ratones quiméricos y mutantes de la línea germinal produce la inhibición completa de la producción de anticuerpo endógeno. La transferencia de la matriz del gen de inmunoglobulina de la línea germinal humana en tales ratones mutantes de la línea germinal producirá la producción de anticuerpos humanos tras la exposición a antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits y col., *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 90: 2551 (1993); Jakobovits y col., *Nature*, 362: 255 (1993); Bruggermann y col., *Year in Immunol.*, 7: 33 (1993).

20

25

También puede usarse barajado de genes para derivar anticuerpos humanos de no humanos, por ejemplo, de roedor, en el que el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares al anticuerpo no humano de partida. Según este método, que también se llama "sellado de epítopos", tanto la región variable de la cadena pesada como de la ligera de un fragmento de anticuerpo no humano obtenido por técnicas de expresión in fago como se describen anteriormente están sustituidas con un repertorio de genes del dominio V humano, creando una población de quimeras de scFv o Fab de cadena no humana/cadena humana. La selección con antígeno produce el aislamiento de un scFv o Fab quimérico de cadena no humana/cadena humana en el que la cadena humana restaura el sitio de unión al antígeno destruido tras la eliminación de la cadena no humana correspondiente en el clon de expresión in fago primario, es decir, el epítipo gobierna (sella) la elección del componente de la cadena humana. Si el proceso se repite con el fin de sustituir la cadena no humana restante, se obtiene un anticuerpo humano (véase el documento PCT WO 93/06213 publicado el 1 de abril de 1993). A diferencia de la humanización tradicional de anticuerpos no humanos por injerto de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen residuos de FR o CDR de origen no humano.

30

35

Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferentemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión por al menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es por hepsina y la otra es por cualquier otro antígeno. Los anticuerpos biespecíficos a modo de ejemplo pueden unirse a dos epítopos diferentes de hepsina. Los anticuerpos biespecíficos también pueden usarse para localizar agentes citotóxicos a células que expresan hepsina. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a hepsina y un brazo que se une al agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti-interferón- α , alcaloide de la vinca, cadena A de ricina, metotrexato o hapteno de isótopo radiactivo). Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

50

Se conocen métodos para producir anticuerpos biespecíficos en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina en los que las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello, *Nature* 305:537 (1993)). 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 publicado el 13 de mayo de 1993 y en Traunecker y col., *EMBO J.*, 10:3655 (1991).

55

60

Según un enfoque diferente y más preferido, 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. La fusión es preferentemente con un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (CH1), que contiene el sitio necesario para la unión a cadena ligera, presente en al menos una de

65

las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. 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 los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas de polipéptidos en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptidos en relaciones iguales produzca altos rendimientos o cuando las relaciones no sean de significancia particular.

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).

Según otro enfoque, 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 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, 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.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse a avidina, el otro a biotina. Tales anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para elegir como diana células del sistema inmunitario para células no deseadas (patente de EE. UU. n.º 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 método de reticulación conveniente. Agentes de reticulación adecuados son muy conocidos en la técnica y se desvelan en la patente de EE. UU. n.º 4.676.980, junto con varias técnicas de reticulación.

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

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. El anticuerpo biespecífico así formado podía unirse a células que expresaban en exceso el receptor HER2 y linfocitos T humanos normales, además de provocar 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 luego se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpos. Este método 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 dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de cadena ligera (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 al 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).

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

Anticuerpos multivalentes

- 10 Un anticuerpo multivalente puede ser internalizado (y/o catabolizado) más rápido que un anticuerpo bivalente por una célula que expresa un antígeno al que se unen los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención puede ser anticuerpos multivalentes (que son distintos de los de la clase de IgM) con tres o más sitios de unión al antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que pueden ser fácilmente producidos por expresión recombinante de ácido nucleico que codifica las cadenas de polipéptidos del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión al 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 al 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 preferentemente cuatro, sitios de unión al antígeno. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena de polipéptidos (y preferentemente 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 adicionalmente preferentemente al menos dos (y preferentemente 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.

Variantes de anticuerpo

- 35 En algunas realizaciones se contemplan modificación (modificaciones) de secuencias de aminoácidos de los anticuerpos descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede desearse mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ácido nucleico del anticuerpo, o por síntesis de péptidos. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de, y/o inserciones en y/o sustituciones de, residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se hace cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Las alteraciones de aminoácidos pueden introducirse en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo objeto en el momento de producirse la secuencia.

- 45 Un método útil para la identificación de ciertos residuos o regiones del anticuerpo que son las localizaciones preferidas para mutagénesis se llama "mutagénesis por barrido de alanina" como se describe por Cunningham y Well (1989) Science, 244:1081-1085. Aquí se identifica un residuo o grupo de residuos diana (por ejemplo, residuos cargados tales como arg, asp, his, lys y glu) y se sustituyen con un aminoácido neutro o negativamente cargado (lo más preferentemente alanina o polialanina) para afectar la interacción de los aminoácidos con antígeno. Entonces, aquellas localizaciones de aminoácidos que demuestran sensibilidad funcional a las sustituciones se refinan introduciendo más u otras variantes en, o para, los sitios de sustitución. Por tanto, mientras que el sitio para la introducción de una variación de la secuencia de aminoácidos está predeterminado, la naturaleza de la mutación por sí misma no necesita predeterminarse. Por ejemplo, para analizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, el barrido de ala o la mutagénesis al azar se realiza en el codón o región diana y las inmunoglobulinas expresadas se criban para la actividad deseada.

- 55 Las inserciones de secuencias de aminoácidos incluyen fusiones de extremos amino y/o carboxilo que oscilan en longitud de un residuo a polipéptidos que contienen cien o más residuos, además de inserciones secuencia dentro de la secuencia de un único o múltiples residuos de aminoácidos. Ejemplos de inserciones terminales incluyen un anticuerpo con un residuo de metionilo en el extremo N o el anticuerpo fusionado con un polipéptido citotóxico. Otras variantes de inserción de la molécula de anticuerpo incluyen la fusión al extremo N o C del anticuerpo a una enzima (por ejemplo, para ADEPT) o un polipéptido que aumenta la semivida en suero del anticuerpo.

- 65 La glicosilación de polipéptidos está normalmente tanto ligada a N como ligada a O. Ligado a N se refiere a la unión del resto hidrato de carbono a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias de tripéptidos asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina en las que X es cualquier aminoácido, excepto prolina, son las

secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del resto hidrato de carbono a la cadena lateral de asparagina. Por tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptidos en un polipéptido crea un posible sitio de glicosilación. La glicosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, el más comúnmente serina o treonina, aunque también puede usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se realiza convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de forma que contenga una o más de las secuencias de tripéptidos anteriormente descritas (para sitios de glicosilación ligados a N). La alteración también puede hacerse mediante la adición de, o sustitución con, uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glicosilación ligados a O).

Si el anticuerpo comprende una región Fc, el hidrato de carbono unido al mismo puede alterarse. Por ejemplo, anticuerpos con una estructura de hidrato de carbono madura que carece de fucosa unida a una región Fc del anticuerpo se describen en la solicitud de patente de EE. UU. n.º US 2003/0157108 (Presta, L.). Véase también el documento US 2004/0093621 (Kyowa HAKKO Kogyo Co., Ltd). Lo anticuerpos con una N-acetilglucosamina bisecante (GlcNAc) en el hidrato de carbono unido a una región Fc del anticuerpo se mencionan en el documento WO 2003/011878, Jean-Mairet y col. y la patente de EE. UU. n.º 6.602.684, Umana y col. Anticuerpos con al menos un residuo de galactosa en el oligosacárido unido a una región Fc del anticuerpo se informan en el documento WO 1997/30087, Patel y col. Véanse, por tanto, el documento WO 1998/58964 (Raju, S.) y el documento WO 1999/22764 (Raju, S.) referente a anticuerpos con hidrato de carbono alterado unidos a la región Fc de los mismos. Véase también el documento US 2005/0123546 (Umana y col.) sobre moléculas de unión al antígeno con glicosilación modificada.

La variante de glicosilación preferida en el presente documento comprende una región Fc, en la que una estructura de hidrato de carbono unida a la región Fc carece de fucosa. Tales variantes tienen función ADCC mejorada. Opcionalmente, la región Fc comprende además una o más sustituciones de aminoácidos en su interior que mejoran adicionalmente ADCC, por ejemplo, sustituciones en las posiciones 298, 333 y/o 334 de la región Fc (numeración de residuos Eu). Ejemplos de publicaciones relacionadas con los anticuerpos “desfucosilados” o “deficientes en fucosa” incluyen: documentos US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; Okazaki y col. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki y col. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Ejemplos de líneas celulares que producen anticuerpos desfucosilados incluyen células Lec13 CHO deficientes en la fucosilación de proteínas (Ripka y col. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); solicitud de patente de EE. UU. n.º US 2003/0157108 A1, Presta, L.; y documento WO 2004/056312 A1, Adams y col., especialmente en el Ejemplo 11) y líneas celulares de genes inactivados tales como el gen alfa-1,6-fucosiltransferasa, FUT8, células CHO de genes inactivados (Yamane-Ohnuki y col. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)).

Otro tipo de variante es una variante de sustitución de aminoácidos. Estas variantes tienen al menos un residuo de aminoácido (al menos dos, al menos tres, al menos 4 o más) en la molécula de anticuerpo sustituida con un residuo diferente. Los sitios de mayor interés para la mutagénesis de sustitución incluyen las regiones hipervariables, pero también se contemplan alteraciones de FR. Las sustituciones conservativas se muestran en la Tabla A bajo el encabezamiento de “Sustituciones preferidas”. Si tales sustituciones producen un cambio en la actividad biológica, entonces pueden introducirse cambios más sustanciales, denominados “Sustituciones a modo de ejemplo” en la Tabla A, o como se describen adicionalmente más adelante en referencia a clases de aminoácidos, y cribarse los productos.

Tabla A

Residuo original	Sustituciones 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
(V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Modificaciones sustanciales en las propiedades biológicas del anticuerpo 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 conformación de hoja o helicoidal, (b) la carga o hidrofobia de la molécula en el sitio diana, o (c) la masa de la cadena lateral. Los residuos que se producen naturalmente se dividen en grupos basados en propiedades de la cadena lateral 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; y
- (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

Las sustituciones no conservativas supondrán el intercambio de un miembro de una de estas clases con otra clase.

Un tipo 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 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. Los anticuerpos así generados se expresan en partículas de fago filamentosas como fusiones con el producto génico III de M 13 encapsidada 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, la mutagénesis por barrido de alanina puede realizarse para identificar residuos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión al 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 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 ha descrito 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 una variedad de métodos conocidos en la técnica. Estos métodos 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.

Puede desearse introducir una o más modificaciones de aminoácidos en una región Fc de los polipéptidos de inmunoglobulina de la invención, generándose así una variante de la región Fc. La variante de la región Fc puede comprender una secuencia de la región Fc humana (por ejemplo, una región Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 humana) que comprende una modificación de aminoácido (por ejemplo, una sustitución) en una o más posiciones de aminoácidos que incluyen la de una cisteína bisagra.

Según la presente descripción y las enseñanzas de la técnica, se contempla que en algunas realizaciones un anticuerpo usado en métodos de la invención pueda comprender una o más alteraciones con respecto al anticuerpo homólogo natural, por ejemplo, en la región Fc. Sin embargo, estos anticuerpos retendrían sustancialmente las mismas características requeridas para la utilidad terapéutica con respecto a su homólogo natural. Por ejemplo, se cree que pueden hacerse ciertas alteraciones en la región Fc que producirían unión de C1q alterada (es decir, tanto mejorada como disminuida) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), por ejemplo, como se describe en el documento WO99/51642. Véase también Duncan & Winter Nature 322:738-40 (1988); la patente de EE. UU. n.º 5.648.260; la patente de EE. UU. n.º 5.624.821; y el documento WO94/29351 referente a otros ejemplos de variantes de región Fc. El documento WO00/42072 (Presta) y el documento WO 2004/056312 (Lowman) describen variantes de anticuerpo con unión mejorada o disminuida a FcR. Por tanto, véase, Shields y col., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001). Los anticuerpos con semividas elevadas y unión mejorada al receptor de Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer y col., J. Immunol. 117:587 (1976) y Kim y col., J. Immunol. 24:249 (1994)), se describen en el documento US2005/0014934A1 (Hinton y col.). Estos anticuerpos

comprenden una región Fc con una o más sustituciones en su interior que mejoran la unión de la región Fc a FcRn. Las variantes de polipéptidos con secuencias de aminoácidos de región Fc alteradas y capacidad de unión a C1q elevada o disminuida se describen en la patente de EE. UU. n.º 6.194.551B1, documento WO99/51642. Por tanto, véase, Idusogie y col. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000).

5

Derivados de anticuerpos

Los anticuerpos de la presente invención pueden modificarse adicionalmente para contener restos no proteínicos adicionales que se conocen en la técnica y están fácilmente disponibles. Preferentemente, los restos adecuados para la derivatización del anticuerpo son polímeros solubles en agua. Ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (tanto homopolímeros como copolímeros al azar) y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)-polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol), poli(alcohol vinílico) y mezclas de los mismos. El polietilenglicol-propionaldehído puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular, y puede estar ramificada o sin ramificar. El número de polímeros unidos al anticuerpo puede variar, y si está unido más de un polímero, pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, el número y/o tipo de polímeros usados para la derivatización pueden determinarse basándose en consideraciones que incluyen, pero no se limitan a, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo que va a mejorarse, si el anticuerpo derivado se usará o no en una terapia en condiciones definidas, etc.

10

15

20

Cribado de anticuerpos con propiedades deseadas

Los anticuerpos de la presente invención pueden caracterizarse por sus propiedades físicas/químicas y funciones biológicas por diversos ensayos conocidos en la técnica (algunos de los cuales se desvelan en el presente documento). En algunas realizaciones, los anticuerpos se caracterizan para una cualquiera o más de reducción o bloqueo de la unión a hepsina, reducción o bloqueo de la actividad de hepsina, reducción o bloqueo de hepsina y/o sustrato de hepsina (por ejemplo, pro-MSP, pro-uPA, factor VII, pro-HGF) aguas abajo de la señalización molecular, y/o tratamiento y/o prevención de un tumor, trastorno proliferativo de células o un cáncer; y/o tratamiento o prevención de un trastorno asociado a la expresión y/o actividad de hepsina (tal como elevada expresión y/o actividad de hepsina). En algunas realizaciones, la actividad de hepsina es actividad enzimática de la hepsina. En una realización, la actividad enzimática comprende la escisión de sustrato de polipéptido de hepsina. En una realización, el sustrato de polipéptido de hepsina es uno o más de pro-proteína estimulante de macrófagos (pro-MSP), pro-uPA, factor VII y pro-HGF. La activación por hepsina de pro-MSP se describe en la solicitud de patente provisional de EE. UU. del mismo solicitante en tramitación junto con la presente n.º 61/253.990, presentada el 22 de octubre de 2009. En una realización, la actividad enzimática comprende la escisión de un sustrato sintético de hepsina. En algunas realizaciones, el sustrato sintético de hepsina es un sustrato mostrado en la Tabla 1.

30

35

40

45

50

Los anticuerpos purificados pueden caracterizarse adicionalmente por una serie de ensayos que incluyen, pero no se limitan a, secuenciación del extremo N, análisis de aminoácidos, cromatografía líquida de alta presión (HPLC) con exclusión por tamaño no desnaturante, espectrometría de masas, cromatografía de intercambio iónico y digestión con papaína.

En ciertas realizaciones de la invención, los anticuerpos producidos en el presente documento se analizan para su actividad biológica. En algunas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención se prueban para su actividad de unión al antígeno. Los ensayos de unión al antígeno que se conocen en la técnica y pueden usarse en el presente documento incluyen sin limitación cualquier ensayo de unión directa o competitiva usando técnicas tales como transferencias Western, radioinmunoensayos, ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción), inmunoensayos de "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos fluorescentes e inmunoensayos de proteína A. Unión al antígeno ilustrativa y otro ensayo se proporcionan más adelante en la sección de ejemplos.

Si se desea un anticuerpo anti-hepsina que inhiba el crecimiento celular, el anticuerpo candidato puede probarse en ensayos *in vitro* y/o *in vivo* que miden la inhibición del crecimiento celular. Métodos para examinar el crecimiento y/o proliferación de una célula cancerosa son muy conocidos en la técnica. Métodos a modo de ejemplo para determinar el crecimiento y/o proliferación y/o apoptosis celular incluyen, por ejemplo, ensayo de incorporación de BrdU, MTT, incorporación de [3H]-timidina (por ejemplo, ensayo TopCount (PerkinElmer)), ensayos de viabilidad celular (por ejemplo, CellTiter-Glo (Promega)), y similares.

55

60

65

En una realización, la presente invención contempla un anticuerpo que posee funciones efectoras. En ciertas realizaciones, se miden las actividades de Fc del anticuerpo. Pueden realizarse ensayos de citotoxicidad *in vitro* y/o *in vivo* para confirmar la reducción/agotamiento de actividades CDC y/o ADCC. Por ejemplo, pueden realizarse ensayos de unión del receptor de Fc (FcR) para garantizar que el anticuerpo carece de unión a Fc γ R (por tanto, probablemente carece de actividad de ADCC), pero retiene capacidad de unión a FcRn. Las células primarias para mediar en ADCC, células NK, expresan Fc γ RIII solo, mientras que los monocitos expresan Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII.

La expresión de FcR sobre células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991). Un ejemplo de un ensayo *in vitro* para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés se describe en la patente de EE. UU. n.º 5.500.362 o 5.821.337. Un ensayo para detectar la actividad de ADCC también se ejemplifica en el presente documento. Células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y linfocitos citolíticos espontáneos (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el desvelado en Clynes y col., PNAS (USA) 95:652-656 (1998). También pueden llevarse a cabo ensayos de unión a C1q para confirmar que el anticuerpo es incapaz de unirse a C1q y, por tanto, carece de actividad CDC. Para evaluar la activación del complemento puede realizarse un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro y col., J. Immunol. Methods 202:163 (1996). También pueden realizarse determinaciones de la unión a FcRn y la eliminación/semivida *in vivo* usando métodos conocidos en la técnica.

Vectores, células huésped y métodos recombinantes

Para la producción recombinante de un anticuerpo de la invención, el ácido nucleico que codifica se aísla y se inserta en un vector replicable para la posterior clonación (amplificación del ADN) o para la expresión. El ADN que codifica el anticuerpo se aísla fácilmente y se secuencian usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. La elección del vector depende en parte de la célula huésped que vaya a usarse. Generalmente, las células huésped preferidas son de origen tanto procariota como eucariota (generalmente de mamífero). Se apreciará que las regiones constantes de cualquier isotipo pueden usarse para este fin, que incluyen regiones constantes de IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, y que tales regiones constantes pueden obtenerse de cualquier especie humana o animal.

a. Generación de anticuerpos usando células huésped procariotas:

i. Construcción de vectores

Pueden obtenerse secuencias de polinucleótidos que codifican componentes de polipéptido del anticuerpo de la invención usando técnicas convencionales. Las secuencias de polinucleótidos deseadas pueden aislarse y secuenciarse a partir de células productoras de anticuerpos tales como células de hibridoma. Alternativamente, los polinucleótidos pueden sintetizarse usando sintetizador de nucleótidos o técnicas de PCR. Una vez obtenidas, las secuencias que codifican los polipéptidos se insertan en un vector recombinante que puede replicarse y expresar polinucleótidos heterólogos en huéspedes procariotas. Muchos vectores que están disponibles y son conocidos en la técnica pueden usarse con el fin de la presente invención. La selección de un vector apropiado dependerá principalmente del tamaño de los ácidos nucleicos que van a insertarse en el vector y de la célula huésped particular que va a transformarse con el vector. Cada vector contiene diversos componentes, dependiendo de su función (amplificación o expresión de polinucleótido heterólogo, o ambos) y su compatibilidad con la célula huésped particular en la que reside. Los componentes de vector generalmente incluyen, pero no se limitan a: un origen de replicación, un gen marcador de selección, un promotor, un sitio de unión a ribosoma (RBS), una secuencia señal, el inserto de ácido nucleico heterólogo y una secuencia de terminación de la transcripción.

En general, los vectores de plásmido que contienen secuencias de replicón y de control que se derivan de especies compatibles con la célula huésped se usan a propósito de estos huéspedes. El vector generalmente lleva un sitio de replicación, además de marcar las secuencias que pueden proporcionar selección fenotípica en células transformadas. Por ejemplo, *E. coli* se transforma normalmente usando pBR322, un plásmido derivado de una especie de *E. coli*. pBR322 contiene genes que codifican resistencia a ampicilina (Amp) y tetraciclina (Tet) y, por tanto, proporciona medios fáciles para identificar células transformadas. pBR322, sus derivados, u otros plásmidos microbianos o bacteriófago también puede contener, o modificarse para contener, promotores que pueden ser usados por el organismo microbiano para la expresión de proteínas endógenas. Ejemplos de derivados de pBR322 usados para la expresión de anticuerpos particulares se describen en detalle en Carter y col., patente de EE. UU. n.º 5.648.237.

Además, los vectores de fago que contienen secuencias de replicón y de control que son compatibles con el microorganismo huésped pueden usarse como vectores transformantes a propósito de estos huéspedes. Por ejemplo, el bacteriófago tal como λ GEM.TM.-11 puede utilizarse en la preparación de un vector recombinante que puede usarse para transformar células huésped susceptibles tales como LE392 de *E. coli*.

El vector de expresión de la invención puede comprender dos o más pares de promotor-cistrón que codifican cada uno los componentes del polipéptido. Un promotor es una secuencia reguladora sin traducir localizada en la dirección 5' con respecto a un cistrón que modula su expresión. Los promotores procariotas normalmente se clasifican en dos clases, inducibles y constitutivos. El promotor inducible es un promotor que inicia niveles elevados de transcripción del cistrón bajo su control en respuesta a cambios en la condición de cultivo, por ejemplo, la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura.

Son muy conocidos un gran número de promotores reconocidos mediante una variedad de posibles células huésped. El promotor seleccionado puede estar operativamente ligado a ADN de cístrón que codifica la cadena ligera o pesada eliminando el promotor de la fuente ADN por una digestión con enzima de restricción e insertando la secuencia promotora aislada en el vector de la invención. Tanto la secuencia promotora nativa como muchos promotores heterólogos pueden usarse para dirigir la amplificación y/o expresión de los genes diana. En algunas realizaciones se utilizan promotores heterólogos, ya que generalmente permiten mayor transcripción y mayores rendimientos del gen diana expresado con respecto al promotor de polipéptido diana nativo.

Los promotores adecuados para su uso con huéspedes procariotas incluyen el promotor PhoA, los sistemas de promotores de β -galactamasa y lactosa, un sistema promotor de triptófano (*trp*) y promotores híbridos tales como el promotor *tac* o *trc*. Sin embargo, también son adecuados otros promotores que son funcionales en bacterias (tales como otros promotores bacterianos o de fago conocidos). Sus secuencias de nucleótidos han sido publicadas, permitiendo así que un experto los ligue operablemente a cístrones que codifican las cadenas ligeras y pesadas diana (Siebenlist y col. (1980) Cell 20: 269) usando ligadores o adaptadores para suministrar cualquier sitio de restricción requerido.

En un aspecto de la invención, cada cístrón dentro del vector recombinante comprende un componente de secuencia señal de la secreción que dirige la translocalización de los polipéptidos expresados a través de una membrana. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN de polipéptido diana que se inserta en el vector. La secuencia señal seleccionada con el fin de la presente invención debería ser una que es reconocida y procesada (es decir, escindida por una peptidasa señal) por la célula huésped. Para células huésped procariotas que no reconocen y procesan las secuencias señal nativas para los polipéptidos heterólogos, la secuencia señal está sustituida por una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo que consiste en los conductores de fosfatasa alcalina, penicilinas, Ipp o enterotoxina estable al calor II (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA y MBP. En una realización de la invención, las secuencias señal usadas en ambos cístrones del sistema de expresión son secuencias señal de STII o variantes de las mismas.

En otro aspecto, la producción de las inmunoglobulinas según la invención puede producirse en el citoplasma de la célula huésped y, por tanto, no requiere la presencia de secuencias señal de secreción dentro de cada cístrón. En ese aspecto, las cadenas ligeras y pesadas de la inmunoglobulina se expresan, se pliegan y se ensamblan para formar inmunoglobulinas funcionales dentro del citoplasma. Ciertas cepas huésped (por ejemplo, las cepas *trxB* de *E. coli*) proporcionan condiciones de citoplasma que son favorables para la formación de enlaces disulfuro, permitiéndose así el plegamiento y ensamblaje apropiado de subunidades de proteína expresada. Proba y Plückerthun Gene, 159:203 (1995).

Células huésped procariotas adecuadas para expresar anticuerpos de la invención incluyen *Archaeobacteria* y *Eubacteria*, tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos. Ejemplos de bacterias útiles incluyen *Escherichia* (por ejemplo, *E. coli*), bacilos (por ejemplo, *B. subtilis*), *Enterobacteria*, especies de *Pseudomonas* (por ejemplo, *P. aeruginosa*), *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Shigella*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla* o *Paracoccus*. En una realización se usan células Gram-negativas. En una realización se usan células de *E. coli* como huéspedes para la invención. Ejemplos de cepas de *E. coli* incluyen la cepa W3110 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pág. 1190-1219; depósito de ATCC n.º 27.325) y derivados de las mismas, que incluyen la cepa 33D3 que tiene genotipo W3110 Δ *fhuA* (Δ *tonA*) *ptr3 lac lq lacL8 Δ ompT Δ (nmpc-fepE) degP41 kan^R* (patente de EE. UU. n.º 5.639.635). También son adecuadas otras cepas y derivados de las mismas, tales como 294 de *E. coli* (ATCC 31.446), B de *E. coli*, λ 1776 de *E. coli* (ATCC 31.537) y RV308 de *E. coli* (ATCC 31.608). Estos ejemplos son ilustrativos en vez de limitantes. Se conocen en la técnica métodos para construir derivados de cualquiera de las bacterias anteriormente mencionadas que tienen genotipos definidos y se describen en, por ejemplo, Bass y col., Proteins, 8:309-314 (1990). Es generalmente necesario seleccionar bacterias apropiadas teniendo en cuenta la replicabilidad del replicón en las células de una bacteria. Por ejemplo, pueden usarse adecuadamente especies de *E. coli*, *Serratia*, o *Salmonella* como huésped cuando se usan plásmidos muy conocidos tales como pBR322, pBR325, pACYC177 o pKN410 para suministrar el replicón. Normalmente, la célula huésped debería secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas, e inhibidores de proteasas adicionales pueden incorporarse deseablemente en el cultivo celular.

ii. Producción de anticuerpos

Se transforman células huésped con los vectores de expresión anteriormente descritos y se cultivan en medios nutritivos convencionales modificados según convenga para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar genes que codifican las secuencias deseadas.

Una transformación significa introducir ADN en el huésped procariota de manera que el ADN sea replicable, tanto como un elemento extracromosómico como por integrante cromosómico. Dependiendo de la célula huésped usada, la transformación se hace usando técnicas convencionales apropiadas para tales células. El tratamiento con calcio empleando cloruro de calcio es generalmente usado para células bacterianas que contienen barreras sustanciales

de las paredes celulares. Otro método para la transformación emplea polietilenglicol/DMSO. Todavía otra técnica usada es la electroporación.

Las células procariotas usadas para producir los polipéptidos de la invención se cultivan en medios conocidos en la técnica y adecuados para el cultivo de las células huésped seleccionadas. Ejemplos de medios adecuados incluyen caldo Luria (LB) más complementos nutritivos necesarios. En algunas realizaciones, los medios también contiene un agente de selección elegido basándose en la construcción del vector de expresión, para permitir selectivamente el crecimiento de células procariotas que contienen el vector de expresión. Por ejemplo, se añade ampicilina al medio para el crecimiento de células que expresan gen de resistencia a ampicilina.

También puede incluirse cualquier complemento necesario, además de fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato inorgánico, en concentraciones apropiadas introducido solo o como una mezcla con otro complemento o medio tal como una fuente de nitrógeno compleja. Opcionalmente, el medio de cultivo puede contener uno o más agentes reductores seleccionados del grupo que consiste en glutatión, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditioueritrol y ditiotreitrol.

Las células huésped procariotas se cultivan a temperatura adecuadas. Para el crecimiento de *E. coli*, por ejemplo, la temperatura preferida oscila de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 39 °C, más preferentemente de aproximadamente 25 °C a aproximadamente 37 °C, incluso más preferentemente a aproximadamente 30 °C. El pH del medio puede ser cualquier pH que oscile de aproximadamente 5 a aproximadamente 9, dependiendo principalmente del organismo huésped. Para *E. coli*, el pH es preferentemente de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,4, y más preferentemente de aproximadamente 7,0.

Si se usa un promotor inducible en el vector de expresión de la invención, la expresión de proteínas se induce en condiciones adecuadas para la activación del promotor. En un aspecto de la invención, los promotores PhoA se usan para controlar la transcripción de los polipéptidos. Por consiguiente, las células huésped transformadas se cultivan en un medio limitante con fosfato para la inducción. Preferentemente, el medio limitante de fosfato es el medio C.R.A.P. (véase, por ejemplo, Simmons y col., J. Immunol. Methods (2002), 263:133-147). Puede usarse una variedad de otros inductores según la construcción de vectores empleada, como se conoce en la técnica.

En una realización, los polipéptidos expresados de la presente invención son secretados en y recuperados del periplasma de las células huésped. La recuperación de proteínas normalmente implica romper el microorganismo, generalmente por medios tales como choque osmótico, sonicación o lisis. Una vez se han roto las células, el residuo de células o las células completas pueden eliminarse por centrifugación o filtración. Las proteínas pueden purificarse adicionalmente, por ejemplo, por cromatografía en resina de afinidad. Alternativamente, las proteínas pueden transportarse en los medios de cultivo y aislarse en su interior. Las células pueden eliminarse del cultivo y el sobrenadante de cultivo filtrarse y concentrarse para más purificación de las proteínas producidas. Los polipéptidos expresados pueden aislarse adicionalmente e identificarse usando métodos comúnmente conocidos tales como electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y ensayo de transferencia Western.

En un aspecto de la invención, la producción de anticuerpos se realiza en gran cantidad por un proceso de fermentación. Diversos procesos de fermentación de lotes alimentados a gran escala están disponibles para la producción de proteínas recombinantes. Las fermentaciones a gran escala tienen al menos 1000 litros de capacidad, preferentemente aproximadamente 1.000 a 100.000 litros de capacidad. Estos fermentadores usan hélices agitadoras para distribuir el oxígeno y nutrientes, especialmente glucosa (la fuente de carbono/energía preferida). Fermentación a pequeña escala se refiere generalmente a la fermentación en fermentador que no tiene más de aproximadamente 100 litros en capacidad volumétrica y puede oscilar de aproximadamente 1 litro a aproximadamente 100 litros.

En un proceso de fermentación, la inducción de expresión de proteínas es normalmente iniciada después de que las células se hayan cultivado bajo condiciones adecuadas a una densidad deseada, por ejemplo, una DO₅₅₀ de aproximadamente 180-220, en cuyo estadio las células están en la fase estacionaria temprana. Puede usarse una variedad de inductores, según la construcción de vector empleada, como se conoce en la técnica y se describe anteriormente. Las células pueden cultivarse durante periodos más cortos antes de la inducción. Las células se inducen normalmente durante aproximadamente 12-50 horas, aunque puede usarse un tiempo de inducción más largo o más corto.

Para mejorar el rendimiento de producción y la calidad de los polipéptidos de la invención pueden modificarse diversas condiciones de fermentación. Por ejemplo, para mejorar el ensamblaje y plegamiento apropiado de los polipéptidos de anticuerpo secretados, vectores adicionales que expresan en exceso proteínas de chaperona tales como proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD y/o DsbG) o FkpA (una peptidilprolil cis,trans-isomerasa con actividad de chaperona) pueden usarse para co-transformar las células procariotas huésped. Se ha demostrado que las proteínas de chaperona facilitan el plegamiento apropiado y la solubilidad de proteínas heterólogas producidas en células huésped bacterianas. Chen y col. (1999) J Biol. Chem 274:19601-19605; Georgiou y col., patente de EE. UU. n.º 6.083.715; Georgiou y col., patente de EE. UU. n.º 6.027.888; Bothmann y Plückthun (2000) J. Biol. Chem

275:17100-17105; Ramm y Plückerthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113; Arie y col. (2001) Mol. Microbiol. 39:199-210.

5 Para minimizar la proteólisis de proteínas heterólogas expresadas (especialmente aquellas que son proteolíticamente sensibles), ciertas cepas huésped deficientes para enzimas proteolíticas pueden usarse para la presente invención. Por ejemplo, las cepas de células huésped pueden modificarse para efectuar mutación (mutaciones) genética(s) en los genes que codifican proteasas bacterianas conocidas tales como proteasa III, OmpT, DegP, Tsp, proteasa I, proteasa Mi, proteasa V, proteasa VI y combinaciones de las mismas. Algunas cepas deficientes para proteasas de *E. coli* están disponibles y se describen en, por ejemplo, Joly y col. (1998), arriba; 10 Georgiou y col., patente de EE. UU. n.º 5.264.365; Georgiou y col., patente de EE. UU. n.º 5.508.192; Hara y col., Microbial Drug Resistance, 2:63-72 (1996).

En una realización, las cepas de *E. coli* deficientes para enzimas proteolíticas y transformadas con plásmidos que expresan en exceso una o más proteínas de chaperona se usan como células huésped en el sistema de expresión de la invención. 15

iii. Purificación de anticuerpos

Pueden emplearse los métodos de purificación de proteínas convencionales conocidos en la técnica. Los siguientes procedimientos son a modo de ejemplo de procedimientos de purificación adecuados: fraccionamiento sobre columnas de inmunoafinidad o intercambio de iones, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía sobre sílice o sobre una resina de intercambio catiónico tal como DEAE, cromatografía de SDS-PAGE, precipitación con sulfato de amonio y filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75. 20

En un aspecto, se usa proteína A inmovilizada sobre una fase sólida para la purificación por inmunoafinidad de los productos de anticuerpo de longitud completa de la invención. La proteína A es una proteína de la pared celular de 41 kD de *Staphylococcus aureus* que se une con alta afinidad a la región Fc de anticuerpos. Lindmark y col. (1983) J. Immunol. Meth. 62:1-13. La fase sólida a la que la proteína A se inmoviliza es preferentemente una columna que comprende una superficie de vidrio o sílice, más preferentemente una columna de vidrio de poro controlado o una columna de ácido silícico. En algunas aplicaciones, la columna se ha recubierto con un reactivo, tal como glicerol, en un intento para prevenir la adherencia no específica de contaminantes. 25 30

Como primera etapa de purificación, la preparación derivada del cultivo celular como se ha descrito anteriormente se aplica sobre la proteína A inmovilizada sobre la fase sólida para permitir la unión específica del anticuerpo de interés a la proteína A. Entonces, la fase sólida se lava para eliminar contaminantes no específicamente unidos a la fase sólida. Finalmente, el anticuerpo de interés se recupera de la fase sólida por elución. 35

b. Generación de anticuerpos usando células huésped eucariotas:

Los componentes del vector generalmente incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción. 40

(i) Componente de secuencia señal

Un vector para su uso en una célula huésped eucariota también puede contener una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína madura o polipéptido de interés. La secuencia señal heteróloga seleccionada es preferentemente una que es reconocida y procesada (es decir, escindida por una peptidasa señal) por la célula huésped. En la expresión de células de mamífero están disponibles secuencias señal de mamífero, además de conductores secretorios víricos, por ejemplo, la señal gD del herpes simple. 45 50

El ADN para una región precursora tal está ligado en el marco de lectura al ADN que codifica el anticuerpo.

(ii) Origen de replicación

Generalmente, un componente de origen de replicación no es necesario para vectores de expresión de mamífero. Por ejemplo, el origen de SV40 puede usarse normalmente sólo debido a que contiene el promotor temprano. 55

(iii) Componente de gen de selección

Los vectores de expresión y de clonación pueden contener un gen de selección, también llamado un marcador de selección. Genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metrotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, cuando sean relevantes, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles de medios complejos. 60 65

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula huésped. Aquellas células que son satisfactoriamente transformadas con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a fármaco y, por tanto, sobrevive a la pauta de selección. Ejemplos de tal selección dominante usan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de marcadores de selección adecuados para células de mamífero son aquellos que permiten la identificación de células competentes para la captación del ácido nucleico de anticuerpo, tal como DHFR, timidina cinasa, metalotioneína-I y -II, preferentemente genes de metalotioneína de primate, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

Por ejemplo, las células transformadas con el gen de selección de DHFR son primero identificadas cultivando todos los transformantes en un medio de cultivo que contiene metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. Una célula huésped apropiada cuando se emplea DHFR natural es la línea de células de ovario de hámster chino (CHO) deficiente en actividad de DHFR (por ejemplo, ATCC CRL-9096).

Alternativamente, células huésped (particularmente huéspedes naturales que contienen DHFR endógeno) transformadas o co-transformadas con secuencias de ADN que codifican un anticuerpo, proteína de DHFR natural y otro marcador de selección tal como aminoglucósido 3'-fosfotransferasa (APH) pueden seleccionarse por crecimiento celular en medio que contiene un agente de selección para el marcador de selección tal como un antibiótico aminoglucosídico, por ejemplo, kanamicina, neomicina o G418. Véase la patente de EE. UU. n.º 4.965.199.

(iv) Componente de promotor

Los vectores de expresión y de clonación normalmente contienen un promotor que es reconocido por el organismo huésped y está operativamente ligado al ácido nucleico del polipéptido de anticuerpo. Se conocen secuencias promotoras para eucariotas. Prácticamente todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente 25 a 30 bases en la dirección 5' del sitio en el que se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada 70 a 80 bases en la dirección 5' desde el inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT en la que N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucariotas está una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias están adecuadamente insertadas en vectores de expresión eucariotas.

La transcripción de polipéptidos de anticuerpo de vectores en células huésped de mamífero está controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como virus del poliovirus, virus de la viruela aviar, 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, de promotores de choque térmico, siempre que tales promotores sean compatibles con los sistemas de células huésped.

Los promotores tempranos y tardíos del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación vírica de SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción de HindIII E. Un sistema para expresar ADN en huéspedes de mamífero usando el virus del papiloma bovino como vector se desvela en la patente de EE. UU. n.º 4.419.446. Una modificación de este sistema se describe en la patente de EE. UU. n.º 4.601.978. Alternativamente, como promotor puede usarse la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous.

(v) Componente de elemento potenciador

La transcripción de ADN que codifica el polipéptido de anticuerpo de esta invención por eucariotas superiores aumenta frecuentemente insertando una secuencia potenciadora en el vector. Muchas secuencias potenciadoras se conocen ahora de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Normalmente, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de células eucariotas. Ejemplos incluyen el potenciador del SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano del citomegalovirus, el potenciador del poliovirus en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, Nature 297:17-18 (1982) sobre elementos potenciadores para la activación de promotores eucariotas. El potenciador puede cortarse y empalmarse en el vector en una posición 5' o 3' con respecto a la secuencia codificante de polipéptidos del anticuerpo, pero está preferentemente localizado en un sitio 5' desde el promotor.

(vi) Componente de terminación de la transcripción

Los vectores de expresión usados en células huésped eucariotas normalmente también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Tales secuencias están comúnmente

disponibles de las regiones sin traducir de 5' y, ocasionalmente 3', de ADN eucariotas o víricos o ADNc. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción sin traducir del ARNm que codifica un anticuerpo. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Véase el documento WO94/11026 y el vector de expresión desvelado en su interior.

(vii) *Selección y transformación de células huésped*

Células huésped adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores en el presente documento incluyen células eucariotas superiores descritas en el presente documento, que incluyen células huésped de vertebrado. La propagación de células de vertebrado en cultivo (cultivo de tejido) se ha vuelto un procedimiento rutinario. Ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son la línea de riñón de mono CV1 transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham y col., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello de útero 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).

Se transforman células huésped con los vectores de expresión o de clonación anteriormente descritos para la producción de anticuerpos y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según convenga para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

(viii) *Cultivo de células huésped*

Las células huésped usadas para producir un anticuerpo de la presente invención pueden cultivarse en una variedad de medios. Medios comercialmente disponibles tales como Ham F10 (Sigma), medio mínimo esencial ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y medio Eagle modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar las células huésped. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham y col., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes y col., Anal. Biochem, 102:255 (1980), las patentes de EE. UU. n.º 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; documentos WO 90/03430; WO87/00195; o la patente de EE. UU. Re. 30.985 puede usarse como medio de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios puede complementarse según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco 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.

(ix) *Purificación de anticuerpo*

Si se usan técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse intracelularmente, 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, se eliminan, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Si el anticuerpo es secretado en el medio, los sobrenadantes de tales sistemas de expresión generalmente 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. Meth. 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. 5:15671575 (1986)). La matriz a la que está unida el ligando de afinidad es lo más frecuente agarosa, pero están disponibles otras matrices. Matrices mecánicamente estables tales como vidrio de poro controlado o poli(estirenodivinil)benceno permiten velocidades de flujo más rápidas y tiempos de procesamiento más cortos que los que pueden lograrse con agarosa. Si el anticuerpo comprende un dominio CH3, 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, SDS-PAGE 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).

Inmunconjugados

La invención también proporciona inmunconjugados (llamados indistintamente "conjugados de anticuerpo-fármaco" o "ADC") que comprenden cualquiera de los anticuerpos anti-hepsina descritos en el presente documento conjugados con uno agente citotóxico, tales 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).

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. n.º 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 métodos 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.º 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.

Agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de inmunconjugados se describen en el presente documento (por ejemplo, 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. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993. Está disponible una variedad de radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Ejemplos incluyen ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y y ¹⁸⁶Re. Se preparan conjugados del anticuerpo y agente citotóxico usando una variedad de agentes de acoplamiento a proteínas bifuncionales tales como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehidos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina puede prepararse como se describe en Vitetta y col., Science, 238:1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentriaminapentaacético (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, dolastatinas, auristatinas, un tricoteceno y CC1065, y los derivados de estas toxinas que tienen actividad de toxina, también se contemplan en el presente documento.

i. Maitansina y maitansinoides

En algunas realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo (longitud completa o fragmentos) de la invención conjugado 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.º 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.º 4.151.042). El maitansinol sintético y los derivados y análogos del mismo se desvelan, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.º 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.

Los restos de fármacos maitansinoides son restos de fármaco en conjugados de anticuerpo-fármaco debido a que son: (i) relativamente accesibles para preparar por fermentación o modificación química, derivatización de productos de fermentación, (ii) favorecen la derivatización con grupos funcionales adecuados para la conjugación mediante ligadores de no disulfuro con anticuerpos, (iii) estables en plasma, y (iv) eficaces contra una variedad de líneas celulares tumorales.

Los inmunoconjugados que contienen maitansinoides, métodos de preparación de los mismos y su uso terapéutico se desvelan, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.º 5.208.020, 5.416.064 y la patente europea EP 0 425 235 B1. 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.

Se preparan conjugados de anticuerpo-maitansinoide ligando químicamente un anticuerpo con una molécula de maitansinoide sin disminuir significativamente la actividad biológica de tanto el anticuerpo como la molécula de maitansinoide. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.208.020. 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.º 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 las patentes de EE. UU. n.º 5.208.020 o la patente EP 0 425 235 B1, Chari y col., *Cancer Research* 52:127-131 (1992), y la solicitud de patente de EE.UU. n.º 10/960.602, presentada el 8 de octubre de 2004. Los conjugados de anticuerpo-maitansinoide que comprenden el componente de conector SMCC pueden prepararse como se desvela en la solicitud de patente de EE. UU. n.º 10/960.602, presentada el 8 de octubre de 2004. 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. Grupos de enlace adicionales se describen y ejemplifican en el presente documento.
- Los conjugados del anticuerpo y el maitansinoide pueden prepararse usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activo (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Agentes de acoplamiento particularmente preferidos incluyen 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP) (Carlsson y col., *Biochem. J.* 173:723-737 (1978)) y 4-(2-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.

ii. Auristatinas y dolastatinas

- En algunas realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo de la invención conjugado con dolastatinas o análogos y derivados peptídicos de dolastatina, las auristatinas (patentes de EE. UU. n.º 5.635.483 y 5.780.588). Se ha mostrado que las dolastatinas y auristatinas interfieren con la dinámica de microtúbulos, hidrólisis de GTP y división nuclear y celular (Woyke y col. (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12):3580-3584) y tienen actividad anticancerígena (patente de EE. UU. n.º 5.663.149) y antifúngica (Pettit y col. (1998) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 42:2961-2965). El resto del fármaco dolastatina o auristatina puede unirse al anticuerpo mediante el extremo N (amino) o el extremo C (carboxilo) del resto de fármaco peptídico (documento WO 02/088172).

- Realizaciones de auristatina a modo de ejemplo incluyen el extremo N ligado a restos del fármaco monometilauristatina DE y DF, desvelado en "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", n.º de serie de EE. UU. 10/983.340, presentada el 5 de noviembre de 2004.

- Normalmente, los restos de fármaco basados en péptidos pueden prepararse formando un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos de péptido. Tales enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, según el método de síntesis en fase líquida (véase E. Schröder y K. Lübke, "The Peptides", volumen 1, pág. 76-136, 1965, Academic Press) que es muy conocido en el campo de la química de los péptidos. Los restos del fármaco auristatina/dolastatina pueden prepararse según los métodos de: patentes de EE. UU. n.º 5.635.483 y 5.780.588; Pettit y col. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:5463-5465; Pettit y col. (1998) *Anti-Cancer Drug Design* 13:243-277; Pettit, G.R., y col. *Synthesis*, 1996, 719-725; Pettit y col. (1996) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 5:859-863. Véanse también Doronina (2003) *Nat. Biotechnol.* 21(7):778-784; "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", n.º de serie de EE. UU. 10/983.340, presentada el 5 de noviembre de 2004 (que desvela, por ejemplo, conectores y métodos de preparación de compuestos de monometilvalina tales como MMAE y MMAF conjugados con conectores).

iii. Caliqueamicina

- En otras realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo de la invención 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 EE. UU. n.º 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001 y 5.877.296 (todas 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.

iv. Otros agentes citotóxicos

5 Otros agentes antitumorales que pueden conjugarse con los anticuerpos de la invención incluyen BCNU, estreptozaicina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocida conjuntamente el complejo LL-E33288 descrito en las patentes de EE. UU. n.º 5.053.394 y 5.770.710, además de esperamicinas (patente de EE. UU. n.º 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 una variedad de isótopos radiactivos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Ejemplos incluyen At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² e isótopos radiactivos de Lu. Si el conjugado se usa para la detección, puede comprender un átomo radiactivo para estudios escintigráficos, por ejemplo, Tc^{99m} o I¹²³, o una marca de espín para la obtención de imágenes de resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como obtención de imágenes de resonancia magnética, irm), tal como yodo-123 de nuevo, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

30 Las radiomarcas u otras marcas pueden incorporarse en el conjugado de formas conocidas. Por ejemplo, el péptido puede biosintetizarse o puede sintetizarse por síntesis química de aminoácidos usando precursores de aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Marcas tales como Tc^{99m} o I¹²³, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸ e In¹¹¹ pueden unirse por un residuo de cisteína en el péptido. Itrio-90 puede unirse por un residuo de lisina. El método 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 métodos en detalle.

35 Pueden prepararse conjugados de anticuerpo y agente citotóxico usando una variedad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno-2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzenceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina puede prepararse como se describe en Vitetta y col., Science, 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentríaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante a modo de ejemplo para la conjugación de radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO94/11026. El 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. n.º 5.208.020).

50 Los compuestos de la invención 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., EE. UU.). Véanse las páginas 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

55 v. Preparación de conjugados de anticuerpo-fármaco

60 En los conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC) de la invención, 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 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 nucleófilo de un anticuerpo. Métodos adicionales para preparar ADC se describen en el presente documento.

5 El conector puede estar compuesto por uno o más componentes de conector. Componentes de conector a modo de ejemplo incluyen 6-maleimidocaproilo ("MC"), maleimidopropanoilo ("MP"), valina-citrulina ("val-cit"), alanina-fenilalanina ("ala-phe"), p-aminobenciloxycarbonilo ("PAB"), 4-(2-piridiltio)pentanoato de N-succinimidilo ("SPP"), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de N-succinimidilo ("SMCC") y (4-yodo-acetil)aminobenzoato de N-succinimidilo ("SIAB"). Componentes de conector adicionales se conocen en la técnica y algunos se describen en el presente documento. Véase también "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands", n.º de serie de EE. UU. 10/983.340, presentada el 5 de noviembre de 2004.

10 En algunas realizaciones, el conector puede comprender residuos de aminoácidos. Componentes de conector de aminoácidos a modo de ejemplo incluyen un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido o un pentapéptido. Dipéptidos a modo de ejemplo incluyen: valina-citrulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe). Tripéptidos a modo de ejemplo incluyen: glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Residuos de aminoácidos que comprenden un componente de conector de aminoácidos incluyen aquellos que se producen naturalmente, además de aminoácidos menores y análogos de aminoácidos que se producen no naturalmente, tales como citrulina. Los componentes de conector de aminoácidos pueden diseñarse y optimizarse en su selectividad para escisión enzimática por una enzima particular, por ejemplo, una proteasa asociada a tumor, catepsina B, C y D, o una proteasa de plasmina.

15 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 glicosilado. 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. Pueden introducirse grupos tiol reactivos en el anticuerpo introduciendo uno, dos, tres, cuatro o más residuos de cisteína (por ejemplo, preparando anticuerpos mutantes que comprenden uno o más residuos de aminoácidos de cisteína no nativos).

20 También pueden producirse conjugados de anticuerpo-fármaco de la invención 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 glicosilados 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 glicosilado con tanto galactosa oxidada como meta-peryodato de sodio pueden 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; patente de EE. UU. n.º 5.362.852). Tal aldehído puede hacerse reaccionar con un resto de fármaco o nucleófilo conector.

25 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.

30 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.

35 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 individuo, 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).

Métodos que usan anticuerpos anti-hepsina

5 La presente invención caracteriza el uso de un anticuerpo para hepsina como parte de una pauta de tratamiento específica prevista para proporcionar un efecto beneficioso de la actividad de este agente terapéutico. La presente invención es particularmente útil en el tratamiento de cánceres de diversos tipos en diversos estadios.

10 El término cáncer engloba un conjunto de trastornos proliferativos, que incluyen, pero no se limitan a, crecimientos pre-cancerosos, tumores benignos y tumores malignos. Los tumores benignos permanecen localizados en el sitio de origen y no tienen la capacidad para infiltrar, invadir o metastatizar a sitios distantes. Los tumores malignos invadirán y dañarán otros tejidos alrededor de ellos. También pueden adquirir la capacidad de desprenderse del sitio original y diseminarse a otras partes del cuerpo (metastatizar), normalmente mediante la circulación sanguínea o mediante el sistema linfático en el que están localizados los ganglios linfáticos. Los tumores primarios se clasifican por el tipo de tejido a partir del cual se producen; los tumores metastásicos se clasifican por el tipo de tejido del que se derivan las células cancerosas. Con el tiempo, las células de un tumor maligno se vuelven más anormales y parecen menos similares a células normales. Este cambio en el aspecto de las células cancerosas se llama el grado del tumor, y se describen células cancerosas que están bien diferenciadas (grado bajo), moderadamente diferenciadas, escasamente diferenciadas o sin diferenciar (grado alto). Las células bien diferenciadas son de aspecto bastante normal y se parecen a las células normales a partir de las cuales se originaron. Las células no diferenciadas son células que se han convertido en tan anormales que ya no es posible determinar el origen de las células.

20 Los sistemas de estadificación del cáncer describen cómo de lejos se ha diseminado anatómicamente el cáncer e intentan poner a pacientes con pronóstico y tratamiento similar en el mismo grupo de estadificación. Pueden realizarse varias pruebas para ayudar a estadificar el cáncer que incluyen biopsia y ciertas pruebas de obtención de imágenes tales como una radiografía del tórax, nomograma, gammagrafía ósea, TAC e IRM. También se usan análisis de sangre y una evaluación clínica para evaluar la salud general de un paciente y detectar si el cáncer se ha diseminado a ciertos órganos.

30 Para estadificar el cáncer, el Comité Conjunto Americano del Cáncer clasifica primero el cáncer, particularmente los tumores sólidos, en una categoría de letra usando el sistema de clasificación de TNM. Los cánceres se designan la letra T (tamaño del tumor), N (nodos palpables) y/o M (metástasis). T1, T2, T3 y T4 describen el tamaño creciente de la lesión primaria; N0, N1, N2, N3 indica la participación del nodo que avanza progresivamente; y M0 y M1 reflejan la ausencia o presencia de metástasis distantes.

35 En el segundo método de estadificación, también conocido como la Agrupación global de estadios o Estadificación de números romanos, los cánceres se dividen en los estadios 0 a IV, que incorporan el tamaño de lesiones primarias, además de la presencia de diseminación nodal y de metástasis distantes. En este sistema, los casos se agrupan en cuatro estadios indicados por los números romanos I a IV, o se clasifican como "recurrentes". Para algunos cánceres, el estadio 0 se denomina "in situ" o "Tis," tal como carcinoma ductal *in situ* o carcinoma lobular *in situ* para cánceres de mama. Los adenomas de alto grado también pueden clasificarse como estadio 0. En general, los cánceres de estadio I son cánceres localizados pequeños que son normalmente curables, mientras que el estadio IV normalmente representa cáncer inoperable o metastásico. Los cánceres de estadio II y III están normalmente localmente avanzados y/o presentan participación de los ganglios linfáticos locales. En general, los números de mayor estadio indican enfermedad más extensa, que incluye mayor tamaño del tumor y/o diseminación del cáncer a ganglios linfáticos próximos y/u órganos adyacentes al tumor primario. Estos estadios se definen con precisión, pero la definición es diferente para cada tipo de cáncer y es conocida para el experto.

50 Muchos registros del cáncer, tales como el Programa de Supervisión, Epidemiología y Resultados Finales del NCI (SEER), usan estadificación resumen. Este sistema se usa para todos los tipos de cáncer. Agrupa casos de cáncer en cinco categorías principales:

In situ es cáncer temprano que está presente solo en la capa de células en la que empezó.

Localizado es cáncer que está limitado al órgano en el que empezó, sin evidencia de diseminación.

55 *Regional* es cáncer que se ha diseminado más allá del sitio original (primario) a ganglios linfáticos próximos u órganos y tejidos.

Distante es cáncer que se ha diseminado del sitio primario a órganos distantes o ganglios linfáticos distantes.

Desconocido se usa para describir casos para los que no hay información suficiente para indicar un estadio.

60 Además, es común que el cáncer reaparezca meses o años después de eliminarse el tumor primario. El cáncer que reaparece después de erradicar cualquier tumor visible se llama enfermedad recurrente. La enfermedad que reaparece en el área del tumor primario es localmente recurrente, y la enfermedad que reaparece como metástasis se denomina una reaparición distante.

65 El tumor puede ser un tumor sólido o un tumor no sólido o de tejido blando. Ejemplos de tumores de tejido blando incluyen leucemia (por ejemplo, leucemia mielógena crónica, leucemia mielógena aguda, leucemia linfoblástica

aguda en adultos, leucemia mielógena aguda, leucemia linfoblástica aguda de linfocitos B maduros, leucemia linfocítica crónica, leucemia polilinfocítica, o leucemia de células pilosas) o linfoma (por ejemplo, linfoma no Hodgkin, linfoma cutáneo de linfocitos T, o enfermedad de Hodgkin). Un tumor sólido incluye cualquier cáncer de tejidos del cuerpo distintos de sangre, médula ósea, o el sistema linfático. Los tumores sólidos pueden dividirse adicionalmente en aquellos de origen de célula epitelial y aquellos de origen de célula no epitelial. Ejemplos de tumores sólidos de célula epitelial incluyen tumores del tubo gastrointestinal, colon, mama, próstata, pulmón, riñón, hígado, páncreas, ovario, cabeza y cuello, cavidad bucal, estómago, duodeno, intestino delgado, intestino grueso, ano, vesícula biliar, labio, nasofaringe, piel, útero, órgano genital masculino, órganos urinarios, vejiga y piel. Los tumores sólidos de origen no epitelial incluyen sarcomas, tumores cerebrales y tumores de hueso. Otros ejemplos de tumores se describen en la sección de Definiciones.

En algunas realizaciones, el paciente en el presente documento se somete a una prueba de diagnóstico, por ejemplo, antes y/o durante y/o después de la terapia. Generalmente, si se realiza una prueba de diagnóstico, puede obtenerse una muestra de un paciente en necesidad de terapia. Si el sujeto tiene cáncer, la muestra puede ser una muestra tumoral, u otra muestra biológica, tal como un fluido biológico, que incluye, sin limitación, sangre, orina, saliva, líquido ascítico, o derivados tales como suero sanguíneo y plasma sanguíneo, y similares.

La muestra biológica en el presente documento puede ser una muestra fijada, por ejemplo, una muestra fijada en formalina, muestra incorporada en parafina (FFPE) o una muestra congelada.

Diversos métodos para determinar la expresión de ARNm o proteína incluyen, pero no se limitan a, pauta de expresión génica, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que incluye PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR), análisis de micromatrices, análisis de expresión génica en serie (SAGE), MassARRAY, análisis de expresión génica por secuenciación de distintivos masivamente paralela (MPSS), proteómica, inmunohistoquímica (IHC), etc. Preferentemente, se cuantifica ARNm. Tal análisis de ARNm se realiza preferentemente usando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), o por análisis de micromatrices. Si se emplea PCR, una forma preferida de PCR es PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). En una realización, la expresión de uno o más de los genes anteriormente citados se considera expresión positiva si está en la mediana o por encima, por ejemplo, en comparación con otras muestras del mismo tipo de tumor. La mediana del nivel de expresión puede determinarse esencialmente contemporáneamente con la medición de la expresión génica, o puede haberse determinado previamente.

Las etapas de un protocolo representativo para perfilar la expresión génica usando tejidos fijados incorporados en parafina como fuente de ARN, que incluye aislamiento de ARNm, purificación, extensión con cebadores y amplificación, se facilitan en diversos artículos de revistas publicados (por ejemplo: Godfrey y col. J. Molec. Diagnostics 2: 84-91 (2000); Specht y col., Am. J. Pathol. 158: 419-29 (2001)). Brevemente, un proceso representativo empieza cortando secciones de aproximadamente 10 microgramos de espesor de muestras de tejido de tumor incorporadas en parafina. Entonces, el ARN se extrae, y se extraen proteína y ADN. Después del análisis de la concentración de ARN, pueden incluirse etapas de reparación y/o de amplificación de ARN, si fuera necesario, y el ARN se transcribe de forma inversa usando promotores específicos de genes, seguido de PCR. Finalmente, se analizan los datos para identificar la(s) mejor(es) opción (opciones) de tratamiento disponible(s) para el paciente basándose en el patrón característico de la expresión génica identificado en la muestra tumoral examinada.

La detección de la expresión del gen o proteínas puede determinarse directa o indirectamente.

Puede determinarse la expresión o amplificación de hepsina en el cáncer (directa o indirectamente). Están disponibles diversos ensayos de diagnóstico/pronóstico para esto. En una realización, la expresión en exceso de hepsina puede analizarse por IHC. Secciones de tejido incorporadas en parafina de una biopsia de tumor pueden someterse al ensayo de IHC y asignárseles un criterio de intensidad de la tinción de proteína hepsina del siguiente modo:

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

Puntuación 1+ se detecta una tinción de la membrana débil/apenas perceptible en más del 10 % de las células tumorales. Las células solo se tiñen en parte de su membrana.

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

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

En algunas realizaciones, aquellos tumores con puntuaciones 0 o 1+ para la evaluación de la expresión en exceso de hepsina pueden caracterizarse como que no expresan en exceso hepsina, mientras que aquellos tumores con puntuaciones 2+ o 3+ pueden caracterizarse como que expresan hepsina en exceso.

Alternativamente, o adicionalmente, pueden llevarse a cabo ensayos de FISH sobre tejido tumoral fijado con formalina incorporado en parafina para determinar la presencia o y/o el grado (si lo hay) de amplificación de hepsina o translocalización en el tumor.

5 La activación de hepsina puede determinarse directamente (por ejemplo, por prueba de fosfo-ELISA, u otros medios de detección de receptor fosforilado) o indirectamente (por ejemplo, por detección de componentes de la ruta de señalización aguas abajo activados, detección de dímeros receptores (por ejemplo, homodímeros, heterodímeros), detección de perfiles de expresión génica y similares.

10 Los métodos para la detección de mutaciones de ácido nucleico son muy conocidos en la técnica. Frecuentemente, aunque no necesariamente, un ácido nucleico diana en una muestra se amplifica para proporcionar la cantidad deseada de material para la determinación de si está presente una mutación. Las técnicas de amplificación son muy conocidas en la técnica. Por ejemplo, el producto amplificado puede o puede no englobar toda la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína de interés, mientras que el producto amplificado comprende la posición particular de la secuencia de aminoácidos/ácidos nucleicos en la que se sospecha que está la mutación.

15 Puede obtenerse una muestra que comprende un ácido nucleico diana por métodos muy conocidos en la técnica, y que son apropiados para el tipo particular y la localización del tumor. Se usa biopsia de tejido frecuentemente para obtener un trozo representativo del tejido tumoral. Alternativamente, pueden obtenerse células tumorales indirectamente en forma de tejidos/fluidos que son conocidos o que se sabe que contienen las células tumorales de interés. Por ejemplo, pueden obtenerse muestras de lesiones de cáncer de pulmón por resección, broncoscopia, aspiración con aguja fina, cepillados bronquiales, o de esputo, líquido pleural o sangre. Pueden detectarse genes mutantes o productos génicos de tumor o de otras muestras del cuerpo tales como orina, esputo o suero. Las mismas técnicas tratadas anteriormente para la detección de genes diana mutantes o productos génicos en muestras tumorales pueden aplicarse a otras muestras del cuerpo. Se exfolian células cancerosas de tumores y aparecen en tales muestras del cuerpo. Cribando tales muestras del cuerpo, puede lograrse un simple diagnóstico temprano para enfermedades tales como el cáncer. Además, el progreso de la terapia puede monitorizarse más fácilmente probando tales muestras del cuerpo para genes diana mutantes o productos génicos.

20 Se conocen en la técnica medios para enriquecer una preparación de tejido en células tumorales. Por ejemplo, el tejido puede aislarse de parafina o secciones de criostato. También pueden separarse células cancerosas de células normales por citometría de flujo o microdissección por captura láser. Éstas, además de otras técnicas para separar células tumorales de normales, son muy conocidas en la técnica. Si el tejido tumoral está altamente contaminado con células normales, la detección de mutaciones puede ser más difícil, aunque se conocen técnicas para minimizar la contaminación y/o resultados positivos/negativos falsos, algunos de los cuales se describen en el presente documento más adelante. Por ejemplo, también puede evaluarse una muestra para la presencia de un biomarcador (incluyendo una mutación) conocido por asociarse a una célula tumoral de interés, pero no a célula normal correspondiente, o viceversa.

30 En algunos casos, el cáncer expresa en exceso o no expresa en exceso hepsina. La expresión en exceso de hepsina puede determinarse en un ensayo de diagnóstico o pronóstico evaluando elevados niveles de hepsina presentes sobre una célula (por ejemplo, mediante un ensayo de inmunohistoquímica; IHC). Alternativamente, o adicionalmente, pueden medirse niveles de ácido nucleico que codifican hepsina en la célula, por ejemplo, mediante hibridación fluorescente *in situ* (FISH; véase el documento WO98/45479 publicado en octubre de 1998), transferencia Southern, o técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), tales como PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR). Además de los ensayos anteriores, están disponibles diversos ensayos *in vivo* para el médico habitual. Por ejemplo, pueden exponerse células de dentro del cuerpo del paciente a un anticuerpo que está opcionalmente marcado con una marca detectable, por ejemplo, un isótopo radiactivo, y puede evaluarse la unión del anticuerpo a células en el paciente, por ejemplo, por barrido externo para radiactividad o analizando una biopsia tomada de un paciente previamente expuesto al anticuerpo.

Agentes quimioterapéuticos

55 La terapia de combinación de la invención puede comprender además uno o más agentes quimioterapéuticos. La administración combinada incluye coadministración o administración simultánea, 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.

60 El agente quimioterapéutico, si se administra, se administra normalmente a dosificaciones conocidas para el mismo, u opcionalmente reducidas debido a la acción combinada de los fármacos o efectos secundarios negativos atribuibles a la administración del agente quimioterapéutico anti-metabolito. La preparación y programas de dosificación para tales agentes quimioterapéuticos pueden usarse según instrucciones del fabricante o como se determina empíricamente por el médico habitual.

65

Se desvelan diversos agentes quimioterapéuticos que pueden combinarse en el presente documento.

Formulaciones, dosificaciones y administraciones

5 Los agentes terapéuticos usados en la invención se formularán, dosificarán y administrarán en un modo de acuerdo con la buena práctica médica. Factores a considerar en este contexto incluyen el trastorno particular que está tratándose, el sujeto particular que está tratándose, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración del agente, el método de administración, el programa de administración, la interacción fármaco-fármaco de los agentes a combinar, y otros factores conocidos para los médicos.

10 Las formulaciones terapéuticas se preparan usando métodos convencionales conocidos en la técnica mezclando el principio activo que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences (20^a edición), ed. A. Gennaro, 2000, Lippincott, Williams y Wilkins, Philadelphia, PA). Vehículos aceptables incluyen solución salina, o tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico; 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, asparaginas, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o PEG.

20 Opcionalmente, pero preferentemente, la formulación contiene una sal farmacéuticamente aceptable, preferentemente cloruro sódico, y preferentemente a concentraciones aproximadamente fisiológicas. Opcionalmente, las formulaciones de la invención pueden contener un conservante farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el conservante oscila de concentración del 0,1 al 2,0 %, normalmente v/v. Conservantes adecuados incluyen aquellos conocidos en las ciencias farmacéuticas. Alcohol bencílico, fenol, m-cresol, metilparabeno y propilparabeno son conservantes preferidos. Opcionalmente, las formulaciones de la invención pueden incluir un tensioactivo farmacéuticamente aceptable a una concentración del 0,005 al 0,02 %.

25 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 aquellos con actividades complementarias que no se afectan adversamente entre sí. Tales moléculas están adecuadamente presentes en combinación en cantidades que son eficaces con el fin previsto.

30 Los principios activos también puede atraparse en microcápsula preparada, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsula de gelatina y microcápsula de poli-(metilmetacilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármaco coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences, arriba.

35 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 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. n.º 3.773.919), copolímeros de L-ácido glutámico y γ -etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados siguen en el cuerpo durante un largo tiempo, pueden desnaturalizarse o agregarse como resultado de la exposición a humedad a 37 °C, produciendo una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Pueden idearse estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación del enlace S-S intermolecular mediante intercambio de tio-disulfuro, puede lograrse la estabilización modificando residuos sulfhidrilo, liofilizando a partir de disoluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matriz de polímero específicas.

40 Los agentes terapéuticos de la invención se administran a un paciente humano, según métodos conocidos, tales como administración intravenosa como un bolo o por infusión continua durante un periodo de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intrarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, o por inhalaciones. También puede usarse una estrategia *ex vivo* para aplicaciones terapéuticas. Las estrategias *ex vivo* implican transfectar o transducir células obtenidas del sujeto con un polinucleótido que codifica un antagonista de hepsina. Las células transfectadas o transducidas se devuelven luego al sujeto. Las células pueden ser cualquiera de una amplia variedad de tipos que incluyen, sin limitación, células hematopoyéticas (por ejemplo, células de la

médula ósea, macrófagos, monocitos, células dendríticas, linfocitos T o linfocitos B), fibroblastos, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos o células de músculo.

Por ejemplo, si el antagonista de hepsina es un anticuerpo, el anticuerpo se administra por cualquier medio adecuado, que incluye parenteral, subcutánea, intraperitoneal, intrapulmonar e intranasal, y, si se desea para tratamiento inmunosupresor local, administración intralesional. Infusiones parenterales incluyen administración intramuscular, intravenosa, intrarterial, intraperitoneal o subcutánea. Además, el anticuerpo se administra adecuadamente por infusión por pulsos, particularmente con dosis decrecientes del anticuerpo. Preferentemente, la dosificación se administra mediante inyecciones, lo más preferentemente inyecciones intravenosas o subcutáneas, dependiendo en parte de si la administración es corta o crónica.

En otro ejemplo, el compuesto antagonista de hepsina se administra localmente, por ejemplo, por inyecciones directas, cuando el trastorno o localización del tumor lo permite, y las inyecciones pueden repetirse periódicamente. El antagonista de hepsina también puede administrarse sistémicamente al sujeto o directamente a las células tumorales, por ejemplo, a un tumor o un lecho de tumor tras la escisión quirúrgica del tumor, con el fin de prevenir o reducir la reaparición local o metástasis.

La administración de los agentes terapéuticos en combinación normalmente se lleva a cabo durante un periodo de tiempo definido (normalmente minutos, horas, días o semanas que dependen de la combinación seleccionada). La terapia de combinación pretende englobar la administración de estos agentes terapéuticos de una manera secuencial, es decir, en la que cada agente terapéutico se administra en un momento diferente, además de la administración de estos agentes terapéuticos, o al menos dos de los agentes terapéuticos, de una manera sustancialmente simultánea.

El agente terapéutico puede administrarse por la misma vía o por vías diferentes. Por ejemplo, el anticuerpo anti-hepsina en la combinación puede administrarse mediante inyección intravenosa mientras que un agente quimioterapéutico en la combinación puede administrarse por vía oral. Alternativamente, por ejemplo, ambos agentes terapéuticos pueden administrarse por vía oral, o ambos agentes terapéuticos pueden administrarse mediante inyección intravenosa, dependiendo de los agentes terapéuticos específicos. La secuencia en la que los agentes terapéuticos se administra también varía dependiendo de los agentes específicos.

Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg de cada agente terapéutico es una dosificación candidata inicial para administración al paciente, tanto, por ejemplo, por una o más administraciones separadas, como por infusión continua. Una dosificación diaria típica podría oscilar de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 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 el cáncer se trata, como se mide por los métodos descritos anteriormente. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación.

La presente solicitud contempla la administración del anticuerpo para hepsina por terapia génica. Véase, por ejemplo, el documento WO96/07321 publicado el 14 de marzo de 1996 referente al uso de terapia génica para generar anticuerpos intracelulares.

Artículos de fabricación

En otro aspecto de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico de los trastornos descritos anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta o prospecto sobre o asociado al recipiente. Recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, etc. Los recipientes pueden estar formados de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es por sí misma, o cuando se combina con otra(s) composición (composiciones), eficaz para tratar, prevenir y/o diagnosticar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de disolución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo de la invención. La etiqueta o prospecto indica que la composición se usa para tratar la afección de elección, tal como cáncer. Además, el artículo de fabricación puede comprender (a) un primer recipiente con una composición contenida en su interior, en el que la composición comprende un anticuerpo de la invención; y (b) un segundo recipiente con una composición contenida en su interior, en el que la composición comprende otro agente citotóxico. El artículo de fabricación en esta realización de la invención puede comprender además un prospecto que indica que la primera y segunda composiciones de anticuerpo pueden usarse para tratar una afección particular, por ejemplo, cáncer. Alternativamente, o adicionalmente, el artículo de fabricación puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWHI), solución salina tamponada con fosfato, disolución de Ringer y disolución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, que incluye otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

Lo siguiente son ejemplos de los métodos y composiciones de la invención. Se entiende que pueden ponerse en práctica diversas otras realizaciones, dada la descripción general proporcionada anteriormente.

Ejemplos

5

Materiales y métodos

10 Reactivos y proteínas: Los sustratos de para-nitroanilida sintéticos S2765 (=sustrato FXa de DiaPharma), S2266, S2288, S2366, S2444 fueron de DiaPharma (Westchester, OH), Chromozym TH de Roche Diagnostics (Indianápolis, IN), Spectrozyme fIXa® (#299) y Spectrozyme® FVIIa de American Diagnostica (Greenwich, CT). 3,4-dicloro-isocumarina, BSA y Tween-20 fueron de Sigma-Aldrich.

15 Plasmina y factor XIa fueron de Haematologic Technologies Inc. (Essex Junction, VT), calicreína plasmática de Calbiochem (La Jolla, CA), factor VII y factor XIIa de Enzyme Research (South Bend, IN), activador del plasminógeno tipo urocinasa (uPA) de American Diagnostica, pro-uPA de Fitzgerald Industries Int. (Concord, MA). La laminina de rata fue de Millipore (Temecula, CA). Hepsina (humana), matriptasa, marapsina, activador del factor de crecimiento de hepatocitos (HGFA), pro-factor de crecimiento de hepatocitos (pro-HGF), inhibidor-1 del dominio Kunitz (KD1) derivado del inhibidor-1 de HGFA (HAI-1) y HAI-2 se expresaron recombinantemente y se purificaron como se ha descrito previamente (Kirchhofer y col., 2003; Kirchhofer y col., 2005; Li y col., 2009; Moran y col., 2006; Peek y col., 2002; Shia y col., 2005). Como anticuerpos de control, los presentes inventores usaron Fab o IgG anti-HGFA (Fab40, Fab58, Fab75, IgG75) generado por expresión en fago de anticuerpo (Ganesan y col., 2009; Wu y col., 2007).

20 El fago auxiliar M13-KO7 fue de New England Biolabs. Las placas Maxisorp immunoplates fueron de Nalgen NUNC International (Naperville, IL). Dynabeads® MyOne Streptavidin fue de Invitrogen (Carlsbad, CA). El sustrato de peroxidasa 3,3',5,5'-tetrametil-bencidina/H₂O₂ (TMB) fue de Kirkegaard and Perry Laboratories, Inc. NeutrAvidin y estreptavidina fueron de Pierce Biotechnology, Inc.

25 Clonación, expresión y purificación de prostasina: Se expresó el dominio extracelular de la prostasina humana (Ala³³-Leu³²¹) que aloja una marca Flag del extremo C usando el sistema de expresión de baculovirus con células de *T. ni*. Después de la incubación de 72 horas, el sobrenadante se recogió y el medio extraído se cargó sobre una columna de anticuerpo anti-Flag M2-agarosa (Sigma). La proteína unida se eluyó con glicina 100 mM, pH 3,0 y se neutralizó inmediatamente con Tris 1 M a pH 8,0. La forma de zimógeno obtenida de la prostasina se activó con matriptasa recombinante a temperatura ambiente durante 16 horas. A partir de aquí, la prostasina bicatenaria activada se purificó eliminando la matriptasa marcada con (His)₈ ("His8" desvelada como SEQ ID NO: 59) sobre una columna de Ni-NTA. La prostasina se purificó adicionalmente por cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna S-200.

30 Clonación, expresión y purificación de hepsina de ratón: El dominio extracelular de la hepsina de ratón (Ser⁴⁵-Pro⁴¹⁶) que aloja una marca His del extremo C se expresó usando el sistema de expresión de baculovirus con células de *T. ni*, bajo condiciones similares a hepsina humana (Moran y col., 2006). Después de la incubación de 72 horas, el sobrenadante se recogió y el medio extraído se cargó sobre una columna de Ni-NTA (Qiagen), que se equilibró previamente con un tampón que contenía Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 300 mM. La proteína unida se eluyó con un tampón que contenía Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 300 mM e imidazol 250 mM.

35 Clonación, expresión y purificación de MSP y KD1 recombinante: Se expresó MSP recombinante en células de ovario de hámster chino como se ha descrito (Wahl y col., 1997). Se expresó KD1 y se purificó como se ha descrito (Shia y col., 2005).

40 Construcción de bibliotecas para la expresión en fago de Fab: La biblioteca, designada la biblioteca YSGX, se construyó como se ha descrito previamente usando un fagémido para la expresión en fago de Fab (pF1359) (Lib D en (Fellouse y col., 2007)). La diversidad de la biblioteca es aproximadamente 2×10^{10} .

45 Selección y caracterización de Fab anti-hepsina expresados en fago: Para los experimentos de expresión en fago, los presentes inventores usaron hepsina biotinilada (=biotina-hepsina) y hepsina biotinilada en complejo con 3,4-dicloro-isocumarina (DCI) (=biotina-hepsina:DCI). La hepsina se biotiniló usando el kit Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce, catálogo n.º 21327) según instrucciones del fabricante. Se usó algo de la hepsina biotinilada para formar un complejo de biotina-hepsina:DCI por incubación con DCI 100 µM y manteniendo esta concentración de DCI durante los experimentos de inmunopurificación posteriores. Los experimentos previos con DCI mostraron que una exposición de 40 minutos de hepsina a DCI 25-50 µM inhibió completamente la actividad de hepsina en ensayos enzimáticos con sustrato S2765. Para la primera ronda de inmunopurificación, se incubaron 10 µg de biotina-hepsina o biotina-hepsina:DCI con 1 ml de la biblioteca YSGX a la concentración de 1×10^{13} ufc/ml a 4 °C durante 1,5 h en ausencia o presencia de DCI 100 µM, respectivamente. El fago que se unió a la diana se capturó durante 15 minutos con 100 µl de Dynabeads® MyOne Streptavidin. El fago unido se eluyó con HCl 0,1 M, inmediatamente se neutralizó y a continuación se amplificó siguiendo el protocolo estándar (Sidhu y col., 2000). De la segunda ronda en adelante,

65

se incubaron 2 µg de biotina-hepsina o biotina-hepsina:DCI con 400 µl de fago amplificado a 4 °C durante 1,5 horas sin o con DCI 100 µM, respectivamente. El fago que se unió a biotina-hepsina o biotina-hepsina:DCI se capturó durante 15 minutos con Maxisorp Immunoplates (NUNC) recubiertas con NeutrAvidin o estreptavidina (alternativamente entre rondas) y se bloquearon con tampón de bloqueo (PBS, 0,5 % (peso/volumen) de BSA). Después de cinco rondas de selección, el fago se produjo a partir de clones individuales cultivados en un formato de 96 pocillos y los sobrenadantes de cultivo se diluyeron tres veces en PBS, 0,5 % (peso/volumen) de BSA, 0,1 % (v/v) de Tween 20 (tampón PBT). Los sobrenadantes del fago diluido se incubaron durante 1 hora con biotina-hepsina o biotina-hepsina:DCI que se inmovilizó sobre Maxisorp Immunoplates de 384 pocillos recubiertas con NeutrAvidin (NUNC). Las placas se lavaron seis veces con PBS, 0,05 % (v/v) de Tween 20 (tampón PT) y se incubaron 30 minutos con conjugado de peroxidasa de rábano picante/anticuerpo anti-M13 (dilución 1:5000 en tampón PBT) (Pharmacia). Las placas se lavaron seis veces con tampón PT y dos veces con PBS, se revelaron durante 15 min con sustrato de peroxidasa 3,3',5,5'-tetrametil-bencidina/H₂O₂ (Kirkegaard and Perry Laboratories), se extinguieron con H₃PO₄ 1,0 M y la absorción se midió espectrofotométricamente a 450 nm.

Se usó un ELISA de competición de fago de un único punto para identificar los Fab expresados en fago que se unen al mismo epítipo de hepsina al que se une KD1. Se diluyeron clones individuales cultivados en formato de 96 pocillos y los sobrenadantes de cultivo se diluyeron cinco veces en tampón PBT con o sin KD1 200 nM y se incubaron con biotina-hepsina que se inmovilizó sobre Maxisorp Immunoplates de 384 pocillos recubiertas con NeutrAvidin (NUNC) durante 1 hora. La placa se lavó y el fago unido se detectó por anti-M13-HRP como se ha descrito anteriormente. Para cada clon se calculó la relación de A₄₅₀ en ausencia con respecto a en presencia de KD1 200 nM. Cualquier clon con la relación superior a 2 se consideró que se dirigía al epítipo similar a KD1. Tales clones se sometieron a un ELISA de competición en fago detallado con KD1, en el que una concentración en serie de KD1 (inicio a partir de 10 µM, dilución sucesiva 1:3) se usó para competir con el Fab expresado en fago unido a hepsina.

Expresión y purificación de Fab25 e IgG25 anti-hepsina: Generalmente, en toda la presente solicitud, la forma de IgG del anticuerpo 25 se designa con el prefijo Ab y la forma Fab del anticuerpo 25 se designa con el prefijo Fab. Se introdujo un codón de terminación entre la cadena pesada y el gen 3 sobre el fagémido que codifica Fab25. El fagémido resultante se transformó en la cepa 34B8 de *E. coli*. La colonia individual se cultivó durante la noche a 37 °C en 30 ml de medio LB complementado con 50 µg/ml de carbenicilina. Se inocularon cinco ml del cultivo en 500 ml de medio C.R.A.P. completo (para preparar 1 litro: 3,57 g de (NH₄)₂SO₄, 0,71 g de citrato de Na-2H₂O, 1,07 g de KCl, 5,36 g de extracto de levadura, 5,36 g de Hycase SF. Añadir hasta 872 ml de agua desionizada. Ajustar el pH con KOH a 7,3. Esterilizar en autoclave. Enfriar a 55 °C y añadir 110 ml de MOPS 1 M a pH 7,3, 11 ml de glucosa al 50 % y 7 ml de MgSO₄ 1 M) complementado con carbenicilina (50 µg/ml) y se cultivaron a 30 °C durante 24 horas. La proteína Fab25 se purificó usando resina de proteína A-agarosa.

Se clonó el dominio variable de la cadena ligera y cadena pesada de los Fab seleccionados en un plásmido basado en pRK5 con dominio constante de la cadena ligera o cadena pesada humana (IgG1 humana) para la expresión transitoria en células de ovario de hámster chino (CHO). La proteína IgG25 se purificó por uso de cromatografía en proteína A-agarosa.

Ensayos enzimáticos con sustratos sintéticos: Se incubaron Fab25, IgG25, Fab de control o IgG de control con hepsina (1 nM para hepsina humana y 2 nM para hepsina de ratón) en tampón HEPES (HEPES 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM, 0,01 % de Triton X-100) durante 40 min a temperatura ambiente. Para los experimentos con 3,4-dicloro-isocumarina (DCI), se incubó hepsina (1 nM) con DCI en tampón HEPES que contenía 0,5 % de DMSO durante 40 min. Se añadió S2765 (concentración final de 0,2 mM) y las tasas lineales del aumento en la absorbancia a 405 nm se midieron en un lector de microplacas cinético (Versamax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Los datos se expresaron como actividad enzimática fraccionaria (v_i/v_0) y se ajustaron a un programa de ajuste de curvas de regresión de cuatro parámetros (Kaleidagraph Versión 3.6, software Synergy) para determinar los valores de Cl_{50} . Los valores son el promedio ± DE de tres experimentos independientes. Los valores de K_i^{app} para Fab25 e IgG25 se calcularon ajustando los datos a la ecuación para los sistemas de inhibición de unión fuerte (Morrison, 1969; Olivero y col., 2005).

Para examinar la especificidad de Fab25, se incubó un panel de 9 serina proteasas similares a tripsina con Fab25 1 µM durante 40 min en tampón HEPES. Se añadieron los sustratos cromogénicos apropiados y se midieron las tasas lineales del aumento en la absorbancia a 405 nm en un lector de microplacas cinético. Las concentraciones de cada enzima y el sustrato cromogénico usado fueron las siguientes: Hepsina 1 nM - S2765 0,5 mM, matriptasa 0,5 nM - S2765 0,5 mM, prostasina 5 nM - S2765 0,5 mM, plasmina 2 nM - S2366 0,5 mM, calicreína plasmática 2 nM - S2366 0,5 mM, factor XIa 0,5 nM - S2366 0,5 mM, FXIIa 5 nM - S2288 0,5 mM, uPA 5 nM - S2444 0,5 mM, marapsina 50 nM - Spectrozyme® FVIIa 0,2 mM, HGFA 10 nM - Spectrozyme® FVIIa 0,2 mM. Los datos se expresaron como actividad enzimática fraccionaria (v_i/v_0) y fueron el promedio ± DE de 3 experimentos independientes.

Se usó un panel de sustratos pNA comercialmente disponible, teniendo todos un residuo de Arg en P1, para examinar la inhibición de hepsina por Fab25. Los 8 sustratos fueron S2765, S2266, S2288, S2366, S2444,

Chromozym TH, Spectrozyme fIXa y Spectrozyme FVIIa. El ensayo se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente, excepto que la concentración de Fab25 y Fab de control se fijaron a 100 nM. La concentración de sustratos fue 0,5 mM. Los datos se expresaron como inhibición en porcentaje de la actividad sin inhibir (sin Fab) y son el promedio \pm DE de cuatro experimentos independientes.

5 Ensayos enzimáticos con sustratos macromoleculares: Para medir la activación de pro-uPA mediada por hepsina, se diluyó sucesivamente Fab25 en tampón HBSA (HEPES 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM, 0,5 mg/ml de BSA) y se incubó con hepsina durante 35 min a temperatura ambiente. La reacción enzimática se inició mediante la adición de pro-uPA. Las concentraciones de hepsina y pro-uPA en la mezcla de reacción fueron 0,5 nM y 100 nM, respectivamente. A intervalos de 45 s, se transfirieron alícuotas de 50 μ l a una placa de 96 pocillos que contenía 150 μ l/pocillo del reactivo de parada HAI-2 (667 nM). Después de la adición de S2444 (0,5 mM), las tasas lineales del aumento en absorbancia a 405 nm se midieron en un lector de microplacas cinético. Los datos se expresaron como actividad enzimática fraccionaria (v_i/v_o) y se ajustaron a un programa de ajuste de curvas de regresión de cuatro parámetros (Kaleidagraph) para determinar los valores de Cl₅₀.

15 Para los ensayos de activación del factor VII, se incubó hepsina con Fab25 o Fab de control durante 5 min en tampón HEPES antes de la adición de factor VII. Las concentraciones en la mezcla de reacción fueron: hepsina 50 nM, Fab 500 nM y factor VII 8 μ M. Después de 0,5 h y 2 h de incubación a 37 °C, se tomaron alícuotas y se analizaron por SDS-PAGE (gel en gradiente del 4-20 %, Invitrogen) bajo condiciones reductoras. Los geles se tiñeron con SimplyBlue™ (Invitrogen).

20 Procesamiento proteolítico *in vitro* de Fab25 por hepsina: Se incubó Fab25 (3 μ M) con hepsina 10 nM durante 24 h a temperatura ambiente, tanto en un tampón a bajo pH (MES 100 mM a pH 6,0, NaCl 150 mM) como en un tampón a alto pH (Tris-HCl 50 mM a pH 8,0, NaCl 150 mM). La reacción se detuvo mediante la adición de 20 μ l de 2X tampón de muestra (con/sin β -mercaptoetanol) y se hirvió a 95 °C durante 5 minutos. La proteólisis se monitorizó por desplazamiento de la movilidad del gel sobre un gel en gradiente de poliacrilamida del 4-20 % (peso/volumen) teñido con azul brillante de Coomassie.

25 Ensayo de migración de células: Se realizaron ensayos de migración de células como se han descrito previamente (Tripathi y col., 2008) usando un soporte permeable FluoroBlok™ de 8,0 μ m de tamaño de poro de 24 pocillos (BD Biosciences, Bedford, MA). La parte inferior de los filtros se recubrió con tanto laminina de rata sin tratar como tratada (1 μ g/ml). La laminina se co-incubó con hepsina o complejo de hepsina-Fab25 o solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante la noche a 4 °C. A continuación, los insertos se bloquearon con tampón SuperBlock durante 1 hora. Se tripsinaron células de cáncer de próstata humano DU145, se resuspendieron en medio libre de suero, se lavaron dos veces con medio libre de suero y se sembraron células (20.000) en la cámara superior de los insertos. Después de 5 horas de incubación en 5 % de CO₂ y 37 °C, las células que quedaban sobre el filtro superior se rasparon suavemente usando un hisopo de algodón y los insertos se lavaron suavemente con PBS. Aquellas células que migraron a la cámara inferior se fijaron con 500 μ l de metanol durante 30 minutos, se secaron al aire durante 20 min y se tiñeron con 500 μ l de YO-PRO-1 10 μ M (Invitrogen, Carlsbad, CA) durante 10 minutos. La placa se lavó con PBS y la fluorescencia se midió en un lector de placas (Espectramax M5, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) usando una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 555 nm. Posteriormente, se obtuvieron imágenes de las placas con un microscopio invertido (IX81, Olympus) conectado a una cámara de CCD con un objetivo 10x.

30 Unión de Fab25 a hepsina: Se compró un sistema Octet-RED equipado con puntas de biosensor de SBC de estreptavidina de ForteBio (Menlo Park, CA). Antes del inicio del experimento, las puntas del sensor se humedecieron previamente durante 15 minutos a 25 °C en un tampón que contenía HEPES 50 mM a pH 7,5, NaCl 150 mM y 0,05 % de Tween-20. Se capturó hepsina biotinilada (7,5 μ g/ml) sobre el sensor de estreptavidina durante 5 minutos con agitación a 1000 rpm. Los sensores se lavaron brevemente en tampón antes de sumergirlos sobre los pocillos de muestra que contenían Fab25 (dilución sucesiva doble a partir de 200 nM) y control de tampón. La asociación se monitorizó durante 10 minutos y la disociación se siguió durante 30 minutos. Los datos se ajustaron a un modelo de unión 1:1 usando el software de análisis Octet-RED.

35 Activación de pro-MSP por hepsina expresada en la superficie celular en célula LnCap: Las células LnCaP-34 se generaron como se ha descrito (Moran y col., 2006), para expresar establemente en exceso hepsina produciendo un aumento de 5 veces en la expresión de la superficie celular de hepsina y un aumento de 3 veces en la actividad enzimática de la hepsina en comparación con las células LnCaP-17, que solo expresan hepsina endógena a niveles relativamente bajos, comparables a las células LnCaP parentales. Se lavaron células LnCaP-17 confluentes y LnCap-34 cultivadas en placas de 24 pocillos con medio RPMI-1640 libre de suero y se incubaron tanto solas como con diferentes inhibidores anti-hepsina (1 μ M de anticuerpo anti-hepsina Fab25/1 μ M de KD1/1 μ M de Ac-KQLR-cmk ("KQLR" desvelado como SEQ ID NO: 12)) en medio RPMI-1640 libre de suero durante 15 minutos a 37 °C antes de la adición de pro-MSP marcada con ¹²⁵I (25 μ g/ml). Después de la incubación durante 3 h a 37 °C, se tomaron alícuotas y se analizaron por SDS-PAGE (gel en gradiente del 4-20 %) (Invitrogen, Carlsbad, CA), seguido de exposición a películas de rayos X.

65

Activación de pro-HGF por hepsina expresada en la superficie celular en célula LnCap: Se lavaron células LnCap-34 confluentes cultivadas en placas de 24 pocillos con medio RPMI-1640 libre de suero y se incubaron tanto solas como con hepsina recombinante (10 nM) o con diferentes concentraciones de Fab25 (20 nM - 0,15 nM) en medio RPMI-1640 libre de suero durante 15 minutos a 37 °C antes de la adición de pro-HGF marcada con ¹²⁵I (25 µg/ml). Después de la incubación durante 3 h a 37 °C, se tomaron alícuotas y se analizaron por SDS-PAGE (gel en gradiente del 4-20 %) (Invitrogen, Carlsbad, CA) seguido de exposición a películas de rayos X.

Unión de Ab25 a hepsina por resonancia de plasmones superficiales: Se realizaron mediciones de resonancia de plasmones superficiales en un instrumento BIAcore™-3000 (GE Healthcare, NJ) para determinar la afinidad de unión de Ab25. Se inmovilizaron químicamente IgG de conejo anti-humana (acoplamiento con amina) sobre chip biosensores CM5 y se capturó Ab25 dando aproximadamente 350 unidades de respuesta (UR). Para las mediciones cinéticas, se inyectaron diluciones sucesivas dobles de hepsina activa (1 nM a 500 nM) en tampón HBS-P a 25 °C con una velocidad de flujo de 30 µl/min. Se obtuvieron constantes de asociación (k_a) y constantes de disociación (k_d) usando un modelo de unión de Langmuir uno a uno sencillo (BIA-Evaluation) y se calcularon las constantes de disociación en equilibrio (K_D) (k_d/k_a). Debido a la rápida cinética, se usó una medición en estado estacionario para determinar la afinidad de pro-hepsina con Ab25. Se inyectó dilución sucesiva doble de pro-hepsina (195 nM a 100 mM) sobre el chip sensor de anticuerpo capturado (Ab25) para lograr la máxima unión ($R_{máx}$) y para alcanzar el equilibrio en estado estacionario. Los valores de R_{eq} se calcularon y se representaron individualmente contra C (concentración de pro-hepsina) usando BIA-Evaluation para determinar K_D .

Calorimetría de valoración isotérmica: Se realizaron experimentos de TC en un instrumento ITC₂₀₀ (GE Healthcare). Se purificaron Fab25 y hepsina por separado sobre una columna cromatográfica de exclusión por tamaño (Superdex S200, GE Healthcare), usando un tampón que contenía HEPES 50 mM a pH 7,5 y NaCl 150 mM. La célula de muestra (204 µl) se cargó con hepsina (14 µM) y la concentración de Fab25 en la jeringa fue 138 µM. Un experimento de valoración normalmente consistió en 20 inyecciones, cada una de 2 µl de volumen y 180 s de duración, con un intervalo de 3 min entre adiciones. La tasa de agitación fue 1000 rpm. Los datos sin procesar se integraron, se corrigieron para calores no específicos, se normalizaron para la concentración y se analizaron según un modelo de unión 1:1 que supone un único conjunto de sitios de unión idénticos (la curva de valoración isotérmica se registró y se analizó usando el software ORIGIN proporcionado con el instrumento ITC. Los datos se integraron para proporcionar una curva de valoración; y, usando un ajuste por mínimos cuadrados no lineal, la constante de unión K_A , el calor de unión (ΔH) y la estequiometría de la unión se extrajeron de la curva.

Resultados/discusión

Para identificar anticuerpos anti-hepsina que bloquean la actividad enzimática de la hepsina, los presentes inventores emplearon clasificación por disolución contra hepsina biotilada sin inhibidor (biotina-hepsina) y contra hepsina biotilada en complejo con DCI (biotina-hepsina:DCI). DCI es un inhibidor de serina proteasa basado en el mecanismo, que ocupa el bolsillo S1 formando aductos de monoacilo o diacilo covalentes con la Ser195 e His57 catalíticas (numeración de quimotripsinógeno) (Fig. 9A) (Powers y col., 1989). Un modelo molecular del complejo de hepsina:DCI basado en la estructura cristalina del complejo de factor-D:DCI (código PDB 1DIC) (Col y col., 1998) indicó que el anillo aromático del inhibidor de DCI ocuparía el bolsillo S1. Los hallazgos previos de los presentes inventores (Wu y col., 2007) indicaron que los anticuerpos anti-HGFA que bloquean la función derivados de las bibliotecas de muestras de fago de Fab de los presentes inventores no ocupan el bolsillo S1. Por tanto, DCI unida a hepsina puede no interferir con la unión del anticuerpo, pero podría ejercer influencias beneficiosas sobre la conformación del sitio activo, favoreciendo interacciones con el anticuerpo. El sitio activo de las serina proteasas similares a tripsina está formado por varios bucles intrínsecamente móviles (el 'dominio de activación') (Huber y Bode, 1978). En particular, el bucle de 220 forma parte del bolsillo S1 y puede adoptar diversos estados conformacionales en algunas serina proteasas (Johnson y col., 2005; Shia y col., 2005; Spraggon y col., 2009; Wilken y col., 2004). Solo las apo-estructuras revelaron tales conformaciones de bucle inusuales, mientras que las co-estructuras cristalinas con un inhibidor del sitio activo mostraron sitios activos apropiadamente formados, lo más probablemente debido a fuerzas de estabilización aplicadas por el inhibidor (Arni y col., 1994; Shia y col., 2005; Spraggon y col., 2009). La apo-estructura de hepsina es desconocida y todas las estructuras de hepsina publicadas son co-estructuras cristalinas con un inhibidor del sitio activo (Herter y col., 2005; Somoza y col., 2003). Por tanto, los presentes inventores razonaron que la ocupación del bolsillo S1 por DCI puede aplicar fuerzas estabilizantes sobre la posible flexibilidad del bucle, favoreciendo el reconocimiento de anticuerpos. Ensayos enzimáticos mostraron que concentraciones de DCI superiores a 20 µM produjeron inhibición de hepsina completa después de un periodo de incubación de 40 min (Fig. 9). Por tanto, los experimentos de clasificación con fago contra el complejo de hepsina biotilado:DCI se llevaron a cabo en presencia de DCI 100 µM.

Se usó una biblioteca de anticuerpos sintéticos minimalista con diversidad química limitada en regiones determinantes de la complementariedad (CDR), designada biblioteca YSGX (Fellhouse y col., 2007), para buscar un anticuerpo inhibidor contra hepsina por clasificación por disolución, en el que se incubó biotina-hepsina o el complejo de biotina-hepsina:DCI con la biblioteca de Fab expresados en fago. La inmunopurificación contra biotina-hepsina:DCI produjo un clon de unión a hepsina, designado HpsFab25 (también llamado "Fab25"), que fue

dominante después de 5 rondas de selección. Las secuencias de HVR de Fab25 se muestran en la Figura 1. La CDR-H3 de HpsFab25 es muy larga (21 residuos) y HpsFab25 contuvo tres residuos de Lys.

5 Se realizaron experimentos de ELISA para probar si la unión de Fab25 se inhibió por KD1, un inhibidor de hepsina que se une al sitio activo de hepsina. Como se muestra en la Figura 10, KD1 inhibió la unión de Fab25-fago a hepsina en un modo dependiente de la concentración, sugiriendo que Fab25 se unió en o cerca de la región del sitio activo de hepsina y, así, puede interferir con la actividad enzimática.

10 La capacidad de Fab25 para inhibir la actividad humana y de ratón se probó usando sustrato de hepsina sintético, S2765. Como se muestra en la Figura 11, Fab 25 inhibió la actividad de hepsina humana y de ratón en un modo dependiente de la concentración, alcanzando la inhibición completa a las mayores concentraciones probadas. La K_i^{ap} calculada fue $4,1 \pm 1,0$ nM (n=3) para hepsina humana y 329 ± 51 nM (n=3) para hepsina murina. Experimentos adicionales con IgG25 mostraron que inhibió la hepsina humana con una K_i^{ap} de $11,3 \pm 1,7$ nM (n=3), mientras que una IgG de control no tuvo efecto (datos no mostrados). Los resultados mostraron que Fab25 inhibió la hepsina humana aproximadamente 80 veces más potentemente que la hepsina murina. Esto sugirió que el sitio de unión al anticuerpo no está completamente conservado en hepsina de ratón. Debido a que el dominio de proteasa de la hepsina de ratón no tiene ni inserciones ni deleciones en comparación con la hepsina humana, la reducida potencia de Fab25 fue probablemente debida a cambios en aminoácidos que son importantes para la interacción con Fab25.

20 La afinidad de unión de Fab25 a hepsina humana se determinó usando análisis con Octet RED. La Kd fue $2,55 \pm 0,45$ nM.

25 La especificidad de Fab 25 se probó preguntando si inhibía la actividad enzimática de un panel de serina proteasas similares a tripsina. El panel de serina proteasas similares a tripsina incluyó algunos de los homólogos del dominio de proteasa más próximos de hepsina, tales como calicreína plasmática, prostasina, marapsina y plasmina. Los resultados (Figura 12) demostraron que Fab25 tuvo una especificidad exclusiva hacia hepsina, ya que no afectó la actividad enzimática de las serina proteasas examinadas a una concentración que fue 250 veces superior al valor de K_i^{ap} determinado para hepsina.

30 Se determinó el efecto de Fab25 sobre el procesamiento mediado por hepsina de pro-uPA y factor VIII. Como se muestra en la Figura 13A, Fab25 inhibió la actividad de hepsina hacia pro-uPA con un valor de CI_{50} de $3,3 \pm 0,4$ nM (n=3), que fue comparable a su potencia en el ensayo de pNA (Tabla 1). A concentraciones de Fab superiores a 100 nM, la inhibición fue completa y comparable a la fuerte inhibición en el ensayo de activación del factor VII (Figura 13B). El factor VII es un sustrato relativamente malo para hepsina, requiriendo altas concentraciones de hepsina en el ensayo (50 nM). Por tanto, aún cuando Fab25 se usó a 500 nM, esto produjo una relación de Fab25:hepsina relativamente baja (10:1) en comparación con los experimentos de activación de pro-uPA (relaciones hasta 600:1), que puede explicar que la inhibición durante el experimento de 2 h extendido no fue completa.

40 La hepsina escindió preferencialmente los sustratos después de una Arg en P1 (Herter y col., 2005), aunque también reconoce sustratos con Lys en P1 (Moran y col., 2006). Por tanto, los presentes inventores consideraron la posibilidad de que la hepsina pudiera escindir el bucle de CDR-H3 de Fab, que contuvo tres residuos de Lys y fue inusualmente larga. La prioridad procede de estudios recientes sobre el anticuerpo anti-matriptasa E2, que se sometió a escisión por matriptasa después de un residuo de P1-Arg en un bucle de CDR-H3 largo (Farady y col., 2008). Por tanto, Fab25 se expuso a hepsina durante periodos de tiempo prolongados bajo diferentes condiciones de pH. El Fab25 migró como una banda de 50 kDa bajo condiciones no reductoras y como una banda de 25 kDa bajo condiciones reductoras y no pudieron identificarse productos de degradación de bajo peso molecular (Figura 14). Por tanto, Fab25 fue resistente a la proteólisis de hepsina cuando se expuso a hepsina durante periodos de tiempo prolongados. Esta conclusión está de acuerdo con la suposición de los presentes inventores de que el complejo de biotina-hepsina:DCI favoreció la selección de Fab expresado en fago que se une fuera del bolsillo S1.

50 Se ha establecido recientemente que la laminina es un sustrato para hepsina (Tripathi y col.). El estudio también sugirió que la escisión de laminina por hepsina puede potenciar fisiológicamente la migración de la línea de células de cáncer de próstata DU145. Los presentes inventores examinaron si Fab25 inhibió la migración dependiente de laminina de célula DU145. Los resultados de este experimento (Figura 15) demostraron que Fab25 neutralizó eficazmente la actividad proteolítica de hepsina y así bloqueó el procesamiento de su laminina sustrato.

60 Los presentes inventores también probaron la capacidad de Fab25 para inhibir la actividad de hepsina hacia un panel de sustratos sintéticos. Los resultados mostrados en la Tabla 1 demostraron que Fab25 inhibió la escisión medida por hepsina de todos los sustratos de pNA >90 %. Debido a que los sustratos de pNA ocupan los subsitios S1-S3 sobre hepsina, puede llegarse a la conclusión de que el anticuerpo interfirió fuertemente con las interacciones del sustrato en estos subsitios. El hallazgo de que, a pesar de la diversidad química de las posiciones P2 y P3 de los sustratos de pNA, la inhibición fue >90 % para todos los sustratos argumenta un fuerte efecto de anticuerpos en los sitios S2 y/o S3 en vez de sutiles influencias en estos sitios. Queda por esclarecer si estos efectos son o no alostéricos en la naturaleza o si queda impedimento estérico directo. Además, debido a que Fab25 se seleccionó

65

contra hepsina inhibida por DCI, es poco probable que Fab inhibiera la hepsina ocupando directamente el bolsillo S1.

5 Tabla 1. Inhibición por Fab25 de la actividad de hepsina hacia un panel de sustratos sintéticos. Se incubó hepsina con Fab25 100 nM o Fab de control durante 40 min antes de la adición de 8 sustratos de pNA diferentes. Se midieron las velocidades lineales iniciales en un lector de microplacas cinético y la actividad enzimática se expresó como porcentaje de actividad de hepsina sin Fab presente.

Tabla 1

Sustrato	Fab25 ^a (% de control) ^b	Fab de control ^a (% de control) ^b
S2765	2,2 ± 0,7	100,4 ± 2,3
S2266	3,0 ± 1,3	97,3 ± 3,9
S2288	2,5 ± 0,8	98,5 ± 1,9
S2366	3,4 ± 0,5	99,9 ± 2,7
S2444	1,7 ± 0,9	99,5 ± 1,8
Chromozyme TH	8,4 ± 1,2	99,0 ± 4,6
Spectrozyme FIXa	-1,6 ± 2,1	112,1 ± 8,5
Spectrozyme FVIIa	3,4 ± 0,8	101,8 ± 4,8

^a Fab 100 nM en mezcla de reacción
^b el control fue hepsina enzimática sin Fab

10 Se mostró que Fab25 inhibió cosistentemente la actividad de hepsina >90 % en todos los ensayos funcionales usando una variedad de sustratos sintéticos y macromoleculares.

15 El procesamiento proteolítico de pro-MSP por hepsina nativamente expresada sobre la superficie celular se monitorizó sobre la línea celular LnCap-34 (Moran y col., 2006). Células LnCap-34 que expresan hepsina fueron capaces de procesar la ¹²⁵I-pro-MSP (Fig. 16). La actividad proteolítica del procesamiento de pro-MSP fue principalmente debida a hepsina ya que los tres inhibidores de hepsina (Ac-KQLR-clorometilcetona ("KQLR" desvelada como SEQ ID NO: 12), KD1 y Fab25) bloquearon eficazmente la escisión proteolítica.

20 *Lista de referencias parcial*

- Ami, R.K., K. Padmanabhan, K.P. Padmanabhan, T.P. Wu, and A. Tulinsky. 1994. Structure of the non-covalent complex of prothrombin kringle 2 with PPACK-thrombin. *Chem Phys Lipids*. 67-68:59-66.
- 25 Cole, L.B., J.M. Kilpatrick, N. Chu, and Y.S. Babu. 1998. Structure of 3,4-dichloroisocoumarin-inhibited factor D. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 54:711-7.
- Farady, C.J., P.F. Egea, E.L. Schneider, M.R. Darragh, and C.S. Craik. 2008. Structure of an Fab-protease complex reveals a highly specific non-canonical mechanism of inhibition. *J Mol Biol*. 380:351-60.
- Fellouse, F.A., K. Esaki, S. Birtalan, D. Raptis, V.J. Cancasci, A. Koide, P. Jhurani, M. Vasser, C. Wiesmann, A.A. Kossiakoff, S. Koide, and S.S. Sidhu. 2007. High-throughput generation of synthetic antibodies from highly functional minimalist phage-displayed libraries. *J Mol Biol*. 373:924-40.
- 30 Ganesan, R., C. Eigenbrot, Y. Wu, W.C. Liang, S. Shia, M.T. Lipari, and D. Kirchhofer. 2009. Unravelling the allosteric mechanism of serine protease inhibition by an antibody. Structure.submitted.
- Herter, S., D.E. Piper, W. Aaron, T. Gabriele, G. Cutler, P. Cao, A.S. Bhatt, Y. Choe, C.S. Craik, N. Walker, D. Meiningner, T. Hoey, and R.J. Austin. 2005. Hepatocyte growth factor is a preferred in vitro substrate for human hepsin, a membrane-anchored serine protease implicated in prostate and ovarian cancers. *Biochem J*. 390:125-36.
- 35 Huber, R., and W. Bode. 1978. Structural basis of the activation and action of trypsin. *Acc. Chem. Res*. 11:114-122.
- Johnson, D.J., T.E. Adams, W. Li, and J.A. Huntington. 2005. Crystal structure of wild-type human thrombin in the Na⁺-free state. *Biochem J*. 392:21-8.
- 40 Kirchhofer, D., M. Peek, W. Li, J. Stamos, C. Eigenbrot, S. Kadkhodayan, J.M. Elliott, R.T. Corpuz, R.A. Lazarus, and P. Moran. 2003. Tissue expression, protease specificity, and Kunitz domain functions of hepatocyte growth factor activator inhibitor-1B (HAI-1B), a new splice variant of HAI-1. *J Biol Chem*. 278:36341-9.
- 45 Kirchhofer, D., M. Peek, M.T. Lipari, K. Billeci, B. Fan, and P. Moran. 2005. Hepsin activates pro-hepatocyte growth factor and is inhibited by hepatocyte growth factor activator inhibitor-1B (HAI-1B) and HAI-2. *FEBS Lett*. 579:1945-50.
- Li, W., D.M. Danilenko, S. Bunting, R. Ganesan, S. Sa, R. Ferrando, T.D. Wu, G.A. Kolumam, W. Ouyang, and D. Kirchhofer. 2009. The Serine Protease Marapsin Is Expressed in Stratified Squamous Epithelia and Is Up-regulated in the Hyperproliferative Epidermis of Psoriasis and Regenerating Wounds. *J Biol Chem*. 284:218-28.
- 50 Moran, P., W. Li, B. Fan, R. Vij, C. Eigenbrot, and D. Kirchhofer. 2006. Pro-urokinase-type plasminogen activator is a substrate for hepsin. *J Biol Chem*. 281:30439-46.
- Morrison, J.F. 1969. Kinetics of the reversible inhibition of enzyme-catalysed reactions by tight-binding inhibitors. *Biochim Biophys Acta*. 185:269-86.

- 5 Olivero, A.G., C. Eigenbrot, R. Goldsmith, K. Robarge, D.R. Artis, J. Flygare, T. Rawson, D.P. Sutherlin, S. Kadkhodayan, M. Beresini, L.O. Elliott, G.G. DeGuzman, D.W. Banner, M. Ultsch, U. Marzec, S.R. Hanson, C. Refino, S. Bunting, and D. Kirchhofer. 2005. A selective, slow binding inhibitor of factor VIIa binds to a nonstandard active site conformation and attenuates thrombus formation in vivo. *J Biol Chem.* 280:9160-9.
- 10 Peek, M., P. Moran, N. Mendoza, D. Wickramasinghe, and D. Kirchhofer. 2002. Unusual proteolytic activation of pro-hepatocyte growth factor by plasma kallikrein and coagulation factor XIa. *J Biol Chem.* 277:47804-9.
- 15 Powers, J.C., C.M. Kam, L. Narasimhan, J. Oleksyszyn, M.A. Hernandez, and T. Ueda. 1989. Mechanism-based isocoumarin inhibitors for serine proteases: use of active site structure and substrate specificity in inhibitor design. *J Cell Biochem.* 39:33-46.
- 20 Shia, S., J. Stamos, D. Kirchhofer, B. Fan, J. Wu, R.T. Corpuz, L. Santell, R.A. Lazarus, and C. Eigenbrot. 2005. Conformational lability in serine protease active sites: structures of hepatocyte growth factor activator (HGFA) alone and with the inhibitory domain from HGFA inhibitor-1B. *J Mol Biol.* 346:1335-49.
- 25 Sidhu, S.S., H.B. Lowman, B.C. Cunningham, and J.A. Wells. 2000. Phage display for selection of novel binding peptides. *Methods Enzymol.* 328:333-63.
- 30 Somoza, J.R., J.D. Ho, C. Luong, M. Ghate, P.A. Sprengeler, K. Mortara, W.D. Shrader, D. Sperandio, H. Chan, M.E. McGrath, and B.A. Katz. 2003. The structure of the extracellular region of human hepsin reveals a serine protease domain and a novel scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) domain. *Structure.* 11:1123-31.
- 35 Spraggon, G., M. Hornsby, A. Shipway, D.C. Tully, B. Bursulaya, H. Danahay, J.L. Harris, and S.A. Lesley. 2009. Active site conformational changes of prostaticin provide a new mechanism of protease regulation by divalent cations. *Protein Sci.* 18:1081-94.
- 40 Tripathi, M., S. Nandana, H. Yamashita, R. Ganesan, D. Kirchhofer, and V. Quaranta. 2008. Laminin-332 is a substrate for hepsin, a protease associated with prostate cancer progression. *J Biol Chem.*
- 45 Wilken, C., K. Kitzing, R. Kurzbauer, M. Ehrmann, and T. Clausen. 2004. Crystal structure of the DegS stress sensor: How a PDZ domain recognizes misfolded protein and activates a protease. *Cell.* 117:483-94.
- 50 Wu, Y., C. Eigenbrot, W.C. Liang, S. Stawicki, S. Shia, B. Fan, R. Ganesan, M.T. Lipari, and D. Kirchhofer. 2007. Structural insight into distinct mechanisms of protease inhibition by antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:19784-9.
- 55 Xuan, J.A., D. Schneider, P. Toy, R. Lin, A. Newton, Y. Zhu, S. Finster, D. Vogel, B. Mintzer, H. Dinter, D. Light, R. Parry, M. Polokoff, M. Whitlow, Q. Wu, and G. Parry. 2006. Antibodies neutralizing hepsin protease activity do not impact cell growth but inhibit invasion of prostate and ovarian tumor cells in culture. *Cancer Res.* 66:3611-9.

Aunque la anterior invención se ha descrito en algún detalle a modo de ilustración y ejemplo para fines de claridad del entendimiento, las descripciones y ejemplos no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 35 <110> GENENTECH, INC., y col.
- 40 <120> ANTICUERPOS ANTI-HEPSINA Y MÉTODOS DE USO DE LOS MISMOS
- <130> P4366R1 WO
- 45 <140>
- <141>
- <150> 61/253.953
- <151> 22-10-2009
- 50 <160> 59
- <170> PatentIn versión 3.5
- 55 <210> 1
- <211> 11
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 60 <220>
- <221> fuente
- <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"
- <400> 1
- Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ala Val Ala**
- 1 5 10**

ES 2 534 646 T3

<210> 2
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"
 10 <400> 2
 Ser Ala Ser Ser Leu Tyr Ser
 1 5
 <210> 3
 <211> 11
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"
 20 <400> 3
 Gln Gln Tyr Tyr Ser Ser Tyr Tyr Leu Leu Thr
 1 5 10
 <210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"
 30 <400> 4
 Gly Phe Asn Phe Ser Tyr Ser Tyr Met His
 1 5 10
 <210> 5
 <211> 18
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"
 40 <400> 5
 Ala Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15
 Lys Gly
 45 <210> 6
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"
 <400> 6

ES 2 534 646 T3

Ala Arg Ser Asp Ser Trp Ser Tyr Lys Ser Gly Tyr Thr Gln Lys Ile
 1 5 10 15

Tyr Ser Lys Gly Leu Asp Tyr
 20

5 <210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

15 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)..(7)
 <223> /sustituir="Ser"

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (7)..(7)
 <223> /nota="Residuo dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto al de en la anotación para dicha posición"

<400> 7

25 Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala
 1 5 10

<210> 8
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 8

35 Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5

<210> 9
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 9

ES 2 534 646 T3

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ala
20           25           30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35           40           45

Tyr Ser Ala Ser Ser Lys Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg
50           55           60

Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
65           70           75           80

Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Ser Tyr Tyr Leu Leu
85           90           95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100           105

```

```

5 <210> 10
  <211> 130
  <212> PRT
  <213> Secuencia artificial

10 <220>
  <221> fuente
  <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

  <400> 10

```

ES 2 534 646 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Asp Ser Trp Ser Tyr Lys Ser Gly Tyr Thr Gln Lys Ile
 100 105 110
 Tyr Ser Lys Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 115 120 125
 Ser Ser
 130

<210> 11
 <211> 107
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <221> fuente
 10 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"
 <400> 11

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala

15

ES 2 534 646 T3

20

25

30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 12

<211> 4

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

10 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 12

Lys Gln Leu Arg

1

15

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

25 <400> 13

Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp

1

5

10

30 <210> 14

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 14

40

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

ES 2 534 646 T3

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 15
<211> 13
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
10 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 15

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10

15 <210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

25 <400> 16

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

30 <210> 17
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 17

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

40 <210> 18
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

50 <400> 18

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 19

ES 2 534 646 T3

<211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

10 <400> 19

Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr
1				5					10					15	
Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys
			20					25					30		

<210> 20
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

20 <400> 20

Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
1				5					10

<210> 21
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

30 <400> 21

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr		
			20					25					30		

<210> 22
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

40 <400> 22

Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Gly
1				5					10				

<210> 23
 <211> 32
 <212> PRT

ES 2 534 646 T3

<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
5 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 23
Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

10 <210> 24
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

20 <400> 24
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

25 <210> 25
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 25
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
1 5 10

35 <210> 26
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

45 <400> 26
Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
20 25 30

50 <210> 27
<211> 30
<212> PRT

ES 2 534 646 T3

<213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 5 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 27

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

10 <210> 28
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

20 <400> 28

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser
 20 25 30

25 <210> 29
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 29

35 Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10

<210> 30
 <211> 32
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

45 <400> 30

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

50 <210> 31
 <211> 25

ES 2 534 646 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 31

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

10
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
 20 25

<210> 32
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

20
 <400> 32

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 1 5 10

25
 <210> 33
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

35
 <400> 33

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 20 25 30

40
 <210> 34
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 34

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

50
 <210> 35

ES 2 534 646 T3

<211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

10

<400> 35

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser		
			20					25					30		

<210> 36
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

20

<400> 36

Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser		
1				5					10						

<210> 37
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

35

<400> 37

Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln
1				5					10					15	
Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
			20					25					30		

<210> 38
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

45

<400> 38

Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln
1				5					10					15	
Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	
			20					25					30		

50

ES 2 534 646 T3

<210> 39
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"
 10
 <400> 39
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
 20 25 30
 <210> 40
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"
 20
 <400> 40
 Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
 1 5 10 15
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg
 20 25 30
 25
 <210> 41
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"
 35
 <400> 41
 Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
 1 5 10 15
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
 20 25 30
 40
 <210> 42
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"
 50
 <400> 42

ES 2 534 646 T3

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

5 <210> 43
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 43

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

15 <210> 44
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

25 <400> 44

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 20 25 30

30 <210> 45
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 45

ES 2 534 646 T3

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20           25           30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35           40           45

Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50           55           60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Thr Pro Pro
85           90           95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100           105

```

<210> 46
 <211> 417
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 46

5

ES 2 534 646 T3

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 Asp Cys Gly Arg Arg Lys Leu Pro Val
145 150 155 160

Asp Arg Ile Val Gly Gly Arg Asp Thr Ser Leu Gly Arg Trp Pro Trp
165 170 175

Gln Val Ser Leu Arg Tyr Asp Gly Ala His Leu Cys Gly Gly Ser Leu
180 185 190

Leu Ser Gly Asp Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Phe Pro Glu Arg
195 200 205

Asn Arg Val Leu Ser Arg Trp Arg Val Phe Ala Gly Ala Val Ala Gln
210 215 220

Ala Ser Pro His Gly Leu Gln Leu Gly Val Gln Ala Val Val Tyr His
225 230 235 240

Gly Gly Tyr Leu Pro Phe Arg Asp Pro Asn Ser Glu Glu Asn Ser Asn
245 250 255

ES 2 534 646 T3

Asp Ile Ala Leu Val His Leu Ser Ser Pro Leu Pro Leu Thr Glu Tyr
 260 265 270

Ile Gln Pro Val Cys Leu Pro Ala Ala Gly Gln Ala Leu Val Asp Gly
 275 280 285

Lys Ile Cys Thr Val Thr Gly Trp Gly Asn Thr Gln Tyr Tyr Gly Gln
 290 295 300

Gln Ala Gly Val Leu Gln Glu Ala Arg Val Pro Ile Ile Ser Asn Asp
 305 310 315 320

Val Cys Asn Gly Ala Asp Phe Tyr Gly Asn Gln Ile Lys Pro Lys Met
 325 330 335

Phe Cys Ala Gly Tyr Pro Glu Gly Gly Ile Asp Ala Cys Gln Gly Asp
 340 345 350

Ser Gly Gly Pro Phe Val Cys Glu Asp Ser Ile Ser Arg Thr Pro Arg
 355 360 365

Trp Arg Leu Cys Gly Ile Val Ser Trp Gly Thr Gly Cys Ala Leu Ala
 370 375 380

Gln Lys Pro Gly Val Tyr Thr Lys Val Ser Asp Phe Arg Glu Trp Ile
 385 390 395 400

Phe Gln Ala Ile Lys Thr His Ser Glu Ala Ser Gly Met Val Thr Gln
 405 410 415

Leu

<210> 47
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 47

Tyr Asp Gly Ala His Leu Cys Gly Gly Ser Leu Leu Ser Gly Asp Trp
 1 5 10 15

Val Leu Thr Ala Ala His Cys Phe Pro Glu Arg Asn Arg Val Leu Ser
 20 25 30

Arg Trp Arg Val Phe Ala Gly Ala Val Ala Gln Ala Ser Pro His Gly
 35 40 45

Leu Gln Leu Gly Val Gln Ala Val Val Tyr His Gly Gly Tyr Leu Pro
 50 55 60

10

ES 2 534 646 T3

Phe Arg Asp Pro Asn Ser Glu Glu Asn Ser Asn Asp Ile Ala Leu Val
65 70 75 80

His Leu Ser Ser Pro Leu Pro Leu Thr Glu Tyr Ile Gln Pro Val Cys
85 90 95

Leu Pro Ala Ala Gly Gln Ala Leu Val Asp Gly Lys Ile Cys Thr Val
100 105 110

Thr Gly Trp Gly Asn Thr Gln Tyr Tyr Gly Gln Gln Ala Gly Val Leu
115 120 125

Gln Glu Ala Arg Val Pro Ile Ile Ser Asn Asp Val Cys Asn Gly Ala
130 135 140

Asp Phe Tyr Gly Asn Gln Ile Lys Pro Lys Met Phe Cys Ala Gly Tyr
145 150 155 160

Pro Glu Gly Gly Ile Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Phe
165 170 175

Val Cys Glu Asp Ser Ile Ser Arg Thr Pro Arg Trp Arg Leu Cys Gly
180 185 190

Ile Val Ser Trp Gly Thr Gly Cys Ala Leu Ala Gln Lys Pro Gly Val
195 200 205

Tyr Thr Lys Val Ser Asp Phe Arg Glu Trp Ile Phe Gln Ala Ile Lys
210 215 220

Thr His Ser Glu Ala Ser Gly Met Val Thr Gln Leu
225 230 235

5 <210> 48
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 48

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

15 <210> 49
<211> 23
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

ES 2 534 646 T3

<400> 49

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys
 20

5

<210> 50
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

15

<400> 50

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

20

<210> 51
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 51

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

30

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

35

<210> 52
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 52

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

45

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 20

50

<210> 53
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente

ES 2 534 646 T3

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 53

5 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 54

<211> 32

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

15

<400> 54

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 55

20 <211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

<400> 55

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
20

30

<210> 56

<211> 15

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

40

<400> 56

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

45

<210> 57

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"

<400> 57

ES 2 534 646 T3

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

5 <210> 58
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: polipéptido sintético"
<400> 58

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

15 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

20 <210> 59
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<221> fuente
<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: Marca 8xHis sintética"
<400> 59

His His His His His His His His
1 5

30

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un anticuerpo anti-hepsina aislado, en el que una forma monovalente del anticuerpo se une a hepsina humana con una afinidad inferior o igual a 10 nM o mejor, en el que una forma monovalente del anticuerpo se une a hepsina de ratón con una afinidad inferior o igual a 330 nM, y en el que el anticuerpo se une a hepsina presente en un complejo que comprende hepsina y un inhibidor de serina proteasa que se une al subsitio S1 de hepsina humana, y en el que el anticuerpo comprende:
- 10 (a) HVR-H1 que comprende la secuencia GFNFSYSYMH (SEQ ID NO:4);
 (b) HVR-H2 que comprende la secuencia ASIYSYYGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:5);
 (c) HVR-H3 que comprende la secuencia ARSDSWSYKSGYTQKIYSKGLDY (SEQ ID NO:6)
 (d) HVR-L1 que comprende la secuencia RASQSVSSAVA (SEQ ID NO:1);
 (e) HVR-L2 que comprende la secuencia SASSLYS (SEQ ID NO:2); y
 15 (f) HVR-L3 que comprende la secuencia QQYYSSYLLT (SEQ ID NO:3).
- 2.- El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el inhibidor de serina proteasa es 3,4-dicloro-isocumarina (DCI).
- 3.- El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo inhibe la activación mediada por hepsina de proteína estimulante de macrófagos (MSP).
- 20 4.- El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que el anticuerpo inhibe la migración de células dependiente de laminina.
- 5.- El anticuerpo de la reivindicación 1, que comprende además una secuencia de la región estructural del dominio variable de la cadena pesada o dominio variable de la cadena ligera mostrada en la Figura 3, 4, 5 o 6.
- 25 6.- El anticuerpo de la reivindicación 1, que comprende (a) una secuencia de VH que tiene al menos el 95 % de identidad de secuencias con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10; o (b) una secuencia de VL que tiene al menos el 95 % de identidad de secuencias con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9; o (c) una secuencia de VH como en (a) y una secuencia de VL como en (b).
- 30 7.- El anticuerpo de la reivindicación 6, que comprende una secuencia de VH de SEQ ID NO: 10 y una secuencia de VL de SEQ ID NO: 9.
- 35 8.- El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es un anticuerpo IgG1 de longitud completa.
- 9.- El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo comprende la secuencia de la región estructural consenso del subgrupo κ humano.
- 40 10.- El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el anticuerpo comprende la secuencia de la región estructural consenso del subgrupo III humano de la cadena pesada.
- 11.- Ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
- 45 12.- Un inmunocombinado que comprende el anticuerpo de la reivindicación 1 y un agente citotóxico.
- 13.- Una formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo de la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

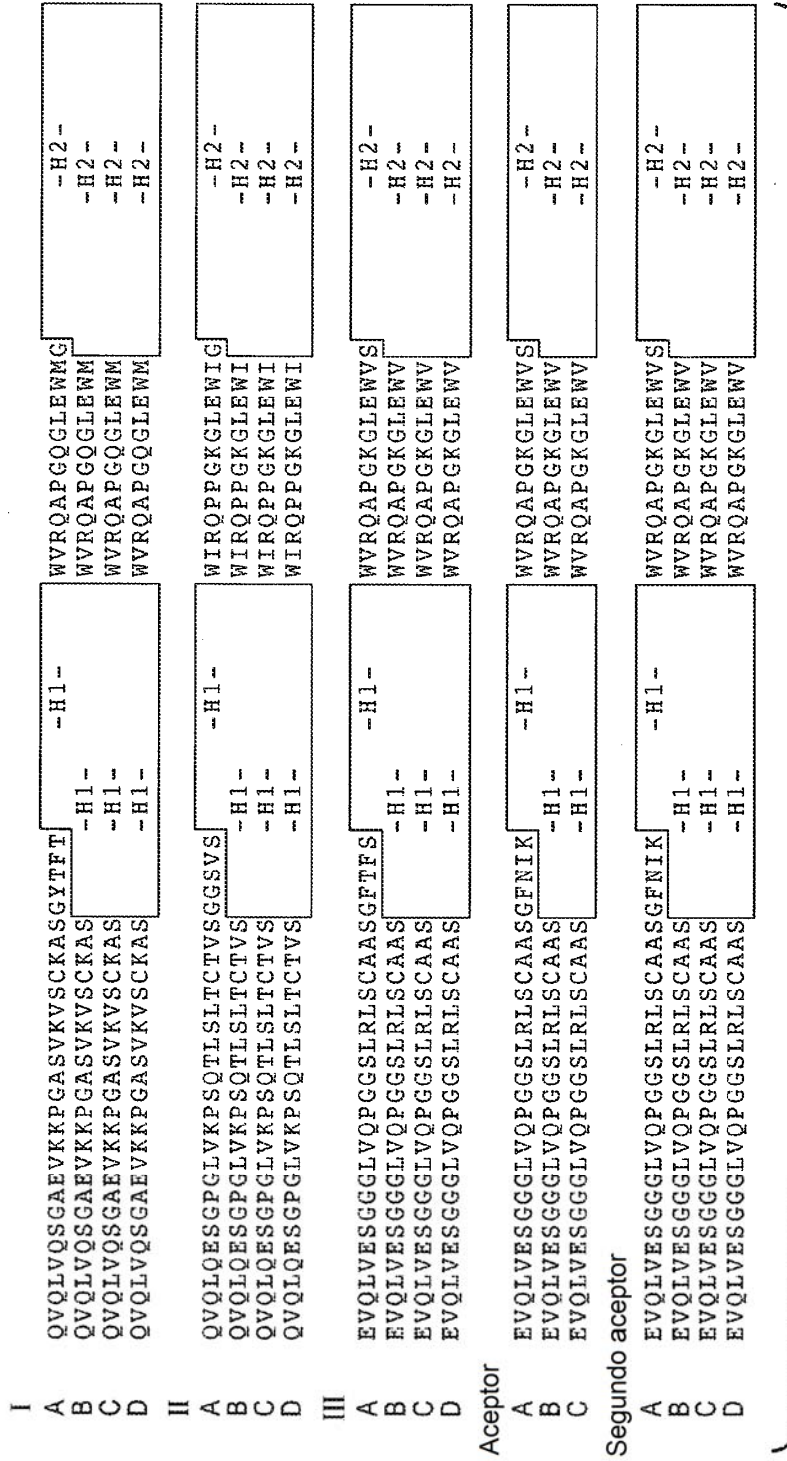


FIG. 2A

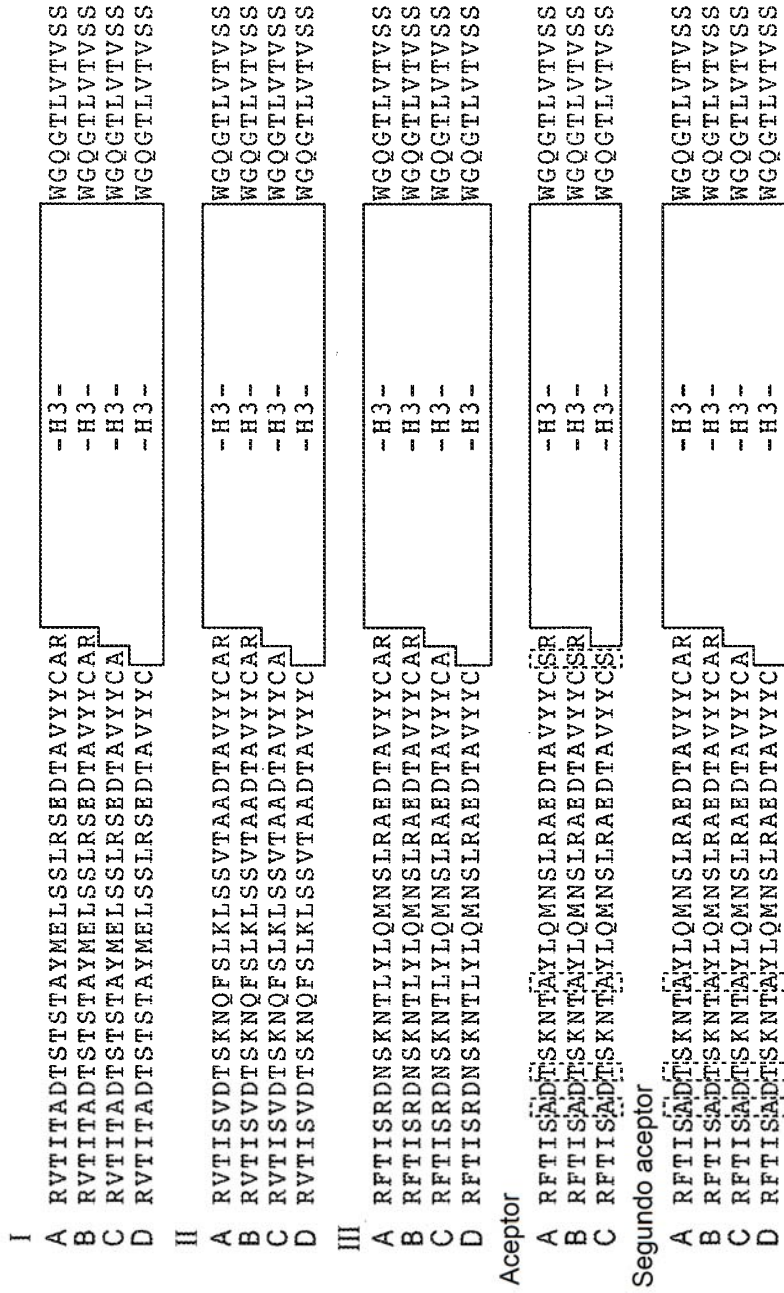


FIG. 2B

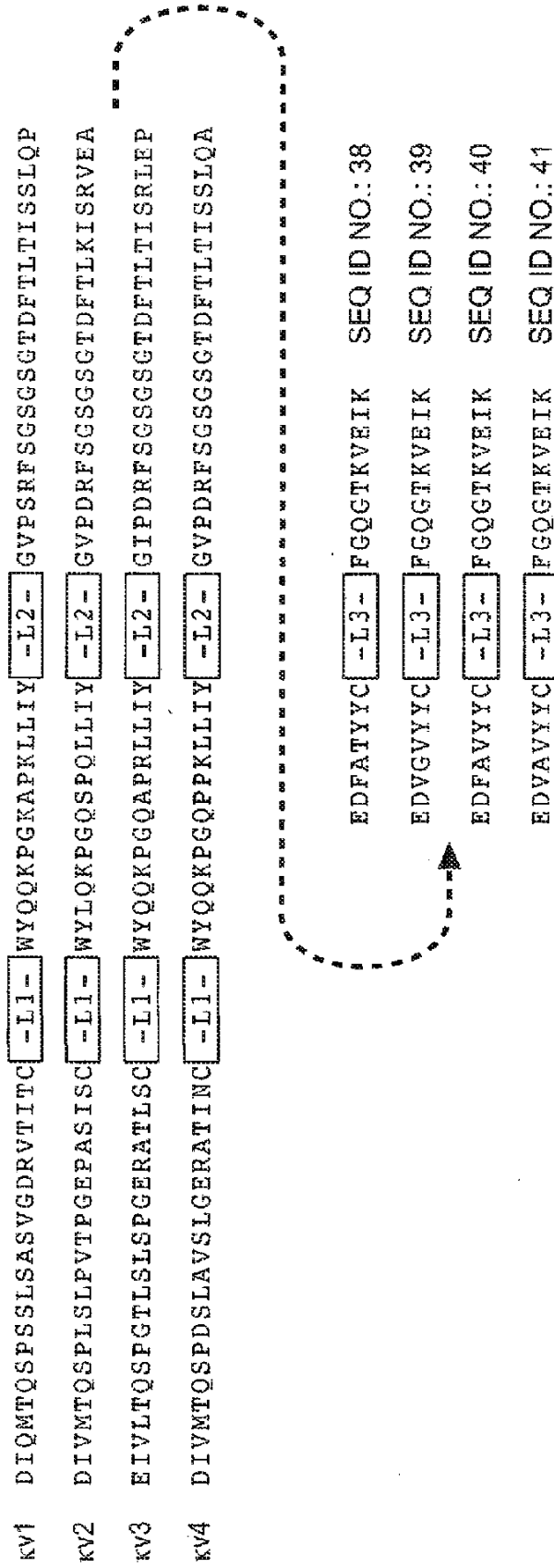


FIG. 3

Secuencias de la región estructural de la cadena ligera de huMAb4D5-8

- LC-FR1 ¹Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys²³ (SEQ ID NO: 17)
- LC-FR2 ³⁵Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁴⁹
(SEQ ID NO: 18)
- LC-FR3 ⁵⁷Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys⁸⁸
(SEQ ID NO: 58)
- LC-FR4 ⁹⁸Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys¹⁰ (SEQ ID NO: 20)

Secuencias de la región estructural de la cadena pesada de huMAb4D5-8

- HC-FR1 ¹Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser²⁵ (SEQ ID NO: 14)
- HC-FR2 ³⁶Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val⁴⁸
(SEQ ID NO: 15)
- HC-FR3 ⁶⁶Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
Met Asn⁸³ Ser^{83a} Leu^{83b} Arg^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys⁹²
(SEQ ID NO: 48)
- HC-FR4 ¹⁰³Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser¹¹¹ (SEQ ID NO: 16)

FIG. 4

Secuencias de la región estructural de la cadena ligera de huMAb4D5-8 modificada en la posición 66 (subrayada)

- LC-FR1 ¹Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys²³ (SEQ ID NO: 17)
- LC-FR2 ³⁵Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr⁴⁹
(SEQ ID NO: 18)
- LC-FR3 ⁵⁷Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys⁸⁸
(SEQ ID NO: 19)
- LC-FR4 ⁹⁸Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys¹⁰⁷ (SEQ ID NO: 20)

Secuencias de la región estructural de la cadena pesada de huMAb4D5-8 modificada en las posiciones 71, 73 y 78 (subrayadas)

- HC-FR1 ¹Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser²⁵ (SEQ ID NO: 14)
- HC-FR2 ³⁶Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val⁴⁸
(SEQ ID NO: 15)
- HC-FR3 ⁶⁶Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
Met Asn⁸³ Ser^{83a} Leu^{83b} Arg^{83c} Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys⁹²
(SEQ ID NO: 43)
- HC-FR4 ¹⁰³Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser¹¹³ (SEQ ID NO: 16)

FIG. 5

VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTICRASQSVSSAVAWYQOKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFSG
SRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQYYSSYYLLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO:9)

VH

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFSYSYMHWRQAPGKGLEWVASIYSYYGSTYYADSV
KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSDSWSYKSGYTQKIYSKGLDYWGQGTLVTVSS
(SEQ ID NO:10)

FIG. 6

MAQKEGGRTPCCSRPKVAALTAGTLLLLLTAIGAASWAIVAVLLRSDQEPLYPVQVSSAD
ARLMVFDKTEGTWRLLCSSRSNARVAGLSCEEMGFLRALTHSELDVRTAGANGTSGFFCV
DEGRLPHTQRLLEVISVDCPCRGRFLAAICQDCGRRKLPVDRIVGGRDTSLGRWFWQVSL
RYDGAHLCCGSSLLSGDWVLTAAHCFPERNRVLSRWRVFAGAVAQASPHGLQLGVQAVVYH
GGYLPFRDPNSEENSNDIALVHLSPLPLTEYIQPVCLPAAGQALVDGKICTVTGWGNTQ
YYGQQAGVLQEARVPIISNDVCNGADFYGNQIKPKMFCAGYPEGGIDACQGDSSGGPFVCE
DSISRTPRWRLCGIVSWGTCALAQKPGVYTKVSDFREWIFQAIKTHSEASGMVTQL
(SEQ ID NO:46)

FIG. 7

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	Leu	Ser	Pro	Pro	Pro	Ala	Asp	Pro	Cys
		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

(SEQ ID NO: 47)

FIG. 8A

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	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				(SEQ ID NO: 47)
465					470					475					

FIG. 8B

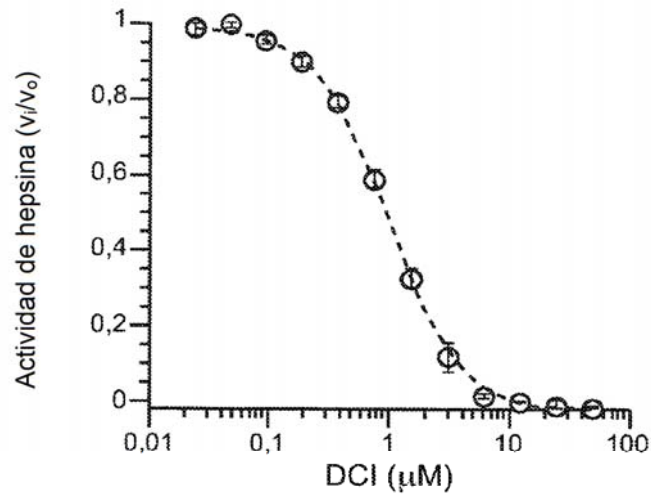


FIG. 9A

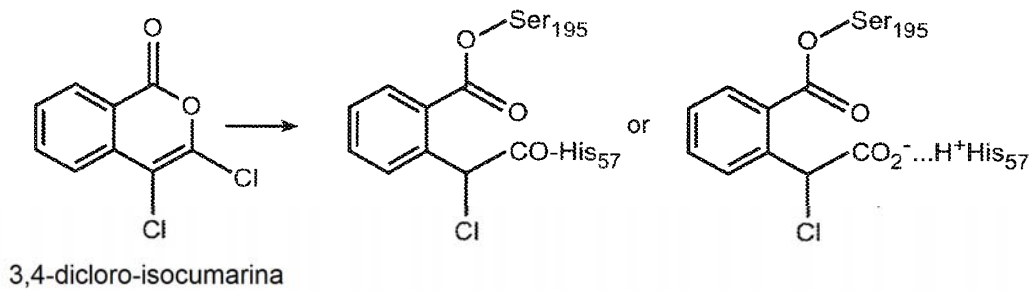


FIG. 9B

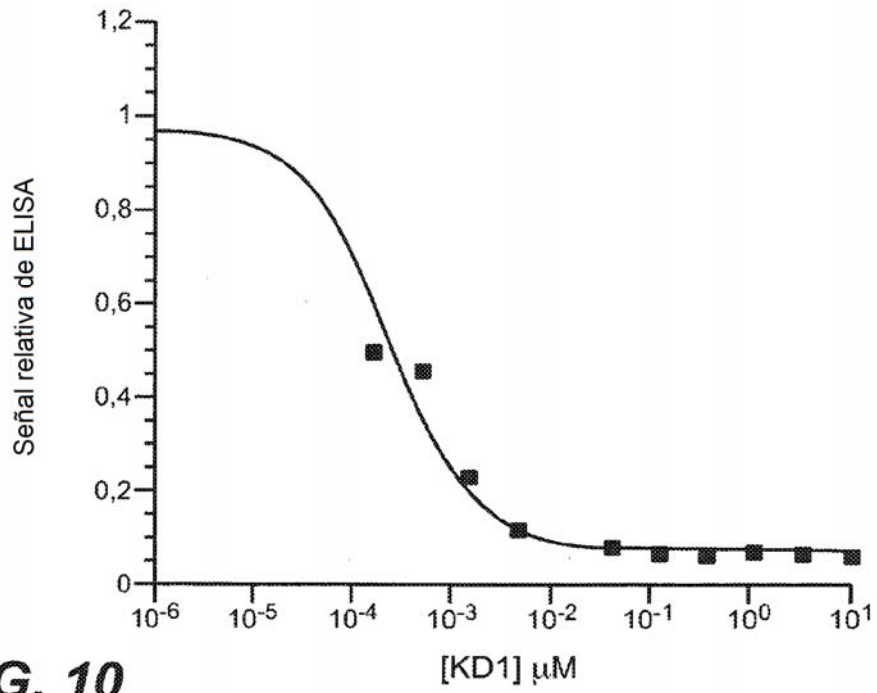


FIG. 10

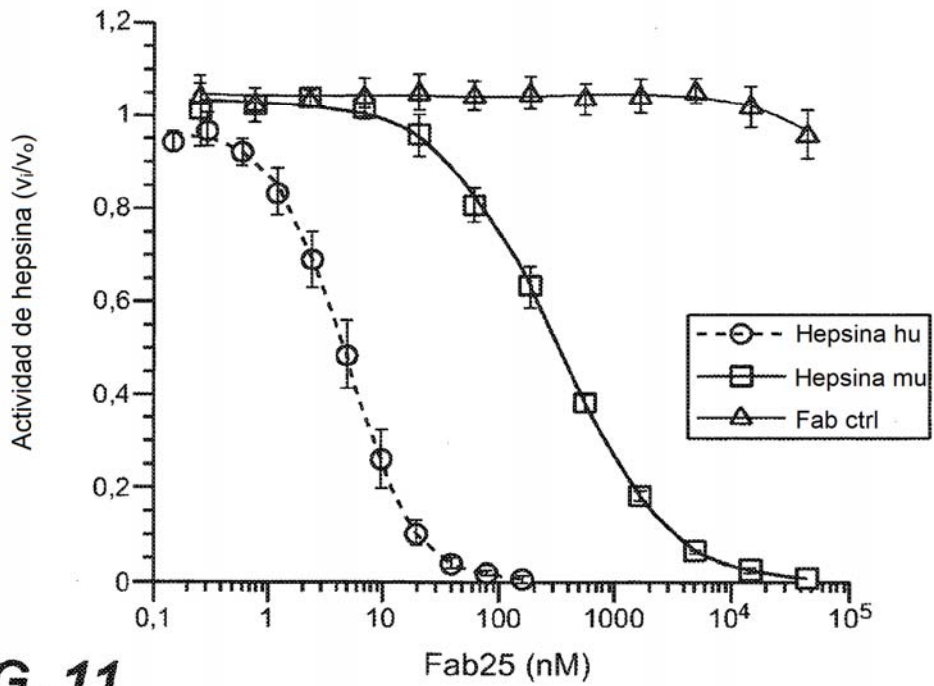


FIG. 11

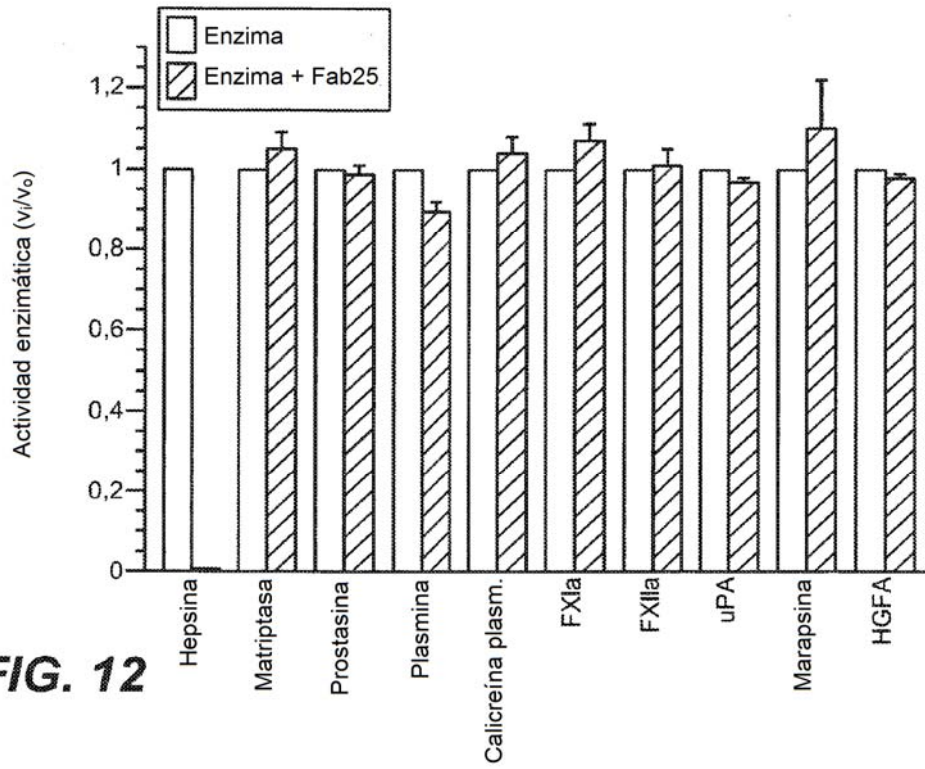


FIG. 12

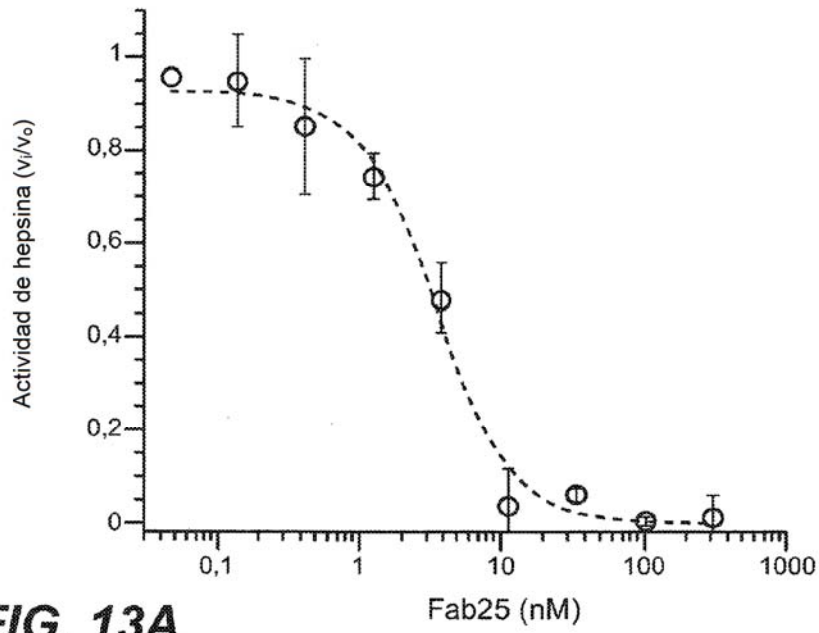
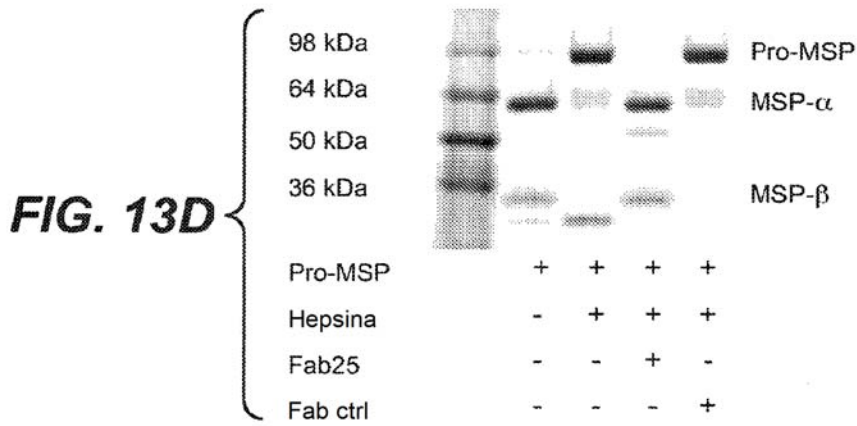
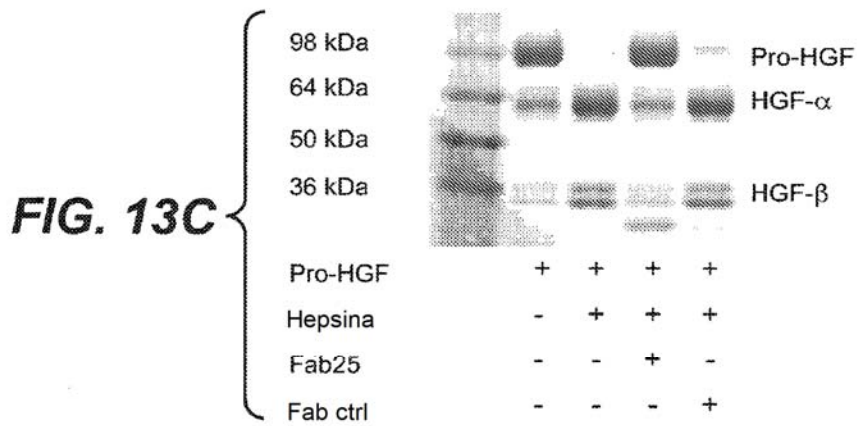
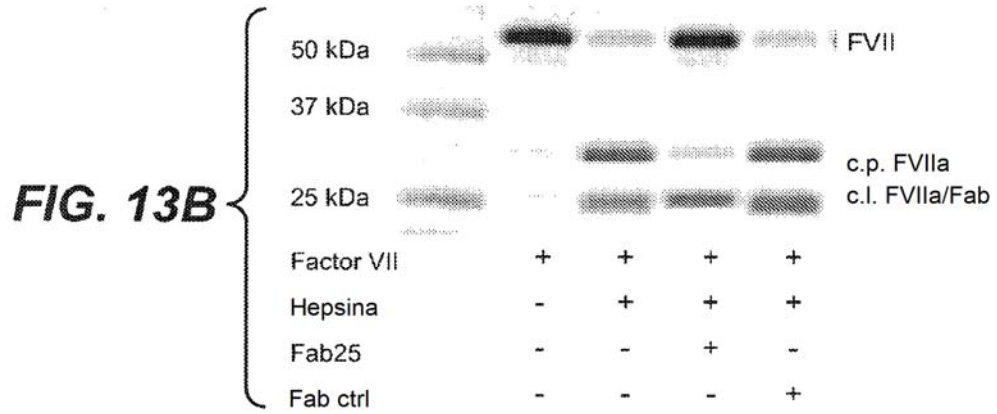
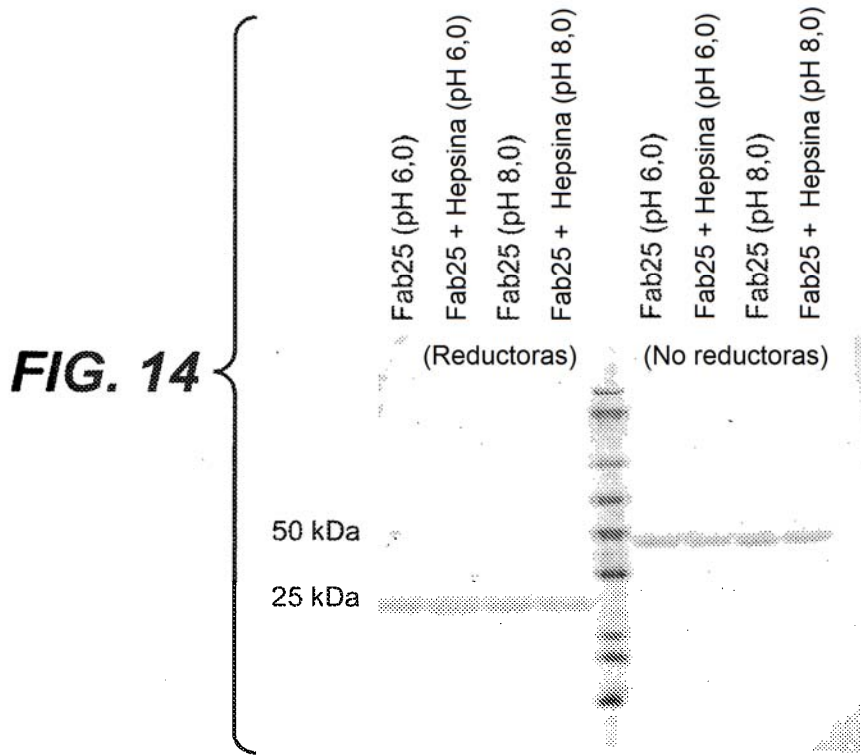


FIG. 13A





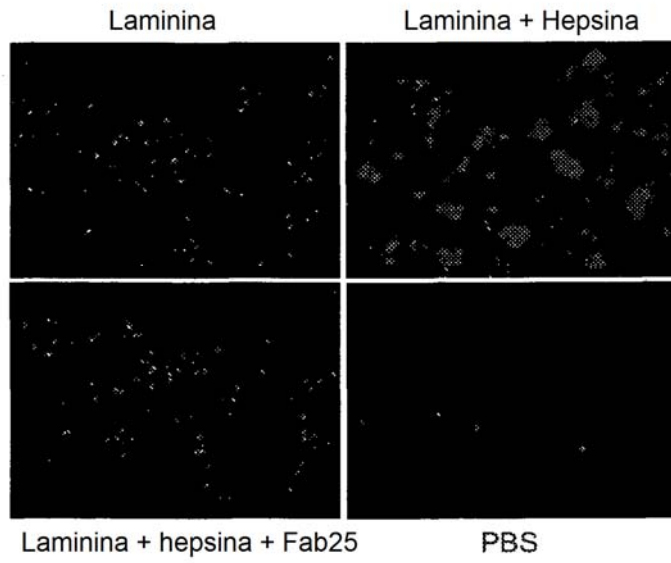


FIG. 15A

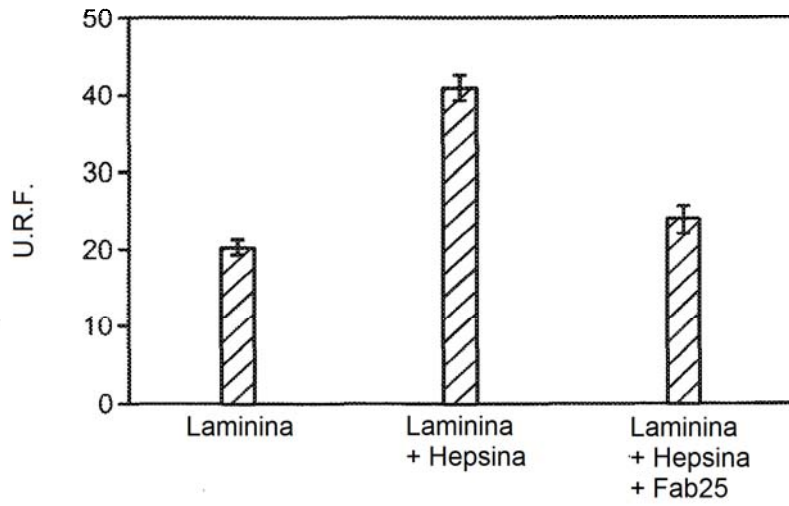
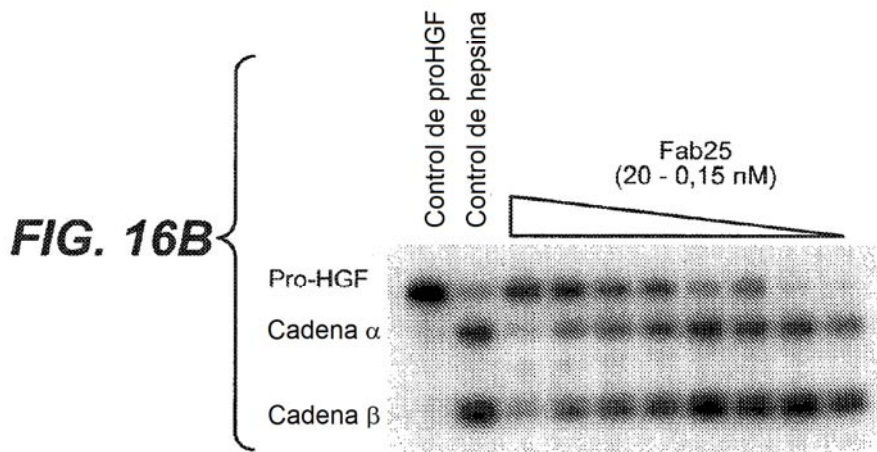
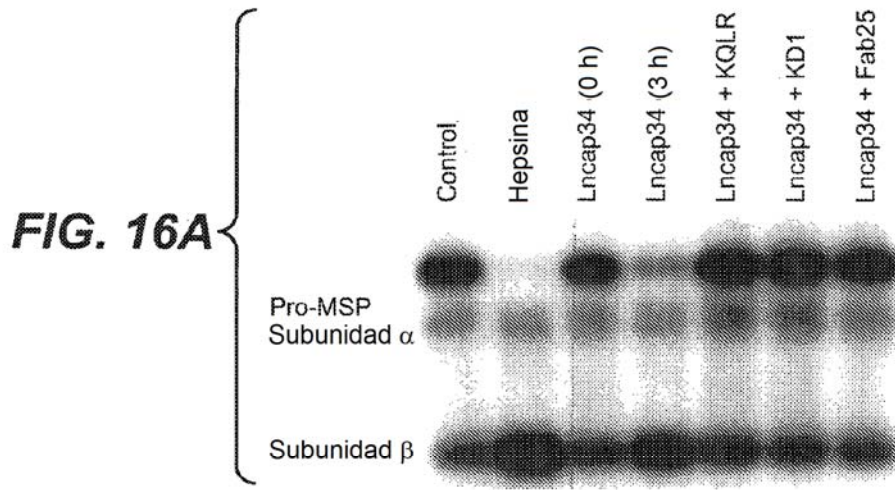


FIG. 15B



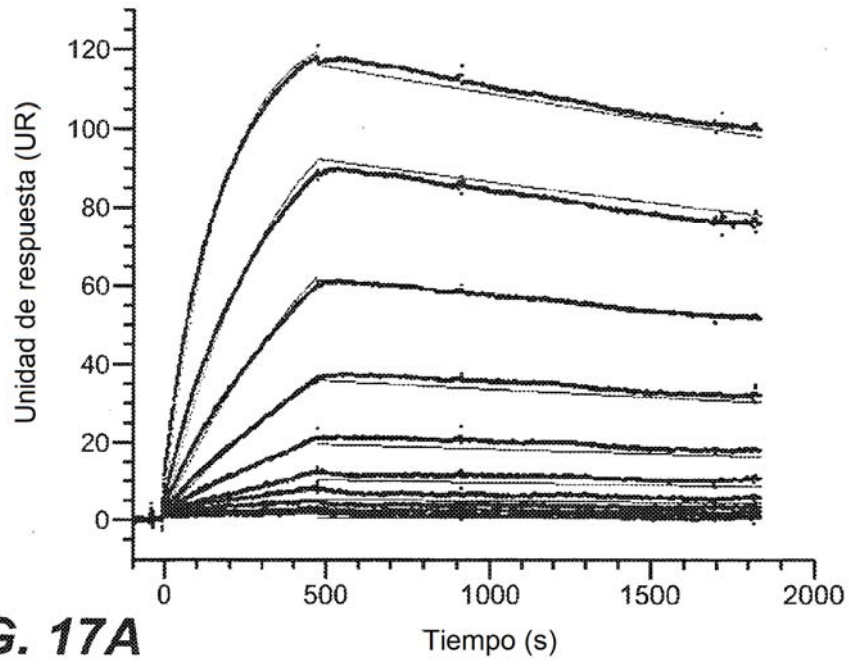


FIG. 17A

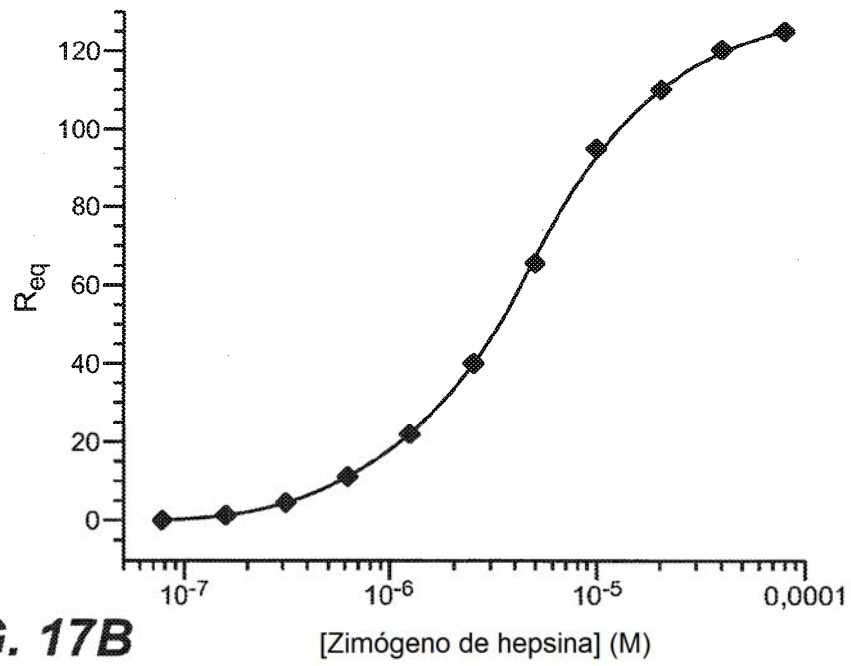


FIG. 17B

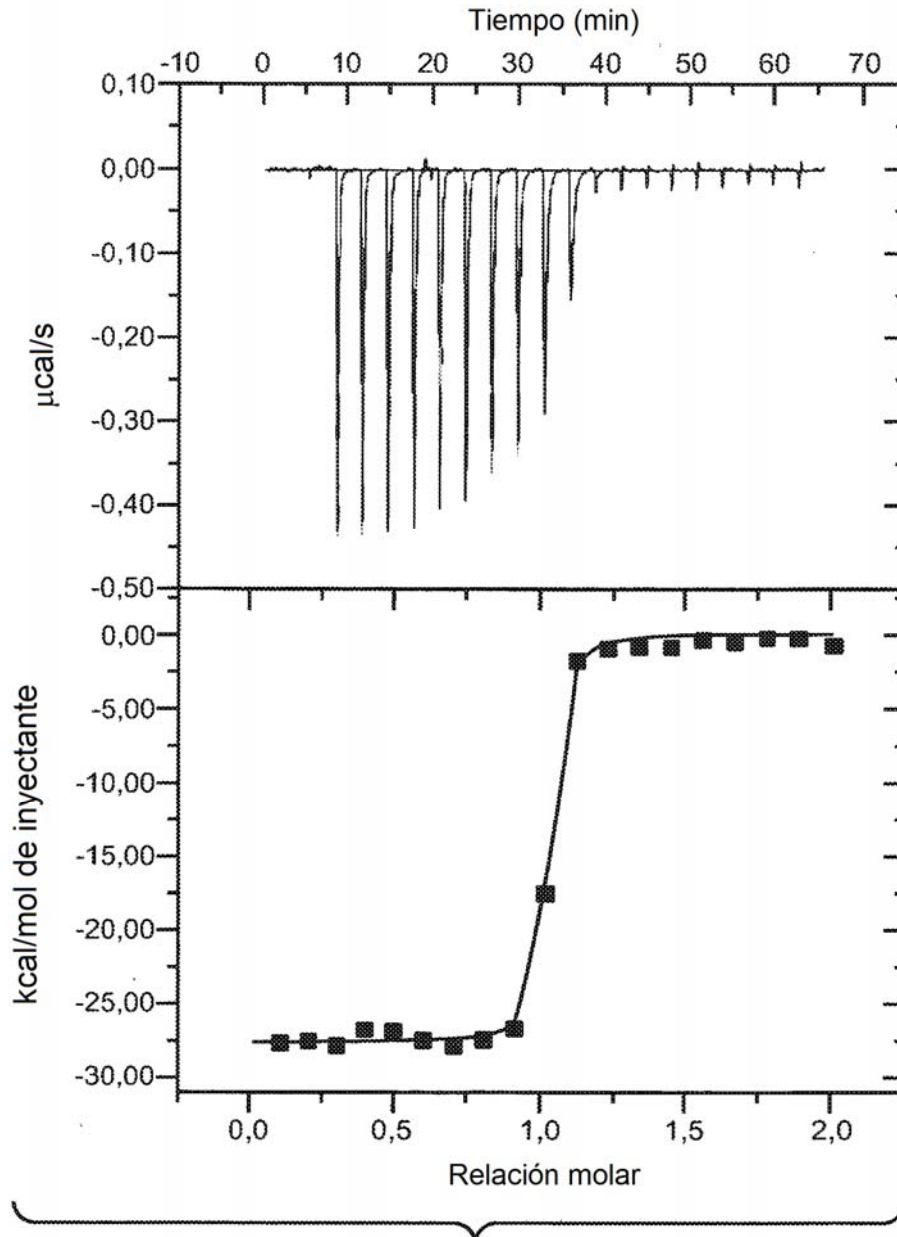


FIG. 18