

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 514**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 31/19 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.04.2004** **E 04758815 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015** **EP 1613269**

54 Título: **Composiciones, métodos y kits relacionados con la escisión de HER-2**

30 Prioridad:

04.04.2003 US 460678 P

22.05.2003 US 472494 P

22.12.2003 US 532030 P

01.03.2004 US 548986 P

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

09.06.2015

73 Titular/es:

INCYTE CORPORATION (100.0%)

**1801 Augustine Cut-Off
Wilmington, DE 19803, US**

72 Inventor/es:

FRIEDMAN, STEVEN M.;

SCHERLE, PEGGY A.;

LIU, XIANGDONG;

BURN, TIMOTHY C.;

HUBER, REID;

LIU, PHILLIP C. C.;

HOLLIS, GREGORY F.;

VADDI, KRISHNA y

FRIDMAN, JORDAN S.

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 537 514 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).

Composiciones, métodos y kits relacionados con la escisión de HER-2**Descripción****5 CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a composiciones, usos y kits basados en la escisión mediada por ADAM de Her-2. La presente invención también se refiere al uso de un inhibidor de ADAM o un anticuerpo anti-Her2 para su uso en el tratamiento de cáncer, y en particular, cáncer de mama, modulando la escisión mediada por ADAM de Her-2. Además, la invención se refiere a composiciones, usos y kits basados en el sorprendente efecto sinérgico entre la inhibición de la escisión de Her-2 por una ADAM y ciertos compuestos citostáticos (por ejemplo, Herceptin) y citotóxicos (por ejemplo, Taxol) en, entre otras cosas, inhibir la proliferación de células tumorales e inducir muerte celular. Adicionalmente, la divulgación se refiere a novedosas variantes de ADAM15, designadas variante 1 de ADAM15 y variante 2 de ADAM15, ahora identificadas y aisladas.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El oncogén HER-2/neu (erbB-2) codifica una tirosina cinasa de receptor (RTK) que se ha investigado ampliamente debido a su función en varios carcinomas humanos (Hynes y Stern, 1994, Biochim. et Biophys. Acta 1198:165-184; y Dougall y col., 1994, Oncogene 9:2109-2123) y en el desarrollo de mamíferos (Lee y col., 1995, Nature 378:394-398). Her-2 (también denominado "erbB2," "p185" o "c-neu") es un miembro de 185 kDa de la familia de tirosina cinasa de receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF). La secuencia de la proteína Her-2 se determinó a partir de un ADNc que se clonó por homología con el ARNm del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) de placenta (Coussens y col., 1985, Science 230:1132-1139) y de una línea de células de carcinoma gástrico (Yamamoto y col., 1986, Nature 319:230-234). El ARNm de HER-2 de longitud completa codifica una glucoproteína de transmembrana de 185 kDa en tejidos humanos normales y malignos (p185HER-2) (Hynes y Steen, 1994, Biochim. et Biophys. Acta 1198:165-184; y Dougall y col., 1994, Oncogene 9:2109-2123).

La función del gen HER-2 se ha examinado principalmente expresando el ADNc correspondiente al transcrito de 4,5 kb en células transfectadas y a partir de la estructura y propiedades bioquímicas del producto de proteína de 185 kDa. P185HER-2 consiste en un gran dominio extracelular, un segmento de transmembrana y un dominio intracelular con actividad de tirosina cinasa (Hynes y Stern, 1994, Biochim. et Biophys. Acta 1198:165-184; y Dougall y col., 1994, Oncogene 9:2109-2123). La expresión en exceso de p185HER-2 produce transformación fenotípica de células cultivadas (DiFiore y col., 1987, Science 237:178-182; y Hudziak y col., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7159-7163) y se ha asociado a progresión clínica agresiva de cáncer de mama y de ovario (Slamon y col., 1987, Science 235:177-182; y Slamon y col., 1989, Science 244:707-712).

p185HER-2 es altamente homólogo al EGFR. Sin embargo, todavía no se ha identificado un ligando que se una directamente con alta afinidad a p185HER-2. Además, la actividad de señalización de HER-2 puede mediar mediante la heterodimerización con otros miembros de unión a ligando de la familia de EGFR (Carraway y Cantley, Cell 78:5-8, 1994; Earp y col., 1995, Breast Cancer Res. Treat. 35:115-132; y Qian y col., 1995, Oncogene 10:211-219).

Se generan proteínas divergentes, que contienen regiones de los dominios extracelulares de las RTK de la familia de HER, mediante el procesamiento proteolítico de receptores de longitud completa (Lin y Clinton, 1991, Oncogene 6:639-643; Zabrecky y col., 1991, J. Biol. Chem. 266:1716-1720; Pupa y col., 1993, Oncogene 8:2917-2923; Vecchi y col., 1996, J. Biol. Chem. 271:18989-18995; y Vecchi y Carpenter, 1997, J. Cell Biol. 139:995-1003) y mediante el procesamiento de ARN alternativo (Petch y col., 1990, Mol. Cell. Biol. 10:2973-2982; Scott y col., 1993, Mol. Cell. Biol. 13:2247-2257; y Lee y Maihle, 1998, Oncogene 16:3243-3252).

El dominio extracelular de p185HER-2 (denominado en lo sucesivo "ECD") se elimina proteolíticamente de células de carcinoma de mama en cultivo (Petch y col., 1990, Mol. Cell. Biol. 10:2973-2982; Scott y col., 1993, Mol. Cell. Biol. 13:2247-2257; y Lee y Maihle, 1998, Oncogene 16:3243-3252) y se encuentra en el suero de algunos pacientes con cáncer (Leitzel y col., 1992, J. Clin. Oncol. 10:1436-1443) en los que puede ser un marcador de suero de cáncer de mama metastásico (Leitzel y col., 1992, J. Clin. Oncol. 10:1436-1443) y puede permitir el escape de tumores ricos en HER-2 de control inmunológico (Baselga y col., 1997, J. Clin. Oncol. 14:737-744, Brodowicz y col., 1997, Int. J. Cancer 73:875-879). Mientras que los niveles en suero de ECD de Her-2 eliminado se correlacionan con la masa tumoral, estudios adicionales han demostrado que los niveles en suero del ECD de Her-2 eliminado representan un marcador independiente del mal desenlace clínico en pacientes con cáncer de mama metastásico que expresa en exceso Her-2 (Ali y col., 2002, Clin. Chem. 48:1314-1320; Molina y col., 2002, Clin. Cancer Res. 8:347-353).

Un dominio extracelular truncado de HER-2 es también el producto de un transcrito alternativo de 2,3 kb generado por el uso de una señal de poliadenilación dentro de un intrón (Scott y col., 1993, Mol. Cell. Biol. 13:2247-2257). El transcrito alternativo se identificó primero en la línea de células de carcinoma gástrico MKN7 (Yamamoto y col., 1986, Nature 319:230-234; y Scott y col., 1993, Mol. Cell. Biol. 13:2247-2257) y el receptor truncado se localizó dentro del citoplasma perinuclear en vez de secretarse de estas células tumorales (Scott y col., 1993, Mol. Cell. Biol.

13:2247-2257). Sin embargo, no se ha atribuido utilidad terapéutica, de diagnóstico o de investigación particular a este polipéptido del dominio extracelular truncado. Se secreta un dominio extracelular truncado de EGFR, generado por corte y empalme alternativo (Petch y col., 1990, Mol. Cell. Biol. 10:2973-2982), presenta unión al ligando, además de propiedades de dimerización (Basu y col., 1989, Mol. Cell. Biol. 9:671-677), y puede tener un efecto negativo dominante sobre la función del receptor (Basu y col., 1989, Mol. Cell. Biol. 9:671-677; y Flickinger y col., 1992, Mol. Cell. Biol. 12:883-893).

También se ha identificado un producto alternativamente cortado y empalmado adicional de Her-2, designado herstatina (Doherty y col., 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. 96:10869-10874; Azios y col., 2001, Oncogene 20:5199-5209; Justman y Clinton, 2002, J. Biol. Chem. 277:20618-20624). Esta proteína consiste en los subdominios I y II del dominio extracelular, seguido de una secuencia del extremo C única codificada por el intrón 8. La herstatina es secretada y se une con afinidad nanomolar a miembros de la familia de EGFR. Parece que funciona de autoinhibidor rompiendo la dimerización del receptor y la fosforilación del receptor, produciendo la inhibición de la señalización de AKT y supresión de la proliferación en células que expresan en exceso EGFR o Her-2. Se mostró que la herstatina estaba presente a niveles reducidos en células tumorales que expresan en exceso Her-2, sugiriendo que si la herstatina desempeña una función en la regulación del crecimiento celular normal, esto se evita en células tumorales.

La señalización por la familia de receptores de EGF se inicia por la unión al ligando que desencadena la dimerización del homo- o hetero-receptor, fosforilación recíproca de tirosina de las colas citoplásmicas y activación de las rutas de transducción de señales intracelulares. La consecuencia biológica de la señalización de receptores de EGF está frecuentemente asociada a diferenciación, crecimiento o supervivencia celular.

La expresión en exceso de Her-2 se produce en el 25-30 % de los cánceres de mama. Los pacientes con tumores que expresan en exceso Her-2 tienen una evolución clínica claramente desfavorable, caracterizada por tiempo reducido hasta la reaparición de la enfermedad y supervivencia reducida. No se han establecido los mecanismos precisos responsables de esta asociación. A este respecto, se ha sugerido que el receptor de Her-2 expresado en exceso puede heterodimerizarse más fácilmente con otros miembros de la familia de receptores de EGF que tienen ligandos unidos, iniciando así las cascadas de señalización intracelulares que conducen al crecimiento y resistencia a la apoptosis. Alternativamente, el alto número de copias de receptores de Her-2 sobre la superficie de células tumorales puede promover la homodimerización de receptores independiente de ligando, y la señalización intracelular que conduce al crecimiento y supervivencia de células tumorales.

Otro mecanismo que puede explicar el mal desenlace clínico en tumores que expresan en exceso Her-2 se sugiere por la observación de que, en algunas células tumorales que expresan en exceso Her-2, el receptor es procesado por una metaloproteasa desconocida (o metaloproteínasa), dando un receptor asociado a la membrana truncado (algunas veces denominado una "punta" y también conocido como p95) y un dominio extracelular soluble (también conocido como ECD, ECD105 o p105).

Al igual que con otros miembros de la familia de receptores de EGF, la pérdida del dominio de unión a ligando extracelular convierte el dominio asociado a la membrana intracelular de Her-2 en una tirosina cinasa constitutivamente activa. Por tanto, se ha propuesto que el procesamiento del dominio extracelular de Her-2 crea un receptor constitutivamente activo que puede emitir directamente señales de crecimiento y de supervivencia a la célula cancerosa. A este respecto, se ha mostrado que una versión manipulada por ingeniería de Her-2, que carece del dominio extracelular, es 10-100 veces más eficaz que el receptor de longitud completa en ensayos de transformación celular.

Además, se ha mostrado que la forma truncada del receptor de Her-2 (p95) interacciona con y activa potentemente la señalización mediante el receptor de EGF (también denominado "Her-1"). Lo más convincente, los análisis inmunohistoquímicos de especímenes clínicos de cáncer de mama sugieren fuertemente que el mal desenlace clínico está más estrechamente asociado a la presencia del receptor de Her-2 truncado (p95) en vez de al receptor intacto (p185) en la célula tumoral como se ha tratado por Clinton (patente de EE.UU. nº 6.541.214).

Se ha demostrado que la familia de ADAM (Una Desintegrina y Metaloproteasa) cataliza la eliminación del ectodominio de la superficie celular de proteínas específicas (Moss y Lambert, 2002, Essays in Biochemistry 38:141-153; Chang y Werb, 2001, Trends in Cell Biology 11:537-543, Seals y Courtneidge, 2003, Genes and Development 17:7-30). La estructura de dominio de los miembros de la familia de ADAM pone extracelularmente el dominio catalítico de proteasa de estas proteínas de membrana de tipo I. Desde el extremo amino de la proteína, los dominios incluyen un pro-dominio, dominio catalítico, dominio de desintegrina, región rica en cisteína y repetición de EGF, seguido del dominio transmembrana y la cola citoplásmica. El pro-dominio se procesa para formar la forma proteolíticamente activa madura. El dominio de desintegrina puede participar en la adhesión o reconocimiento del sustrato y unión.

ADAM10 fue el primer miembro de la familia de ADAM que se mostró que tenía actividad proteolítica. Se ha demostrado que escinde proteínas tales como APP y Notch, además de otras proteínas de la superficie celular. De interés, los sustratos para ADAM10 incluyen HB-EGF, un miembro de la familia del factor de crecimiento epidérmico,

que es importante en la transformación y mitogénesis de la célula. La escisión del dominio extracelular de HB-EGF conduce a la generación de un fragmento soluble de HB-EGF, que se une a y activa el receptor de EGF. También se ha demostrado que ADAM 15 es una proteasa activa y se ha mostrado que degrada tanto colágeno de tipo IV como gelatina. Además, se ha mostrado que ADAM15 participa activamente en la unión a integrinas, que incluyen alfa5beta y alfavbeta3, mediante su dominio de desintegrina.

En células que expresan en exceso Her-2, se había encontrado que Her-2 experimentaba escisión para formar p95 en presencia de acetato 4-aminofenilmercúrico (APMA), un activador de metaloproteasas muy conocido (Molina y col., 2001, Cancer Res. 61:4744-4749). Se encontró que la escisión mediada por APMA de Her-2 para formar p95 se inhibía en las mismas células en presencia de batimastat, un inhibidor de metaloproteasas de amplio espectro. Adicionalmente, se ha mostrado que Herceptin™ (también denominado trastuzumab), un anticuerpo monoclonal anti-Her-2 que ha mostrado eficacia clínica en cáncer de mama que expresa en exceso Her-2, inhibe la escisión enzimática de Her-2 intacto (p185) en una porción del ECD y la porción asociada a membrana de la cinasa constitutivamente activa p95 *in vitro*. Se ha sugerido que este efecto inhibidor de la escisión de Herceptin™ puede mediarse por la unión al anticuerpo cerca del sitio de corte enzimático, interfiriendo así con la interacción de escisión enzima-sustrato mediante impedimento estérico. Sin embargo, sigue sin estar claro el mecanismo por el que Herceptin actúa en el cuerpo (por ejemplo, *in vivo*). Los estudios han mostrado que Herceptin parece tener múltiples funciones celulares que sirven para inhibir la señalización oncogénica de Her-2 mediante diferentes mecanismos (véase, por ejemplo, Baselga, y col., Seminars in Oncology, 2001, 28(5), supl. 16, pp 4-11 y Baselga y col., Annals of Oncology, 2001, 12, supl. 1, pp S35-S41). Aunque algunos estudios proponen que al menos uno de los mecanismos de acción de Herceptin está relacionado con la inhibición de la eliminación de Her-2, otros estudios, en realidad, muestran que la eliminación continúa produciéndose en pacientes tratados con el anticuerpo (Pegram y col., Journal of Clinical Oncology, 1998, 16(8), 2659-2671).

A pesar de la prevalencia, morbilidad y mortalidad asociada al cáncer de mama, y otros tumores malignos que expresan en exceso Her-2, hay pocas terapias eficaces, si hay alguna, para estas enfermedades y trastornos. Así, hay una necesidad acuciante de tratamientos y agentes terapéuticos para cánceres de mama que expresan en exceso Her-2, y otros, y la presente invención satisface estas y otras necesidades.

RESUMEN DE LA INVENCION

La invención proporciona un compuesto que es un inhibidor de ADAM o un anticuerpo anti-Her2 para su uso en un método para tratar cáncer, en el que dicho cáncer expresa en exceso Her-2, y en el que el tratamiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-Her2 y el inhibidor de ADAM, en el que el inhibidor de ADAM es un inhibidor de metaloproteinasa que inhibe la escisión de Her-2 *in vivo*.

La invención proporciona además el uso de un compuesto en la fabricación de un medicamento para tratar cáncer, en el que dicho cáncer expresa en exceso Her-2, en el que el tratamiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de ADAM que es un inhibidor de metaloproteinasa que inhibe la escisión de Her-2 *in vivo* y un anticuerpo anti-Her2, en el que dicho compuesto es el inhibidor de ADAM o el anticuerpo anti-Her2.

La invención también proporciona una composición que comprende una cantidad inhibidora de la escisión sinérgica de Her-2 de un inhibidor de metaloproteinasa, en el que dicho inhibidor de metaloproteinasa inhibe la actividad de una ADAM, comprendiendo dicha composición además una cantidad inhibidora de la escisión sinérgica de Her-2 de un anticuerpo antagonista de Her-2, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La invención también proporciona un kit para inhibir la escisión de Her-2, comprendiendo dicho kit una cantidad inhibidora de la escisión sinérgica de Her-2 de un inhibidor de metaloproteinasa, en el que dicho inhibidor de metaloproteinasa inhibe la actividad de una ADAM, comprendiendo dicho kit además una cantidad inhibidora de la escisión sinérgica de Her-2 de un anticuerpo antagonista de Her-2, y un aplicador y un material de instrucciones para el uso del mismo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Con el fin de ilustrar la invención, se representan en los dibujos ciertas realizaciones de la invención. Sin embargo, la invención no se limita a las disposiciones e instrumentalidades precisas de las realizaciones representadas en los dibujos.

La Figura 1 representa un resumen de los 23 genes de la familia de ADAM humana. Aquellos que codifican proteína funcional se indican con un "+" en la columna 1. ADAM1 y ADAM3 humanos son pseudogenes y no codifican proteínas funcionales, esto se indica con un "-" en la tabla. ADAM20 carece de intrones en la región codificante de la proteína ADAM20, revelando un análisis de las secuencias genómicas y de ADNc de dominio público para ADAM20 que el marco de lectura abierto extiende el extremo N de la metionina de iniciación consenso y contiene 50 residuos del extremo N que carecen de un péptido señal. Basándose en este análisis, ADAM20 puede codificar una ADAM no funcional y se (indica con "+/-"). Doce miembros de la familia de ADAM

humana contienen secuencias consenso para los sitios activos de metaloproteasas (HEXGHXXGXXHD) y se indican con un “+” en la columna tres. De estos, siete se expresaron a algún grado en las cuatro líneas celulares de eliminación (indicados con un “+” en la columna cuatro), mientras que cuatro no se expresaron en al menos una línea celular de eliminación de HER2 (indicado con un “-”). La lista final de candidatos a convertasa de HER2 se indica con un “+” en la columna cinco. ADAM17 se excluyó como candidato (“-”) ya que estudios previos sugirieron que no era la convertasa de HER2 (Rio y col., 2002, J. Biol. Chem. 275:10379-10387). La estructura genómica de ADAM20 la hizo un candidato menos probable (“+/-”).

La Figura 2 expone las secuencias de cebadores y sondas de PCR en tiempo real usados para evaluar niveles de expresión de los miembros de la familia de ADAM en líneas celulares que eliminan Her-2.

La Figura 3 representa el análisis de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) de la expresión de diversas proteínas ADAM en las líneas celulares que eliminan Her-2 BT474, SKOV3, SKBR3, MDA y T47D. El grado de eliminación de Her-2 por cada línea celular se indica por una o una serie de más marcas “+” encima del nombre de la línea celular, indicando un mayor número de marcas más un mayor grado de eliminación de Her-2 detectable. La eliminación de Her-2 se evaluó por detección del ectodominio (ECD) en medio acondicionado usando ELISA como que ha descrito más completamente en cualquier parte. La expresión de un ARNm de ADAM particular detectado en una línea celular se indica por un “+”, mientras que un “-” indica ausencia de expresión en una línea celular.

La Figura 4A es una imagen de un gel que representa el nivel de proteína ADAM10 en una célula tras el silenciamiento usando ARNip. La imagen representa una imagen de una transferencia Western que demuestra una reducción en ADAM10 detectada en presencia de un ARNip de ADAM10 en comparación con el nivel de ADAM10 en una célula en ausencia de ARNip de ADAM10 (indicado como “Vector vacío” a la izquierda del gel). Los datos demuestran adicionalmente que el nivel de ADAM9 no se afectó detectablemente por ARNip de ADAM10, demostrando que el efecto fue específico para la ADAM elegida como diana por el ARNip particular. La posición de una banda de 98 kD y patrones de peso molecular de 64 kD se muestran a la izquierda.

La Figura 4B es una imagen de un gel que representa un análisis de transferencia Western. Los datos desvelados demuestran que el nivel de ADAM9 disminuyó aproximadamente el 75 % en comparación con el nivel de ADAM9 en ausencia de ARNip de ADAM9. Los datos demuestran adicionalmente que el efecto fue específico para el ARNip usado porque la imagen representa que ARNip de ADAM10 no afectó detectablemente el nivel de ADAM9 (tres carriles a la derecha de la figura). La posición de una banda de 98 kD y patrones de peso molecular de 64 kD se muestran a la izquierda.

La Figura 4C es una imagen de un gel que representa un análisis de transferencia Western. La flecha indica la posición de ADAM15, representando la banda superior en la transferencia una proteína que reacciona con el anticuerpo para ADAM15 no específicamente. La imagen representa que el nivel de ADAM15 disminuyó aproximadamente el 75 % en células tratadas con ARNip de ADAM15 (carriles indicados por “15” en la parte superior de la figura) en comparación con el nivel de ADAM15 en ausencia de ARNip (carriles indicados por “control”). Los datos demuestran adicionalmente que el efecto fue específico para el ARNip porque la imagen representa que ARNip de ADAM8 (carril marcado “8”), ARNip de ADAM9 (carril marcado “9”), ARNip de ADAM10 (carril marcado “10”), ARNip de ADAM33 (carril marcado “33”) no afectó detectablemente el nivel de ADAM15. La posición de una banda de 98 kD y patrones de peso molecular de 64 kD se indican a lo largo del lado izquierdo de la imagen.

La Figura 4D es una imagen de un gel que representa un análisis de transferencia Western. La flecha indica la posición de ADAM17, representando la banda inferior una proteína que reacciona con el anticuerpo para ADAM17 no específicamente. Los datos desvelados demuestran que el nivel de ADAM17 se redujo aproximadamente el 90 % en células tratadas con ARNip de ADAM17 (carriles indicados por “17” en la parte superior de la figura) en comparación con el nivel de ADAM17 en ausencia de ARNip (carriles indicados por “control”). Los datos demuestran adicionalmente que el efecto fue específico para el ARNip usado porque la administración de ARNip contra ADAM9, 10 y 15 (carriles indicados por “9”, “10” y “15”, respectivamente) a células no alteró detectablemente el nivel de ADAM17 en aquellas células.

La Figura 5A es un gráfico de barras que representa el efecto de un ARNip para una ADAM en el nivel de eliminación de Her-2 como se evalúa detectando el ectodominio eliminado en medio de células BT474 acondicionado usando ensayo de detección de ELISA. Se evaluó la eliminación del ectodominio en medio acondicionado obtenido de células BT474 en presencia de ARNip para ADAM8, ADAM9, ADAM10, ADAM15 y ADAM33 y los datos demuestran aproximadamente el 50-70 % de reducción en la eliminación de Her-2 en células en presencia de ARNip de ADAM10 mientras que la eliminación de Her-2 no se afectó detectablemente por los otros ARNip, excepto por ARNip de ADAM15, que disminuyó la eliminación de Her-2 aproximadamente el 10 % en comparación con células de control transfectadas con vector vacío.

La Figura 5B es un gráfico de barras que representa el nivel de eliminación de Her-2 (como se mide por la liberación del ectodominio en medio acondicionado) de células SKBR3 en presencia de ARNip para ADAM8, ADAM9, ADAM10 y ADAM15. Los datos demuestran que el ARNip de ADAM10 disminuyó el nivel de eliminación de Her-2 aproximadamente el 50-70 %, mientras que el ARNip de ADAM15 redujo la eliminación aproximadamente el 25-30 % en comparación con la eliminación de Her-2 por células SKBR3 en ausencia de ARNip (es decir, células “transfectadas con vector vacío”). Los datos muestran adicionalmente que los ARNip para ADAM8, ADAM9 y ADAM33 no tuvieron efecto detectable sobre la eliminación de HER2.

La Figura 6 es una gráfica que representa la ausencia de correlación entre la inhibición de convertasa y la inhibición de MMP2 usando 498 compuestos. La figura expone una representación logarítmica de los valores de CI_{50} de diversos compuestos para la inhibición de MMP2 frente a los valores de CI_{50} de los mismos

compuestos para la inhibición de la actividad de convertasa de Her-2. Los puntos que se encuentran fuera de las líneas paralelas superior e inferior son más de 10 veces divergentes de la curva de correlación ideal (línea central).

La Figura 7 es una gráfica que representa la ausencia de correlación entre la inhibición de convertasa y la inhibición de MMP12 usando más de 500 compuestos. El gráfico expone una representación logarítmica de los valores de CI_{50} de diversos compuestos para la inhibición de MMP12 frente a los valores de CI_{50} de los mismos compuestos para la inhibición de la actividad de convertasa de Her-2. Los puntos que se encuentran fuera de las líneas paralelas superior e inferior son más de 10 veces divergentes de la curva de correlación ideal (línea central).

La Figura 8 es una gráfica que representa la ausencia de correlación entre la inhibición de convertasa y la inhibición de TACE (ADAM17) usando más de 500 compuestos. La figura expone una gráfica que representa una representación logarítmica de los valores de CI_{50} de diversos compuestos para la inhibición de TACE (ADAM17) frente a los valores de CI_{50} de los mismos compuestos para la inhibición de la actividad de convertasa de Her-2. Los puntos que se encuentran fuera de las líneas paralelas superior e inferior son más de 10 veces divergentes de la curva de correlación ideal (línea central).

La Figura 9 es una gráfica que representa la ausencia de correlación entre la inhibición de convertasa y la inhibición de ADAM9 usando 42 compuestos. La figura expone una gráfica que representa una representación logarítmica de los valores de CI_{50} de diversos compuestos para la inhibición de ADAM9 frente a los valores de CI_{50} de los mismos compuestos para la inhibición de la actividad de convertasa de Her-2. Los puntos que se encuentran fuera de las líneas paralelas superior e inferior son más de 10 veces divergentes de la curva de correlación ideal (línea central).

La Figura 10 es una gráfica que representa la fuerte correlación entre la inhibición de convertasa y la inhibición de ADAM10 usando más de 500 compuestos. La figura expone una gráfica que representa una representación logarítmica de los valores de CI_{50} de diversos compuestos para la inhibición de ADAM10 frente a los valores de CI_{50} de los mismos compuestos para la inhibición de la actividad de convertasa de Her-2. Los puntos que se encuentran fuera de las líneas paralelas superior e inferior son más de 10 veces divergentes de la curva de correlación ideal (línea central).

La Figura 11 es un esquema que representa el corte y empalme alternativo en el gen ADAM15 humano. Los recuadros indican exones con líneas que muestran la posición de intrones. El patrón de corte y empalme de la secuencia humana publicada se muestra arriba justo encima de la estructura de exón/intrón del genoma. Las dos variantes alternativamente cortadas y empalmadas se muestran debajo de la estructura genómica con recuadros sin sombra que delimitan exones alternativamente cortados y empalmados.

Las Figuras 12A-1 y 12A-2 exponen la secuencia de ácidos nucleicos de ADAM10 humana (SEC ID N°: 5).

La Figura 12B expone la secuencia de aminoácidos de ADAM10 humana (SEC ID N°: 6).

Las Figuras 13A-1 y 13A-2 exponen la secuencia de ácidos nucleicos de la novedosa variante 1 humana de ADAM15 (SEC ID N°: 1). Esta variante es la variante de ADAM15 más abundante detectada en las líneas celulares examinadas como se describe en cualquier parte.

La Figura 13B expone la secuencia de aminoácidos de la novedosa variante 1 humana de ADAM15 (SEC ID N°: 2).

Las Figuras 14A-1 y 14A-2 exponen la secuencia de ácidos nucleicos de la novedosa variante 2 humana de ADAM15 (SEC ID N°: 3), que es la forma más larga.

La Figura 14B expone la secuencia de aminoácidos de la novedosa variante 2 humana de ADAM 15 (SEC ID N°: 4).

La Figura 15 es una gráfica que representa la inhibición de la escisión de Her-2 por un MPI representativo (compuesto 4) en células BT-474 que expresan en exceso Her-2.

La Figura 16 es una imagen de una transferencia Western que representa la inhibición de la escisión de Her-2 en células BT-474 (panel superior) y en células SK-BR3 (panel inferior) a concentraciones variables del MPI el compuesto 4. Ambas líneas celulares expresan en exceso Her-2. La transferencia Western evaluó la presencia de una proteína de aproximadamente 105 kDa, el tamaño de ECD de Her-2 en sobrenadantes de cultivo y confirmó los resultados de ELISA indicados a la derecha de cada panel.

La Figura 17 es una gráfica que representa la inhibición de la escisión de Her-2 por un MPI representativo (compuesto 4) en una línea celular de tumor de mama primario que expresa en exceso Her-2.

La Figura 18 es un diagrama que representa que a las concentraciones indicadas, el inhibidor selectivo de la convertasa de Her-2 el compuesto 5 potencia sinérgicamente la actividad antiproliferativa de una dosis inferior a la óptima de Herceptin™ en células BT474 que expresan en exceso Her-2 (panel superior), pero no en células MCF7 que no expresan en exceso Her-2 (panel inferior). Compuesto 5: CI_{50} de convertasa de Her-2 (198-250 nM), CI_{50} de ADAM10 (98 nM), CI_{50} de MMP12 (584 nM), MMP2 (inactiva) y MMP3 (inactiva).

La Figura 19 es un diagrama que representa que a las concentraciones indicadas, el inhibidor inactivo de convertasa de Her-2 el compuesto 6 (pero activo para MMP) no potencia la actividad antiproliferativa de una dosis inferior a la óptima de Herceptin™ en tanto células BT474 que expresan en exceso Her-2 (panel superior) como MCF7 que no expresan en exceso Her-2 (panel inferior). Compuesto 6: convertasa de Her-2 (inactiva), CI_{50} de MMP12 (1,95 nM), CI_{50} de MMP2 (0,65 nM).

La Figura 20 es una imagen de un gel que representa la inhibición sinérgica de la fosforilación por ERK (panel superior) y AKT (panel inferior) en células BT474 que expresan en exceso Her-2 por Herceptin y el MPI el compuesto 4, a las concentraciones indicadas.

La Figura 21 es una imagen de una transferencia Western que representa la inhibición de la escisión de Her-2

en células BT-474 a concentraciones variables de un MPI representativo (compuesto 4) solo, Herceptin solo o MPI en combinación con Herceptin. La transferencia Western evaluó la presencia de una proteína de aproximadamente 105 kDa, el tamaño del ECD de Her-2 en sobrenadantes de cultivo y demuestra un efecto aditivo de Herceptin y el MPI en bloquear la escisión de Her-2.

La Figura 22 es una gráfica que representa que un inhibidor MP de amplia especificidad, el compuesto 7, potencia sinérgicamente la actividad antiproliferativa de una dosis inferior a la óptima de Herceptin™ en células BT474 que expresan en exceso Her-2. Se ha detectado potenciamiento sinérgico cuando las células se tratan con dosis inferiores a las óptimas de Herceptin™ que oscilan de 0,067 a 5 µg/ml y una dosis eficaz (1 µM) del compuesto 7. Compuesto 7: CI_{50} de convertasa de Her-2 (20-100 nM).

La Figura 23 es una gráfica que representa que, a las concentraciones indicadas las combinaciones del compuesto 7 y Herceptin™ potencian significativamente la actividad antitumoral de Taxol™ en células BT474 que expresan en exceso Her-2. También se detectó potenciamiento significativo en estudios similares en los que Taxol™ se substituyó con otros agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, Cisplatino™), además de en otras líneas celulares de cáncer de mama que expresan en exceso Her-2 (por ejemplo, SKBR3). Compuesto 7: CI_{50} de convertasa de Her-2 (20-100 nM).

La Figura 24 es una gráfica que representa que, a las concentraciones indicadas, las combinaciones del compuesto 7 y Herceptin™ no tienen efecto sobre la actividad antitumoral de Taxol™ en células MCF7 que no expresan en exceso Her-2. Similarmente, no se detectó efecto en estudios similares en los que Taxol™ se substituyó con otros agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, Cisplatino™) en células MCF7.

La Figura 25 es una gráfica que representa que, a las concentraciones indicadas, las combinaciones del compuesto 7 y Herceptin™ potencian significativamente la apoptosis que induce Taxol™ de células BT474 que expresan en exceso Her-2. El elevado nivel de apoptosis también se detectó en estudios similares en los que Taxol™ se substituyó con otros agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, cisplatino) en células BT474, además de en otras líneas celulares de cáncer de mama que expresan en exceso Her-2 (por ejemplo, SKBR3), pero no en células MCF7, que no expresan en exceso Her-2. Compuesto 7: CI_{50} de convertasa de Her-2 (20-100 nM).

La Figura 26 es una gráfica que representa que, a las concentraciones indicadas, las combinaciones del compuesto 7 y Herceptin™ potencian la actividad antiproliferativa de Iressa™ en células BT474 que expresan en exceso Her-2. No se ha detectado actividad antiproliferativa potenciada de Iressa™ en células MCF7 que no expresan en exceso Her-2. Iressa™ es un inhibidor de cinasas de molécula pequeña sintético que inhibe selectivamente el receptor 1 del factor de crecimiento epidérmico. Compuesto 7: CI_{50} de convertasa (20-100 nM).

La Figura 27A presenta datos gráficos que muestran que el compuesto 2 reduce eficazmente la eliminación de Her-2 en ratones que llevan el tumor BT-474-SC1.

La Figura 27B proporciona una comparación estadística de grupos de ratones que llevan el tumor BT-474-SC1 tratados con vehículo y con el compuesto 2 que muestran que el compuesto 2 redujo los niveles de ECD de Her-2.

La Figura 28A presenta datos gráficos que muestran que el compuesto 2 reduce eficazmente el volumen del tumor en ratones que llevan el tumor BT-474-SC1.

La Figura 28B proporciona una comparación estadística de grupos de ratones que llevan el tumor BT-474-SC1 tratados con vehículo y con el compuesto 2 que muestran que el compuesto 2 redujo el volumen del tumor.

La Figura 29 muestra la reducción del volumen del tumor en ratones que llevan el tumor BT-474-SC1 para Herceptin y el compuesto 3 en comparación con el control de vehículo.

La Figura 30A muestra tejido tumoral teñido con anticuerpos para Ki67 (superior) o Akt fosforilada (inferior), marcador para proliferación celular.

La Figura 30B muestra inmunotransferencias para cantidades iguales de Akt fosforilada o Akt total en muestras de tejido de tumor tratadas con tanto vehículo como el compuesto 2.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención se refiere al novedoso hallazgo de que los polipéptidos ADAM que incluyen, por ejemplo, ADAM10 y ADAM15, escinden el receptor de Her-2 para producir p95, liberando simultáneamente un dominio extracelular soluble, ECD105 (también denominado en el presente documento el "ectodominio"), del receptor de Her-2. p95 es un receptor asociado a membrana truncado que, tras la producción, se vuelve constitutivamente activo.

La presente invención proporciona un avance porque los datos desvelados en el presente documento demuestran que ADAM10 y ADAM15 median en la escisión de Her-2 para producir un ECD y una porción de punta de p95. Además, la presente invención se refiere a métodos para inhibir específicamente la escisión de Her-2 usando una amplia plétora de inhibidores de la escisión, que incluyen un anticuerpo específico para Her-2 (10, 15, o ambos), y un inhibidor de metaloproteína (o metaloproteasa) [MPI] específico o selectivo para ADAM (por ejemplo, ADAM10, ADAM15, o ambos). Esto es porque, como se apreciaría por el experto basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, la identificación de ADAM10 y ADAM15, como enzimas que participan en la escisión de Her-2 y la producción asociada de p95, proporciona una plétora de enfoques para el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección mediada por la escisión de Her-2 en una célula, un tejido, o un paciente en necesidad de tal tratamiento.

Además, la presente divulgación se refiere a ácidos nucleicos y proteínas relacionadas con ADAM10, ADAM15 y

Her-2, que incluyen ADN, ARN, vectores, células huésped, péptidos y enzimas. Más específicamente, la presente divulgación se refiere a inhibidores de la escisión de Her-2, que incluyen, pero no se limitan a, ARNip, MPI y similares, ya que estos inhibidores serían útiles en inhibir el crecimiento, inducir la muerte, o ambos, de una célula que expresa en exceso Her-2 en la que tal célula participaba o mediaba en una enfermedad, trastorno o afección en un ser humano.

La presente invención se refiere además al novedoso hallazgo de que un inhibidor de la metaloproteasa (MPI) que inhibe la escisión de Her-2, cuando se combina con un agente citostático que antagoniza el crecimiento celular mediado por Her-2, tal como un anticuerpo para Her-2, como se ejemplifica por Herceptin™, proporciona un efecto sinérgico que inhibe el crecimiento de una célula tumoral que expresa en exceso Her-2. Además, cuando la célula tumoral que expresa en exceso Her-2 se pone adicionalmente en contacto con un agente citotóxico, tal como, pero no se limita a, Taxol™, y/o un inhibidor de un miembro de la familia de tirosina cinasa de receptor del factor de crecimiento epidérmico (tal como, pero no se limita a, Iressa™), el efecto sinérgico potencia la destrucción de la célula tumoral que expresa en exceso Her-2 o la inhibición del crecimiento de la célula tumoral, respectivamente. Así, la presente invención proporciona novedosos métodos sinérgicos y composiciones para inhibir el crecimiento de y/o mediar en la muerte de células tumorales que expresan en exceso Her-2.

Definiciones

Como se usa en el presente documento, cada uno de los siguiente términos tiene el significado asociados a él en esta sección.

Los artículos “un” y “una” se usan en el presente documento para referirse a uno o a más de uno (es decir, al menos uno) del sujeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, “un elemento” significa un elemento o más de un elemento.

Como se usa en el presente documento, para “aliviar” una enfermedad significa reducir la gravedad de uno o más síntomas de la enfermedad.

Por el término “anticuerpo antagonista”, como el término usado en el presente documento, se indica un anticuerpo que se une específicamente a Her-2, mediando así en la inhibición detectable del crecimiento de una célula tumoral que expresa en exceso Her-2. Se entendería que tal anticuerpo puede considerarse un “agonista” en ciertos aspectos en los que también puede, pero no necesita, mediar en, entre otras cosas, la fosforilación detectable del receptor de Her-2 y/o afectar un proceso asociado a tal fosforilación y/o señalización mediante el receptor.

“Inhibidor de ADAM”, como se usa en el presente documento, significa cualquier compuesto o sustancia, tanto una proteína, ácido nucleico, molécula pequeña, como similares, que reduce detectablemente la escisión de Her-2 (como se evalúa detectando la producción de ECD, p95, o ambos, por una amplia plétora de métodos) en comparación con la escisión de Her-2 en ausencia del compuesto. La evaluación de la escisión de Her-2 puede realizarse por cualquier método para detectar ECD, p95, o ambos, como se conoce en la técnica, como se desvela en el presente documento, y/o como se desarrollará en el futuro.

“Antisentido” se refiere particularmente a la secuencia de ácidos nucleicos de la hebra no codificante de una molécula de ADN bicatenaria que codifica una proteína, o a una secuencia que es sustancialmente homóloga a la hebra no codificante. Como se define en el presente documento, una secuencia antisentido es complementaria a la secuencia de una molécula de ADN bicatenaria que codifica una proteína. Es necesario que la secuencia antisentido sea complementaria únicamente a la porción codificante de la hebra codificante de la molécula de ADN. La secuencia antisentido puede ser complementaria a las secuencias reguladoras especificadas en la hebra codificante de una molécula de ADN que codifica una proteína, secuencias reguladoras que controlan la expresión de las secuencias codificantes.

El término “apoptosis”, como se usa en el presente documento, significa un proceso activo, que implica la activación de una ruta celular preexistente, inducida por una señal extracelular o intracelular, causando la muerte programada de la célula. En particular, la muerte celular programada implica fragmentación nuclear, condensación de cromatina y similares, en una célula con una membrana intacta.

Por el término “aplicador”, como el término se usa en el presente documento, se indica cualquier dispositivo que incluye, pero no se limita a, una jeringa hipodérmica, una pipeta y similares, para administrar los compuestos y composiciones de la invención.

Un “proceso del ciclo celular”, como se usa en el presente documento, significa cualquier función celular o proceso asociado al ciclo celular y las diversas fases del mismo. Así, un proceso del ciclo celular es uno asociado a, o que media en o participa en, la célula que progresa a través de cualquier porción del ciclo celular.

Una “enfermedad” es un estado de salud de un animal en el que el animal no puede mantener la homeostasis, y en el que si la enfermedad no mejora, entonces la salud del animal continúa deteriorándose. A diferencia, un “trastorno”

en un animal es un estado de salud en el que el animal puede mantener la homeostasis, pero en el que el estado de salud del animal es menos favorable de lo que sería en ausencia del trastorno. Si se deja sin tratar, un trastorno no produce necesariamente una disminución adicional en el estado de salud del animal.

5 Por el término “cantidad eficaz de un compuesto citotóxico”, como se usa en el presente documento, se indica una cantidad que cuando se administran a una célula media en un nivel detectable de muerte celular en comparación con la muerte celular detectada en ausencia del compuesto. La muerte celular puede evaluarse fácilmente por una plétora de métodos reconocidos en la técnica tales como, pero no se limitan a, realizar un recuento de células para evaluar el número de células viables antes y después de la administración del compuesto citotóxico, evaluar el nivel de síntesis biomolecular (por ejemplo, síntesis de proteínas, síntesis de ácidos nucleicos y similares), exclusión con azul de tripano, reducción con MTT, captación de yoduro de propidio, exposición de fosfatidilserina sobre la superficie celular, fragmentación de ADN y/o formación de escalera, y similares, en una célula.

15 El experto entendería que la cantidad del compuesto o composición administrada en el presente documento varía y puede determinarse fácilmente basándose en varios factores tales como la enfermedad o afección que está tratándose, la edad y salud y condición física del mamífero que está tratándose, la gravedad de la enfermedad, el compuesto particular que se administra, y similares.

20 “Inducir la muerte celular”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier aumento detectable en la muerte celular en una célula que se pone en contacto con un compuesto en comparación con la muerte celular en una célula por lo demás idéntica que no se pone en contacto con el compuesto. Cualquier aumento detectable en la muerte celular en las células puestas en contacto con el compuesto indica que el compuesto induce muerte celular.

25 Como se usa en el presente documento, el término “inhibir”, tal como en relación con un proceso biológico o actividad particular, pretende referirse al bloqueo, contención o reducción de tal proceso de actividad. Por ejemplo, inhibir la actividad de un receptor se refiere a disminuir, tanto completa como parcialmente, al menos un efecto medible de la actividad del receptor. “Inhibir sustancialmente” se refiere al bloqueo total o reducción significativa de un proceso biológico o actividad. Por ejemplo, si la actividad de un receptor se disminuyó mediblemente aproximadamente el 75 % o más de la actividad normal, puede decirse que la actividad está sustancialmente inhibida.

30 Como se usa en el presente documento, el término “poner en contacto”, tal como en referencia a la puesta en contacto de un agente farmacéutico (por ejemplo, un inhibidor de ADAM) con una célula o tejido, pretende referirse a poner juntos el agente farmacéutico y la célula o tejido de forma que tenga lugar un efecto fisiológico y/o químico como resultado de poner en contacto los agentes. La puesta en contacto puede tener lugar *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Por ejemplo, un agente farmacéutico puede ponerse en contacto con un cultivo celular *in vitro* para determinar el efecto del agente farmacéutico sobre las células. En otro ejemplo, la puesta en contacto de un agente farmacéutico con una célula o tejido incluye la administración de un agente farmacéutico a un paciente que tiene la célula o tejido que va a ponerse en contacto. En algunas realizaciones, cuando dos o más agentes farmacéuticos se ponen en contacto con una célula o tejido, la puesta en contacto puede producirse simultáneamente o en sucesión (por ejemplo, la puesta en contacto de un agente farmacéutico cada vez, en cualquier secuencia). Por ejemplo, cuando la puesta en contacto se lleva a cabo *in vivo*, los dos o más agentes farmacéuticos pueden administrarse a un paciente al mismo tiempo (es decir, simultáneamente), o en sucesión. En el supuesto caso de que se desee la puesta en contacto de dos o más agentes con una célula o tejido de forma que se solapen los efectos fisiológicos de la puesta en contacto relacionados con cada agente farmacéutico, tal como cuando se desea un efecto sinérgico, entonces la administración de los dos o más agentes farmacéuticos puede llevarse a cabo tanto simultáneamente como en sucesión dentro de un cierto periodo de tiempo que permitiría que los agentes de contacto actuaran sobre la célula o tejido del paciente al mismo tiempo.

50 El término “inhibición de la proliferación”, como se usa en el presente documento, pueden calibrarse por una disminución detectable en el crecimiento de una célula, como se evalúa por, entre otras cosas, contar el número de células puestas en contacto con un compuesto de interés y comparar la proliferación celular con células por lo demás idénticas no puestas en contacto con el compuesto. Es decir, el número de células, además del tamaño de las células, puede evaluarse fácilmente usando cualquier método conocido en la técnica (por ejemplo, exclusión con azul de tripano y recuento de células, midiendo la incorporación de ³H-timidina en ADN naciente en una célula, y similares), o tales métodos como se desarrollarán en el futuro. La proliferación de las células puestas en contacto con un compuesto se compara con la proliferación de células por lo demás idénticas no puestas en contacto y cualquier disminución detectable en la proliferación indica que el compuesto inhibe la proliferación.

60 “Material de instrucciones”, como el término se usa en el presente documento, incluye una publicación, una grabación, un diagrama, o cualquier otro medio de expresión que pueda usarse para comunicar la utilidad de la composición y/o compuesto de la invención en el kit para efectuar el alivio o tratar las diversas enfermedades o trastornos citados en el presente documento. Opcionalmente, o alternativamente, el material de instrucciones puede describir uno o más métodos de alivio de las enfermedades o trastornos en una célula o un tejido de un mamífero, que incluyen afectar una célula que expresa o que expresa en exceso Her-2, como se desvela en cualquier parte en el presente documento.

El material de instrucciones del kit puede, por ejemplo, estar fijado a un recipiente que contiene el compuesto y/o composición de la invención o transportarse junto con un recipiente que contiene el compuesto y/o composición. Alternativamente, el material de instrucciones puede transportarse por separado del recipiente con la intención de que el receptor use el material de instrucciones y el compuesto conjuntamente.

Por “complementario a una porción o todo el ácido nucleico que codifica ADAM” se indica una secuencia de ácido nucleico que no codifica una proteína ADAM. Más bien, la secuencia que está siendo expresada en las células es idéntica a la hebra no codificante del ácido nucleico que codifica la proteína ADAM y así no codifica la proteína ADAM.

Los términos “complementario” y “antisentido”, como se usan en el presente documento, no son completamente sinónimos. “Antisentido” se refiere particularmente a la secuencia de ácidos nucleicos de la hebra no codificante de una molécula de ADN bicatenaria que codifica una proteína, o a una secuencia que es sustancialmente homóloga a la hebra no codificante.

“Complementario”, como se usa en el presente documento, se refiere al amplio concepto de complementariedad de secuencias de subunidad entre dos ácidos nucleicos, por ejemplo, dos moléculas de ADN. Cuando una posición de nucleótido en ambas de las moléculas está ocupada por nucleótidos que normalmente son capaces de apareamiento de bases entre sí, entonces se considera que los ácidos nucleicos son complementarios entre sí en esta posición. Así, dos ácidos nucleicos son complementarios entre sí cuando un número sustancial (al menos el 50 %) de posiciones correspondientes en cada una de las moléculas está ocupado por nucleótidos que normalmente emparejan bases entre sí (por ejemplo, pares de nucleótidos de A:T y G:C). Como se define en el presente documento, una secuencia antisentido es complementaria a la secuencia de una molécula de ADN bicatenaria que codifica una proteína. Es necesario que la secuencia antisentido sea complementaria únicamente a la posición codificante de la hebra codificante de la molécula de ADN. La secuencia antisentido puede ser complementaria a las secuencias reguladoras especificadas en la hebra codificante de una molécula de ADN que codifica una proteína, secuencias reguladoras que controlan la expresión de las secuencias codificantes.

Una “región codificante” de un gen consiste en los residuos de nucleótidos de la hebra codificante del gen y los nucleótidos de la hebra no codificante del gen que son homólogos a o complementarios a, respectivamente, la región codificante de una molécula de ARNm que se produce por transcripción del gen.

Una “región codificante” de una molécula de ARNm también consiste en los residuos de nucleótidos de la molécula de ARNm que se emparejan con una región anti-codón de una molécula de ARN de transferencia durante la traducción de la molécula de ARNm o que codifica un codón de terminación. La región codificante puede así incluir residuos de nucleótidos correspondientes a residuos de aminoácidos que no están presentes en la proteína madura codificada por la molécula de ARNm (por ejemplo, residuos de aminoácidos en una secuencia señal de exportación de proteínas).

“Codificar” se refiere a la propiedad inherente de las secuencias específicas de nucleótidos en un polinucleótido, tal como un gen, un ADNc, o un ARNm, para servir de moldes para la síntesis de otros polímeros y macromoléculas en procesos biológicos que tienen tanto una secuencia de nucleótidos definida (es decir, ARNr, ARNt y ARNm) como una secuencia de aminoácidos definida y las propiedades biológicas resultantes de las mismas. Así, un gen codifica una proteína si la transcripción y traducción de ARNm correspondiente a ese gene produce la proteína en una célula u otro sistema biológico. Tanto la hebra codificante, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia de ARNm y se proporciona normalmente en el listado de secuencias, como la hebra no codificante, usada como molde para la transcripción de un gen o ADNc, puede denominarse en lo sucesivo codificar la proteína u otro producto de ese gene o ADNc.

A menos que se especifique de otro modo, una “secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos” incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas entre sí y que codifican la misma secuencia de aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos que codifican proteínas y ARN pueden incluir intrones.

“Vector de expresión” se refiere a un vector que comprende un polinucleótido recombinante que comprende secuencias de control de la expresión operativamente ligadas a una secuencia de nucleótidos que va a expresarse. Un vector de expresión comprende suficientes elementos que actúan en *cis* para la expresión; otros elementos para la expresión pueden suministrarse por la célula huésped o en un sistema de expresión *in vitro*. Los vectores de expresión incluyen todos aquellos conocidos en la técnica, tales como cósmidos, plásmidos (por ejemplo, desnudos o contenidos en liposomas) y virus (por ejemplo, retrovirus, adenovirus y virus adeno-asociados) que incorporan el polinucleótido recombinante.

Una primera región de un oligonucleótido “flanquea” una segunda región del oligonucleótido si las dos regiones están adyacentes entre sí o si las dos regiones están separadas no más de aproximadamente 1000 residuos de nucleótidos y preferentemente no más de aproximadamente 100 residuos de nucleótidos.

Como se usa en el presente documento, el término “fragmento”, como se aplica a un ácido nucleico, puede tener generalmente al menos aproximadamente 20 nucleótidos de longitud, preferentemente al menos aproximadamente 50 nucleótidos, más normalmente de aproximadamente 50 a aproximadamente 100 nucleótidos, preferentemente al menos aproximadamente 100 a aproximadamente 200 nucleótidos, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 200 nucleótidos a aproximadamente 300 nucleótidos, todavía incluso más preferentemente al menos aproximadamente 300 a aproximadamente 350, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 350 nucleótidos a aproximadamente 500 nucleótidos, todavía incluso más preferentemente al menos aproximadamente 500 a aproximadamente 600, y lo más preferentemente el fragmento de ácido nucleico tendrá más de aproximadamente 600 nucleótidos de longitud.

Como se aplica a una proteína, un “fragmento” de una ADAM tiene aproximadamente 20 aminoácidos de longitud. Más preferentemente, el fragmento de una ADAM tiene aproximadamente 30 aminoácidos, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 40, todavía más preferentemente al menos aproximadamente 60, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 80, todavía más preferentemente al menos aproximadamente 100, incluso más preferentemente aproximadamente 100, y más preferentemente al menos aproximadamente 150, más preferentemente al menos aproximadamente 200, todavía más preferentemente al menos aproximadamente 250, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 300, y más preferentemente al menos aproximadamente 320 aminoácidos de longitud.

Un “ADN genómico” es una hebra de ADN que tiene una secuencia de nucleótidos homóloga a un gen. A modo de ejemplo, tanto un fragmento de un cromosoma como un ADNc derivado por transcripción inversa de un ARNm de mamífero son ADN genómicos.

“Homólogo”, como se usa en el presente documento, se refiere a la similitud de secuencias de subunidad entre dos moléculas poliméricas, por ejemplo, entre dos moléculas de ácidos nucleicos, por ejemplo, dos moléculas de ADN o dos moléculas de ARN, o entre dos moléculas de polipéptido. Cuando una posición de subunidad en ambas de las dos moléculas está ocupada por la misma subunidad monomérica, por ejemplo, si una posición en cada una de las dos moléculas de ADN está ocupada por adenina, entonces son homólogas en esa posición. La homología entre dos secuencias es una función directa del número de coincidencias o posiciones homólogas, por ejemplo, si la mitad (por ejemplo, cinco posiciones en un polímero de diez subunidades de longitud) de las posiciones en dos secuencias de compuesto son homólogas, entonces las dos secuencias son el 50 % homólogas, si el 90 % de las posiciones, por ejemplo, 9 de 10, son coincidentes u homólogas, las dos secuencias comparten el 90 % de homología. A modo de ejemplo, las secuencias de ADN 5'-ATTGCC-3' y 5'-TATGGC-3' comparten el 50 % de homología.

Como se usa en el presente documento, “homología” se usa sinónimamente con “identidad”.

Además, cuando los términos “homología” o “identidad” se usan en el presente documento para referirse a los ácidos nucleicos y proteínas, debe interpretarse que se aplica a homología o identidad a tanto los niveles de secuencias de ácidos nucleicos como de aminoácidos.

Un primer oligonucleótido se hibrida con un segundo oligonucleótido con “alta rigurosidad” o “bajo condiciones de alta rigurosidad” si los dos oligonucleótidos se hibridan en condiciones por las cuales solo los oligonucleótidos que son al menos aproximadamente el 60 %, más preferentemente al menos aproximadamente el 65 %, incluso más preferentemente al menos aproximadamente el 70 %, todavía más preferentemente al menos aproximadamente el 80 %, y preferentemente al menos aproximadamente el 90 % o, más preferentemente al menos aproximadamente el 95 % complementarios, se hibridan entre sí. La rigurosidad de condiciones usadas para hibridar dos oligonucleótidos es una función de, entre otros factores, la temperatura, fuerza iónica del medio de hibridación, el periodo de incubación, la longitud de los oligonucleótidos, el contenido de G-C de los oligonucleótidos y el grado esperado de no homología entre los dos oligonucleótidos, si se conoce. Se conocen métodos de ajuste de la rigurosidad de las condiciones de hibridación (véase, por ejemplo, Sambrook y col., 1989, en: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York).

La determinación de la identidad en porcentaje entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos puede llevarse a cabo usando un algoritmo matemático. Por ejemplo, un algoritmo matemático útil para comparar dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268), modificado como en Karlin y Altschul (1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877). Este algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul, y col. (1990, J. Mol. Biol. 215:403-410) y puede accederse a él, por ejemplo, en el sitio gubernamental de la malla mundial del Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI) de la Biblioteca Nacional de Medicina como parte de los Institutos Nacionales de Salud. Las búsquedas de nucleótidos con BLAST pueden realizarse con el programa NBLAST (designado “blastn” en el sitio web de NCBI), usando los siguientes parámetros: penalización por hueco = 5; penalización por extensión de hueco = 2; penalización por desapareamiento = 3; recompensa por apareamiento = 1; valor de esperanza 10,0; y tamaño de palabra = 11 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a un ácido nucleico descrito en el presente documento. Las búsquedas de proteínas con BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST (designado “blastx” en el sitio web de NCBI) o el programa “blastp” de NCBI, usando los siguientes parámetros: valor de esperanza 10,0, matriz de puntuación BLOSUM62 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a una molécula de proteína descrita en el presente documento.

Para obtener alineamientos con huecos para fines de comparación, puede utilizarse Gapped BLAST como se describe en Altschul y col. (1997, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402). Alternativamente, pueden usarse PSI-Blast o PHI-Blast para realizar una búsqueda iterada que detecta relaciones distantes entre moléculas (ídem) y relaciones entre moléculas que comparten un patrón común. Si se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST, PSI-Blast y PHI-Blast, pueden usarse los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Véase el sitio web gubernamental públicamente disponible del Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI) de la Biblioteca Nacional de Medicina en los Institutos Nacionales de Salud.

La identidad en porcentaje entre dos secuencias puede determinarse usando técnicas similares a aquellas descritas anteriormente, con o sin permitir huecos. En el cálculo de la identidad en porcentaje, normalmente se cuentan coincidencias exactas.

Un "ácido nucleico aislado" se refiere a un segmento de ácido nucleico o fragmento que se ha separado de secuencias que lo flanquean en un estado que se produce naturalmente, por ejemplo, un fragmento de ADN que se ha eliminado de las secuencias que normalmente son adyacentes al fragmento, por ejemplo, las secuencias adyacentes al fragmento en un genoma en el que se produce naturalmente. El término también se aplica a ácidos nucleicos que se han purificado sustancialmente a partir de otros componentes que acompañan naturalmente al ácido nucleico, por ejemplo, ARN o ADN o proteínas, que naturalmente lo acompañan en la célula. Por tanto, el término incluye, por ejemplo, un ADN recombinante que se incorpora en un vector, en un plásmido o virus que se replica autónomamente, o en el ADN genómico de un procariota o eucariota, o que existe como molécula separada (por ejemplo, como un ADNc o un fragmento genómico o de ADNc producido por PCR o digestión con enzima de restricción) independiente de otras secuencias. También incluye un ADN recombinante que es parte de un gen híbrido que codifica la secuencia de polipéptidos adicional.

En el contexto de la presente invención se usan las siguientes abreviaturas para las bases de ácidos nucleicos que comúnmente se producen. "A" se refiere a adenosina, "C" se refiere a citidina, "G" se refiere a guanosina, "T" se refiere a timidina y "U" se refiere a uridina.

Describiendo dos polinucleótidos como "operativamente ligados" se indica que un resto de ácido nucleico monocatenario o bicatenario comprende los dos polinucleótidos dispuestos dentro del resto de ácido nucleico en una manera tal que al menos uno de los dos polinucleótidos pueda ejercer un efecto fisiológico por el cual se caracteriza el otro. A modo de ejemplo, un promotor operativamente ligado a la región codificante de un gen puede promover la transcripción de la región codificante.

Preferentemente, cuando el ácido nucleico que codifica la proteína deseada comprende además una secuencia promotora/ reguladora, un promotor/regulador está ubicado en el extremo 5' de la secuencia codificante de la proteína deseada de forma que conduzca la expresión de la proteína deseada en una célula. Juntos, el ácido nucleico que codifica la proteína deseada y su secuencia promotora/ reguladora comprenden un "transgén".

Como se usa en el presente documento, el término "secuencia promotora/reguladora" significa una secuencia de ácidos nucleicos que se requiere para la expresión de un producto génico operativamente ligado a una secuencia promotora/reguladora. En algunos casos, esta secuencia puede ser la secuencia promotora central y en otros casos esta secuencia también puede incluir una secuencia potenciadora y otros elementos reguladores que se requieren para la expresión del producto génico. Una secuencia promotora/reguladora puede ser, por ejemplo, una que expresa el producto génico de una manera específica de tejido.

Un promotor "constitutivo" es una secuencia de nucleótidos que, cuando se liga operativamente a un polinucleótido que codifica o especifica un producto génico, hace que el producto génico se produzca en una célula humana viva bajo la mayoría o todas las condiciones fisiológicas de la célula.

Un promotor "inducible" es una secuencia de nucleótidos que, cuando se liga operativamente a un polinucleótido que codifica o especifica un producto génico, hace que el producto génico se produzca en una célula humana viva sustancialmente solo cuando un inductor que se corresponde con un promotor está presente en la célula.

Un promotor "específico de tejido" es una secuencia de nucleótidos que, cuando se liga operativamente a un polinucleótido que codifica o especifica un producto génico, hace que el producto génico se produzca en una célula humana viva sustancialmente solo si la célula es una célula del tipo de tejido correspondiente a un promotor.

Una "secuencia de poliadenilación" es una secuencia de polinucleótidos que dirige la adición de una cola de poli A sobre una secuencia de ARN mensajero transcrita.

Un "polinucleótido" significa una hebra única o hebras paralelas o antiparalelas de un ácido nucleico. Así, un polinucleótido puede ser tanto un ácido nucleico monocatenario como bicatenario.

El término "ácido nucleico" normalmente se refiere a polinucleótidos grandes.

El término “oligonucleótido” normalmente se refiere a polinucleótidos cortos, generalmente, no más de aproximadamente 50 nucleótidos. Se entenderá que cuando una secuencia de nucleótidos se representa por una secuencia de ADN (es decir, A, T, G, C), ésta también incluye una secuencia de ARN (es decir, A, U, G, C) en la que “U” sustituye a “T.”

5

Se usa notación convencional en el presente documento para describir secuencias de polinucleótidos: el extremo izquierdo de una secuencia de polinucleótidos monocatenaria es el extremo 5'; la dirección a mano izquierda de una secuencia de polinucleótidos bicatenaria se denomina la dirección 5'.

10 La dirección de adición 5' a 3' de nucleótidos a transcritos de ARN nacientes se denomina la dirección de transcripción. La hebra de ADN que tiene la misma secuencia que un ARNm se denomina la “hebra codificante”; secuencias en la hebra de ADN que se localizan 5' con respecto a un punto de referencia en el ADN se denominan “secuencias en la dirección 5'”; secuencias en la hebra de ADN que están 3' con respecto a un punto de referencia en el ADN se denominan “secuencias en la dirección 3'”.

15

Una “porción” de un polinucleótido significa al menos al menos aproximadamente veinte residuos de nucleótidos secuenciales del polinucleótido. Se entiende que una porción de un polinucleótido puede incluir cada residuo de nucleótido del polinucleótido.

20 “Cebador” se refiere a un polinucleótido que puede hibridarse específicamente con un molde de polinucleótidos designado y proporcionar un punto de iniciación para la síntesis de un polinucleótido complementario. Tales síntesis se producen cuando el cebador de polinucleótido se pone en condiciones en las que se induce la síntesis, es decir, en presencia de nucleótidos, un molde de polinucleótidos complementario y un agente para la polimerización tal como ADN polimerasa. Un cebador es normalmente monocatenario, pero puede ser bicatenario. Los cebadores son
25 normalmente ácidos desoxirribonucleicos, pero para muchas aplicaciones son útiles una amplia variedad de cebadores sintéticos y que se producen naturalmente. Un cebador es complementario al molde para el que se diseña para hibridarse para servir como sitio para la iniciación de la síntesis, pero no necesita reflejar la secuencia exacta del molde. En tal caso, la hibridación específica del cebador con el molde depende de la rigurosidad de las condiciones de hibridación. Los cebadores pueden marcarse con, por ejemplo, restos cromogénicos, radiactivos o
30 fluorescentes y usarse como restos detectables.

“Sonda” se refiere a un polinucleótido que puede hibridarse específicamente con una secuencia designada de otro polinucleótido. Una sonda se hibrida específicamente con un polinucleótido complementario diana, pero no necesita reflejar la secuencia complementaria exacta del molde. En tal caso, la hibridación específica de la sonda con la diana
35 depende de la rigurosidad de las condiciones de hibridación. Las sondas pueden marcarse con, por ejemplo, restos cromogénicos, radiactivos o fluorescentes y usarse como restos detectables.

“Polinucleótido recombinante” se refiere a un polinucleótido que tiene secuencias que no se unen juntas naturalmente. Un polinucleótido recombinante amplificado o ensamblado puede incluirse en un vector adecuado, y el vector puede usarse para transformar una célula huésped adecuada.
40

Un polinucleótido recombinante también puede cumplir una función no codificante (por ejemplo, promotor, origen de replicación, sitio de unión al ribosoma, etc.).

45 Un “polipéptido recombinante” es uno que se produce tras la expresión de un polinucleótido recombinante.

“Polipéptido” se refiere a un polímero compuesto de residuos de aminoácidos, variantes estructurales relacionadas que se producen naturalmente y análogos sintéticos que no se producen naturalmente de los mismos unidos mediante enlaces peptídicos, variantes estructurales relacionadas que se producen naturalmente y análogos sintéticos que no se producen naturalmente de los mismos. Los polipéptidos sintéticos pueden sintetizarse, por ejemplo, usando un sintetizador de polipéptidos automatizado.
50

El término “proteína” normalmente se refiere a polipéptidos grandes.

55 El término “péptido” normalmente se refiere a polipéptidos cortos.

Se usa notación convencional en el presente documento para representar secuencias de polipéptidos: el extremo izquierdo de una secuencia de polipéptidos es el extremo amino; el extremo derecho de una secuencia de polipéptidos es el extremo carboxilo.
60

Como se usa en el presente documento, el término “gen indicador” significa un gen cuya expresión puede detectarse usando un método conocido. A modo de ejemplo, el gen *lacZ* de *Escherichia coli* puede usarse como gen indicador en un medio debido a que la expresión del gen *lacZ* puede detectarse usando métodos conocidos añadiendo el sustrato cromogénico o-nitrofenil- β -galactósido al medio (Gerhardt y col., eds., 1994, Methods for General and
65 Molecular Bacteriology, American Society for Microbiology, Washington, DC, p. 574).

Un "sitio de restricción" es una porción de un ácido nucleico bicatenario que es reconocida por una endonucleasa de restricción.

Una porción de un ácido nucleico bicatenario es "reconocida" por una endonucleasa de restricción si la endonucleasa puede escindir ambas hebras del ácido nucleico en la porción cuando el ácido nucleico y la endonucleasa se ponen en contacto.

Por el término "se une específicamente a", como se usa en el presente documento, se indica un compuesto, por ejemplo, una proteína, un ácido nucleico, un anticuerpo, y similares, que reconoce y se une a una molécula específica, pero no reconoce o se une sustancialmente a otras moléculas en una muestra.

Un primer oligonucleótido se hibrida con un segundo oligonucleótido "con alta rigurosidad" si los dos oligonucleótidos se hibridan en condiciones por las cuales solo los oligonucleótidos que son al menos aproximadamente el 73 %, más preferentemente al menos aproximadamente el 75 %, incluso más preferentemente al menos aproximadamente el 80 %, incluso más preferentemente al menos aproximadamente el 85 %, todavía más preferentemente al menos aproximadamente el 90 % y lo más preferentemente al menos aproximadamente el 95 %, complementarios se hibridan entre sí. La rigurosidad de las condiciones usada para hibridar dos oligonucleótidos es una función de, entre otros factores, la temperatura, fuerza iónica del medio de hibridación, el periodo de incubación, la longitud de los oligonucleótidos, el contenido de G-C de los oligonucleótidos y el grado esperado de no homología entre los dos oligonucleótidos, si se conoce. Se conocen métodos de ajuste de la rigurosidad de las condiciones de hibridación (véase, por ejemplo, Sambrook y col., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York).

Como se usa en el presente documento, el término "transgén" significa una secuencia de ácidos nucleicos exógenos cuyo ácido nucleico exógeno está codificado por una célula transgénica o mamífero.

Una "célula recombinante" es una célula que comprende un transgén. Una célula tal puede ser una célula eucariota o una célula procariota. Es decir, la célula transgénica engloba, pero no se limita a, un citoblasto embrionario que comprende el transgén, una célula obtenida de un mamífero quimérico derivado de una célula ES transgénica en la que la célula comprende el transgén, una célula obtenida de un mamífero transgénico, o tejido fetal o placentario del mismo, y una célula procariota que comprende el transgén.

Por el término "ácido nucleico exógeno" se indica que el ácido nucleico se ha introducido en una célula o un animal usando tecnología que ha sido desarrollada con el fin de facilitar la introducción de un ácido nucleico en una célula o un animal.

Por polipéptido de "marca" se indica cualquier proteína que, cuando se liga por un enlace peptídico a una proteína de interés, puede usarse para localizar la proteína, para purificarla de un extracto de células, para inmovilizarla para su uso en ensayos de unión, o para estudiar de otro modo sus propiedades biológicas y/o función.

Como se usa en el presente documento, el término "mamífero transgénico" significa un mamífero cuyas células germinativas comprenden un ácido nucleico exógeno.

Como se usa en el presente documento, "tratar" significa reducir la frecuencia con la que los síntomas de reestenosis arterial, fibrosis adventicia, respuestas de cicatrización excesivas o insuficientes, cicatrización, queloides, formación de hueso, curación de fracturas, y similares, son experimentados por un paciente.

Por el término "vector", como se usa en el presente documento, se indica cualquier plásmido o virus que codifica un ácido nucleico exógeno. También debe interpretarse que el término incluye compuestos de no plásmido y no virales que facilitan la transferencia de ácido nucleico en viriones o células, tales como, por ejemplo, compuestos de polilisina y similares. El vector puede ser un vector viral que es adecuado como vehículo de administración para la administración de un ácido nucleico que inhibe la expresión de un ADAM que escinde Her-2, al paciente, o el vector puede ser un vector no viral que es adecuado para el mismo fin.

Ejemplos de vectores virales y no virales para la administración de ADN a células y tejidos son muy conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Ma y col. (1997, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94:12744-12746). Ejemplos de vectores virales incluyen, pero no se limitan a, un virus recombinante de la variolovacuna, un adenovirus recombinante, un retrovirus recombinante, un virus adeno-asociado recombinante, un virus de la viruela aviar recombinante y similares (Cranage y col., 1986, EMBO J. 5:3057-3063; solicitud de patente internacional nº WO94/17810 publicada el 18 de agosto de 1994; solicitud de patente internacional nº WO94/23744 publicada el 27 de octubre de 1994). Ejemplos de vectores no virales incluyen, pero no se limitan a, liposomas, derivados de poliamina de ADN y similares.

Una "cantidad sinérgica de Her-2" es una cantidad de un compuesto (por ejemplo, un anticuerpo antagonista de Her-2, un MPI que inhibe la escisión de Her-2 y similares) que cuando se administra conjuntamente con otro compuesto tal, reduce el nivel de crecimiento mediado por Her-2 en una célula (como se evalúa, por ejemplo, midiendo la

proliferación por la célula) a un grado detectablemente mayor que cualquier compuesto administrado a la célula en ausencia del otro compuesto o a un grado detectablemente mayor que la suma del efecto observado con cualquier compuesto solo.

“Escisión de Her-2”, como el término se usa en el presente documento, se refiere al proceso por el cual el polipéptido Her-2 de longitud completa (p185) se escinde para producir un ectodominio (ECD) de p105 y una punta de p95. Si Her-2 está asociado a una célula, la escisión normalmente produce una porción de p95 del polipéptido de Her-2 que sigue asociada a la célula mientras que se libera el ECD (es decir, elimina) al medio extracelular. La enzima que escinde p185 para liberar un ECD, producir p95, o ambos, se denomina en el presente documento “convertasa”. La escisión de Her-2 puede ser *in vitro* o *in vivo*.

Por el término “que expresa en exceso Her-2”, como el término se usa en el presente documento, se indica que una célula asociada a una enfermedad, trastorno o afección comprende un nivel detectablemente mayor de Her-2 que una célula por lo demás idéntica que no está asociada a una enfermedad, trastorno o afección.

Un tratamiento “terapéutico” es un tratamiento administrado a un sujeto que presenta signos de patología con el fin de disminuir o eliminar aquellos signos y/o reducir o disminuir la frecuencia, duración e intensidad de los signos.

Una “cantidad eficaz” de un compuesto es aquella cantidad de compuesto que es suficiente para proporcionar un efecto detectable a una célula a la que el compuesto se administra cuando se compara con una célula por lo demás idéntica a la que no se administra el compuesto.

Por el término “un inhibidor de un miembro de la familia de tirosina cinasa de receptor del factor de crecimiento epidérmico”, como se usa en el presente documento, se indica cualquier compuesto o molécula que inhiba detectablemente la señalización mediante un miembro de la familia de tirosina cinasa de EGFR. Tales compuestos incluyen un antagonista, un agonista inverso y similares, que incluyen, pero no se limitan a, un anticuerpo antagonista de Her-2 (por ejemplo, Herceptin™), un inhibidor de molécula pequeña (por ejemplo, Iressa™), un ácido nucleico (por ejemplo, antisentido) que inhibe la función, expresión, y similares, de un miembro de la familia de tirosina cinasa de EGFR, entre otras cosas.

Un “miembro de la familia de tirosina cinasa de receptor del factor de crecimiento epidérmico” significa cualquier receptor que puede clasificarse como un miembro de la familia basándose en su homología, función y/o especificidad de un ligando que se une con el mismo, con un miembro conocido de la familia de EGFR, incluyendo tal miembro de la familia, pero que no se limita a, EGFR-1 (es decir, Her-1), Her-2, Her-3 y Her-4, entre otros.

Por el término “se une específicamente a”, como se usa en el presente documento, se indica un anticuerpo que reconoce y se une a una proteína de la familia de tirosina cinasa de EGFR presente en una muestra, pero cuyo anticuerpo no reconoce sustancialmente o se une a otras moléculas en la muestra.

Una “concentración inferior a la óptima” de compuesto es aquella cantidad de compuesto que es suficiente para proporcionar un efecto detectable a una célula a la que se administra el compuesto cuando se compara con una célula por lo demás idéntica a la que no se administra el compuesto. Este efecto es inferior al que puede lograrse máximamente con el mismo compuesto bajo condiciones idénticas, pero en el que la concentración del compuesto administrada es mayor que aquella que media en el efecto detectable, pero menor.

Un “receptor” es una proteína que se une específicamente a un ligando.

“Tratar” una enfermedad, como el término se usa en el presente documento, significa reducir la frecuencia de la enfermedad o trastorno, reduciendo la frecuencia con la que un síntoma del uno o más síntomas de enfermedad o trastorno es experimentado por un animal.

Por el término “convertasa”, como se usa en el presente documento, se indica una proteína que escinde específicamente una Her-2 para producir una porción de ectodominio que se elimina de la célula y, lo que es más importante, una porción de “punta” de p95 que sigue asociada a la célula. Como se demuestra en el presente documento, ADAM10 y ADAM15 son convertasas como se define en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término “cáncer”, también llamado médicamente “neoplasia maligna”, pretende referirse a una enfermedad caracterizada por la proliferación celular no controlada en la que las células cancerosas han perdido sus controles reguladores normales que de otro modo gobernarían la tasa de crecimiento celular. Estas células en división no reguladas pueden extenderse a través del cuerpo e invadir tejidos normales en un proceso denominado “metástasis”.

Como se usa en el presente documento, el término “tumor”, también llamado médicamente “neoplasia”, se refiere a una masa de células incontrolablemente en división. En algunas realizaciones, un tumor pueden ser benigno (no invasivo) o maligno (invasivo). Un tumor maligno es frecuentemente, pero no siempre, característico de cáncer.

I. Ácidos nucleicos aislados

La presente divulgación incluye un ácido nucleico aislado que codifica una variante de ADAM15 de mamífero, o un fragmento de la misma, en el que el ácido nucleico codifica una variante de ADAM15 de mamífero, y en el que el ácido nucleico comparte al menos aproximadamente el 90 % de identidad con al menos un ácido nucleico que tiene la secuencia de SEC ID N°: 1 (variante 1 humana de ADAM15) y SEC ID N°: 3 (variante 2 humana de ADAM15). Preferentemente, el ácido nucleico es aproximadamente el 95 % homólogo, y lo más preferentemente aproximadamente el 99 % homólogo, a al menos una de SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 3, desveladas en el presente documento. Incluso más preferentemente, el ácido nucleico es al menos uno de SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 3.

La presente divulgación incluye un ácido nucleico aislado que codifica una variante de ADAM15 de mamífero, o un fragmento de la misma, en el que el ácido nucleico comparte más de aproximadamente el 90 % de homología con SEC ID N°: 1. Preferentemente, el ácido nucleico es aproximadamente el 95 % homólogo, y lo más preferentemente aproximadamente el 99 % homólogo, a la variante 1 humana de ADAM15 desvelada en el presente documento, SEC ID N°: 1. Incluso más preferentemente, el ácido nucleico es SEC ID N°: 1.

La presente divulgación incluye un ácido nucleico aislado que codifica una variante de ADAM15 de mamífero, o un fragmento de la misma, en el que el ácido nucleico comparte más de aproximadamente el 90 % de homología con SEC ID N°: 3 (variante 2 humana de ADAM15). Preferentemente, el ácido nucleico es aproximadamente el 95 % homólogo, y lo más preferentemente aproximadamente el 99 % homólogo a la variante 2 humana de ADAM15 desvelada en el presente documento, SEC ID N°: 3. Incluso más preferentemente, el ácido nucleico es SEC ID N°: 3.

En otro aspecto, la presente divulgación incluye un ácido nucleico aislado que codifica una variante de ADAM15 de mamífero, o un fragmento de la misma, en el que la proteína codificada por el ácido nucleico comparte más de aproximadamente el 90 % de homología con la secuencia de aminoácidos de al menos una de SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 4. Preferentemente, el ácido nucleico es aproximadamente el 95 % homólogo, lo más preferentemente aproximadamente el 99 % homólogo a al menos una de SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 4. Incluso más preferentemente, la proteína de variante de ADAM15 de mamífero codificada por el ácido nucleico es al menos una de SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 4.

En otro aspecto, la presente divulgación incluye un ácido nucleico aislado que codifica una variante de ADAM15 de mamífero, o un fragmento de la misma, en el que la proteína codificada por el ácido nucleico comparte más de aproximadamente el 90 % de homología con la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2 (variante 1 humana de ADAM15). Preferentemente, la proteína codificada por el ácido nucleico es aproximadamente el 95 % homóloga, y lo más preferentemente aproximadamente el 99 % homóloga, a la variante 1 humana de ADAM15 desvelada en el presente documento, SEC ID N°: 2. Incluso más preferentemente, la proteína de variante 1 humana de ADAM15 codificada por el ácido nucleico es SEC ID N°: 2.

En otro aspecto, la presente divulgación incluye un ácido nucleico aislado que codifica una variante de ADAM15 de mamífero, o un fragmento de la misma, en el que la proteína codificada por el ácido nucleico comparte más de aproximadamente el 90 % de homología con la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 4. Preferentemente, la proteína codificada por el ácido nucleico es aproximadamente el 95 % homóloga, y lo más preferentemente aproximadamente el 99 % homóloga, a la variante 2 humana de ADAM15 desvelada en el presente documento, SEC ID N°: 4. Incluso más preferentemente, la proteína de variante 2 humana de ADAM15 codificada por el ácido nucleico es SEC ID N°: 4.

Un experto en la materia apreciaría, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, que otros homólogos de la variante de ADAM15 existen probablemente en otras especies y pueden identificarse y aislarse fácilmente usando los métodos descritos en el presente documento usando los datos de secuencia desvelados en el presente documento con respecto a las dos variantes de corte y empalme humanas. Así, la presente divulgación engloba variantes de ADAM15 adicionales que pueden identificarse fácilmente basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, pero que no incluyen ninguna variante de ratón conocida previamente en la materia.

Debe interpretarse que el ácido nucleico aislado de la divulgación incluye una secuencia de ARN o de ADN que codifica una proteína de variante de ADAM15 humana de la divulgación, y cualquier forma modificada de la misma, que incluye modificaciones químicas del ADN o ARN que convierten la secuencia de nucleótidos en más estable cuando está libre de células o cuando está asociada a una célula. También pueden usarse modificaciones químicas de nucleótidos para potenciar la eficiencia con la que una secuencia de nucleótidos es captada por una célula o la eficiencia con la que se expresa en una célula. Todas y cada una de las combinaciones de modificaciones de las secuencias de nucleótidos se contemplan en la presente invención.

No debe interpretarse que la presente divulgación esté limitada únicamente a las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos desveladas en el presente documento. Una vez provisto de la presente divulgación, es fácilmente evidente para un experto en la materia que puedan obtenerse otros ácidos nucleicos que codifican proteínas de variante de ADAM15, tales como aquellos presentes en otras especies de mamíferos (por ejemplo, simio superior,

gibón, bovino, ovino, equino, porcino, canino, felino, y similares, pero que no incluye ratón), usando la información de secuencias desvelada en el presente documento para los ácidos nucleicos de variante de ADAM15 humana que codifican polipéptidos de variante de ADAM15 humana como se desvela en el presente documento como se entendería por un experto en la materia. Métodos para aislar un ácido nucleico basado en una secuencia conocida son muy conocidos en la técnica (por ejemplo, cribado de bibliotecas genómicas o de ADNc), y no se describen en el presente documento.

Además, puede usarse cualquier número de procedimientos para la generación de formas mutantes, derivadas o variantes de una variante de ADAM15 humana usando metodología de ADN recombinante muy conocida en la técnica. Está disponible una amplia plétora de técnicas para el experto para producir muteínas de interés y para seleccionar aquellas con propiedades deseadas.

Técnicas para introducir mutaciones aleatorias en secuencias de ADN son muy conocidas en la técnica, e incluyen mutagénesis por PCR, mutagénesis de saturación y enfoques de oligonucleótidos degenerados. Véanse Sambrook y Russell (2001, Molecular Cloning, A Laboratory Approach, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY) y Ausubel y col. (2002, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY).

La divulgación incluye un ácido nucleico que codifica una variante de ADAM15 humana en el que el ácido nucleico que codifica un polipéptido de marca está covalentemente unido al mismo. Es decir, la divulgación engloba un ácido nucleico quimérico en el que las secuencias de ácidos nucleicos que codifican un polipéptido de marca están covalentemente ligadas al ácido nucleico que codifica al menos una de variante 1 humana de ADAM15 y variante 2 humana de ADAM15. Tales polipéptidos de marca son muy conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, proteína verde fluorescente (GFP), myc, myc-piruvato cinasa (myc-PK), His₆, proteína de unión a maltosa (MBP), un polipéptido de marca de la hemaglutinina del virus de la gripe, un polipéptido de marca flag (FLAG) y un polipéptido de marca de glutatión-S-transferasa (GST). Sin embargo, no debe interpretarse de ninguna forma que la divulgación se limita a los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de marca enumerados anteriormente. Más bien, debe interpretarse que se incluye en la presente divulgación cualquier secuencia de ácidos nucleicos que codifique un polipéptido que puede funcionar de modo sustancialmente similar a estos polipéptidos de marca.

El ácido nucleico que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido de marca puede usarse para localizar una variante de ADAM15 humana dentro de una célula, un tejido y/o un organismo completo (por ejemplo, un embrión de mamífero) y para estudiar la(s) función (funciones) de una variante de ADAM15 humana en una célula o animal. Además, la adición de un polipéptido de marca facilita el aislamiento y la purificación de la proteína "marcada" tal que las proteínas de la invención puedan producirse y purificarse fácilmente.

II Polipéptidos aislados

La divulgación también incluye un polipéptido aislado que comprende una molécula de variante de ADAM15 humana. Preferentemente, el polipéptido aislado que comprende una molécula de variante de ADAM15 humana es más de aproximadamente el 90 % homólogo a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de al menos una de SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 4. El experto entendería, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, que el polipéptido de la divulgación no incluye ninguna variante de ADAM15 de ratón descrita previamente. Preferentemente, el polipéptido aislado es aproximadamente el 90 % homólogo, más preferentemente aproximadamente el 95 % homólogo, y lo más preferentemente aproximadamente el 99 % homólogo, a al menos una de SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 4. Más preferentemente, el polipéptido aislado que comprende una variante de ADAM15 humana es al menos una de variante 1 humana de ADAM15 y variante 2 humana de ADAM15. Lo más preferentemente, el polipéptido aislado que comprende una variante de ADAM15 de mamífero es al menos una de SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 4.

La divulgación también incluye un polipéptido aislado que comprende una molécula de variante de ADAM15 humana. Preferentemente, el polipéptido aislado que comprende una variante de ADAM15 humana es más de aproximadamente el 90 % homólogo a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2. Más preferentemente, el polipéptido aislado que comprende una variante de ADAM15 humana es al menos aproximadamente el 95 % homóloga, y más preferentemente al menos aproximadamente el 99 % homóloga, a la variante 1 humana de ADAM15. Más preferentemente, el polipéptido aislado que comprende una molécula de variante de ADAM15 humana es la variante 1 humana de ADAM15. Lo más preferentemente, el polipéptido aislado que comprende una molécula de variante de ADAM15 humana es SEC ID N°: 2.

La divulgación también incluye un polipéptido aislado que comprende una variante de ADAM15 humana en la que, preferentemente, el polipéptido aislado que comprende una variante de ADAM15 humana es más de aproximadamente el 90 % homóloga a un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 4. Más preferentemente, el polipéptido aislado que comprende una variante de ADAM15 humana es al menos aproximadamente el 95 % homóloga, y más preferentemente al menos aproximadamente el 99 % homóloga, a la variante 2 humana de ADAM15. Más preferentemente, el polipéptido aislado que comprende una variante de ADAM15 humana es la variante 2 humana de ADAM15. Lo más preferentemente, el polipéptido aislado que comprende una molécula de variante de ADAM14 humana es SEC ID N°: 4.

La presente divulgación también proporciona análogos de proteínas o péptidos que comprenden una molécula de variante de ADAM15 de mamífero como se desvela en el presente documento. Los análogos pueden diferenciarse de proteínas o péptidos que se producen naturalmente por diferencias conservativas de secuencias de aminoácidos o por modificaciones que no afectan la secuencia, o por ambas. Por ejemplo, pueden hacerse cambios conservativos de aminoácidos, que aunque alteran la secuencia primaria de la proteína o péptido, normalmente no alteran su función. Las sustituciones de aminoácidos conservativas normalmente incluyen sustituciones dentro de los siguientes grupos:

glicina, alanina;
valina, isoleucina, leucina;
ácido aspártico, ácido glutámico;
asparagina, glutamina;
serina, treonina;
lisina, arginina;
fenilalanina, tirosina.

Las modificaciones (que normalmente no alteran la secuencia primaria) incluyen derivatización química *in vivo*, o *in vitro*, de polipéptidos, por ejemplo, acetilación, o carboxilación. También se incluyen modificaciones de glucosilación, por ejemplo, aquellas hechas modificando los patrones de glucosilación de un polipéptido durante su síntesis y procesamiento o en etapas de procesamiento adicionales; por ejemplo, exponiendo el polipéptido a enzimas que afectan la glucosilación, por ejemplo, enzimas glucosilantes o desglucosilantes de mamífero. También están englobadas secuencias que tienen residuos de aminoácidos fosforilados, por ejemplo, fosfotirosina, fosfoserina o fosfotreonina.

También se incluyen polipéptidos que se han modificado usando técnicas de biología molecular habituales de manera que se mejore su resistencia a la degradación proteolítica o para optimizar las propiedades de solubilidad o para hacerlos más adecuados como agente terapéutico. Análogos de tales polipéptidos incluyen aquellos que contienen residuos distintos de L-aminoácidos que se producen naturalmente, por ejemplo, D-aminoácidos o aminoácidos sintéticos que no se producen naturalmente. Los péptidos de la divulgación no se limitan a productos de cualquiera de los procesos a modo de ejemplo específicos enumerados en el presente documento.

También debe interpretarse que la presente divulgación engloba “mutantes”, “derivados” y “variantes” de los péptidos de la invención (o del ADN que los codifica), cuyos mutantes, derivados y variantes son péptidos ADAM15 que están alterados en uno o más aminoácidos (o, cuando se refiere a la secuencia de nucleótidos que codifica los mismos, están alterados en uno o más pares de bases) de forma que el péptido resultante (o ADN) no sea idéntico a las secuencias citadas en el presente documento, pero tenga la misma propiedad biológica que los péptidos de variante de ADAM15 desvelados en el presente documento, porque el péptido tiene propiedades biológicas/bioquímicas del péptido de variante de ADAM15 de la presente invención (por ejemplo, puede escindir específicamente Her-2 para producir, entre otros, una porción de Her-2 p95).

El experto entendería, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, que la actividad biológica de ADAM15 engloba, pero no se limita a, la capacidad de una molécula para escindir específicamente Her-2 para producir una porción de ectodominio (p105) y una punta de la porción de p95, y similares.

Además, debe interpretarse que la divulgación incluye variantes que se producen naturalmente o mutantes recombinantemente derivados de secuencias de variantes de ADAM15, variantes o mutantes que convierten la proteína así codificada tanto en más, menos como precisamente tan biológicamente activa como los clones de longitud completa de la invención.

Los ácidos nucleicos, y péptidos así codificados, son herramientas útiles para elucidar la(s) función (funciones) de la molécula de ADAM15 en una célula. Además, ácidos nucleicos y aminoácidos que comprenden una molécula de variante de ADAM15 de mamífero son diagnósticos útiles que pueden usarse, por ejemplo, para identificar un compuesto que afecta la función o expresión de variantes de ADAM15, compuesto que es un posible candidato a fármaco para una enfermedad, trastorno o afección asociada a, o mediada por, la escisión de Her-2 para producir una porción p95 de Her-2. Los ácidos nucleicos, las proteínas codificadas por éstos, o ambos, pueden administrarse a una célula, tejido o mamífero para aumentar o disminuir la expresión o función de ADAM15, o una variante de la misma, que incluye, pero no se limita a, la variante 1 y 2 como se ha desvelado en el presente documento, en la célula, tejido o mamífero a la que se administra. Esto puede ser beneficioso para la célula, tejido y/o mamífero en situaciones en las que la expresión por defecto o en exceso de ADAM15, o variante de la misma, en la célula, tejido o mamífero media en una enfermedad o afección asociada a la escisión de Her-2 para producir p95.

Es decir, los datos desvelados en el presente documento demuestran que la escisión de Her-2 por p95 está asociada a ciertas enfermedades, trastornos o afecciones. Incluso más importante, los datos desvelados en el presente documento demuestran que la inhibición de tal escisión puede proporcionar un beneficio terapéutico. Por tanto, los datos desvelados en el presente documento demuestran por primera vez que ADAM10 y ADAM15 son responsables, al menos en parte, de la escisión de Her-2 para liberar el ectodominio de p105 y para producir p95.

asociado a célula. Así, estas moléculas de ADAM son dianas importantes para la producción de posibles agentes terapéuticos. Además, los datos sugieren que una variante de ADAM15, la variante 1, está preferencialmente asociada a la escisión de Her-2 en células que eliminan p105 y producen p95. Así, ADAM15, y variantes de la misma, incluso más preferentemente las variantes 1 y 2 desveladas en el presente documento, son posibles dianas terapéuticas importantes.

Adicionalmente, los ácidos nucleicos y aminoácidos de la divulgación pueden usarse para producir células recombinantes y mamíferos no humanos transgénicos que son herramientas útiles para el estudio de la acción de ADAM15, y el estudio de la acción de las diversas variantes de la misma (por ejemplo, la variante 1 y la variante 2, y similares), la identificación de novedosos diagnósticos y agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades, trastornos o afecciones asociadas a, o mediadas por, la escisión de Her-2, que incluyen, pero no se limitan a, ciertos cánceres, entre otras cosas. Además, los ácidos nucleicos y aminoácidos de la divulgación pueden usarse diagnósticamente, tanto evaluando el nivel de expresión génica como la expresión de proteínas, para evaluar la gravedad, metástasis y pronóstico de ciertos cánceres. Los ácidos nucleicos y las proteínas de la divulgación también son útiles en el desarrollo de ensayos para evaluar la eficacia de un tratamiento para enfermedades o trastornos asociados a, o caracterizados por, la escisión de Her-2. Es decir, los ácidos nucleicos y polipéptidos de la divulgación pueden usarse para detectar el efecto de diversas terapias sobre la molécula de ADAM15, o variante de la misma, expresión, determinando así la eficacia de las terapias. Así, los ácidos nucleicos y proteínas de la presente divulgación pueden proporcionar herramientas de diagnóstico útiles para, entre otras cosas, cáncer.

III. Vectores

En otros aspectos relacionados, la divulgación incluye un ácido nucleico aislado que codifica una variante de ADAM15 de mamífero operativamente ligada a un ácido nucleico que comprende una secuencia promotora/reguladora de forma que el ácido nucleico sea preferentemente capaz de dirigir la expresión de la proteína codificada por el ácido nucleico. Así, la divulgación engloba vectores de expresión y métodos para la introducción de ADN exógeno en células con expresión concomitante del ADN exógeno en las células tales como aquellas descritas, por ejemplo, en Sambrook y col. (1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York) y en Ausubel y col. (1997, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York).

La expresión de una variante de ADAM15, tanto sola como fusionada con un polipéptido de marca detectable, en células que tanto no expresan normalmente la variante de ADAM15 como que no expresan la variante de ADAM15 fusionada con un polipéptido de marca, puede llevarse a cabo generando un plásmido, vector viral, u otro tipo de vector que comprende el ácido nucleico deseado operativamente ligado a una secuencia promotora/reguladora que sirve para conducir la expresión de la proteína, con o sin marca, en células en las que el vector se introduce. Están disponibles muchas secuencias promotoras/reguladoras útiles para conducir la expresión constitutiva de un gen en la materia e incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, una secuencia potenciadora del promotor temprano inmediato del citomegalovirus, el promotor temprano del SV40, además del promotor del virus del sarcoma de Rous, y similares.

Además, la expresión inducible y específica de tejido del ácido nucleico que codifica WNK puede llevarse a cabo poniendo el ácido nucleico que codifica WNK, con o sin una marca, bajo el control de una secuencia promotora/reguladora inducible o específica de tejido. Ejemplos de secuencias promotoras/reguladoras específicas de tejido o inducibles que son útiles para este fin incluyen, pero no se limitan a, el promotor inducible LTR del MMTV, y el potenciador/promotor tardío del SV40. Además, también se contemplan en la invención promotores que son muy conocidos en la técnica que se inducen en respuesta a inducir agentes tales como metales, glucocorticoides y similares. Así, se apreciará que la divulgación incluye el uso de cualquier secuencia promotora/reguladora, que es tanto conocida como desconocida, y que puede conducir la expresión de la proteína deseada operativamente ligada a la misma.

El expresar la variante de ADAM15 usando un vector permite el aislamiento de grandes cantidades de proteína recombinantemente producida. Además, si una disminución en el nivel de expresión o función de la variante de ADAM15 produce una enfermedad, trastorno o afección asociada a tal expresión, la expresión de la variante de ADAM15 conducida por una secuencia promotora/reguladora puede proporcionar agentes terapéuticos útiles que incluyen, pero no se limitan a, terapia génica por la cual se proporciona la variante de ADAM15. Es decir, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, el experto apreciará que hay situaciones y/o condiciones en las que se desea aumentar la expresión y/o función de ADAM15, y los vectores de ácido nucleico de la presente invención proporcionan un método para así proporcionar la expresión y/o función de la variante de ADAM15 a una célula, tejido o mamífero en necesidad de la misma en el que proporcionaría un beneficio terapéutico entendido por un experto en la materia basándose en la enseñanza proporcionada en el presente documento.

Por tanto, la divulgación incluye no solo métodos para inhibir la expresión, traducción y/o actividad de la variante de ADAM15, sino que también incluye métodos relacionados con aumentar la expresión de la variante de ADAM15, nivel de proteína y/o actividad, ya que tanto disminuir como aumentar la expresión y/o actividad de la variante de ADAM15 pueden ser útil en proporcionar agentes terapéuticos eficaces.

La selección de cualquier vector plasmídico particular u otro vector de ADN no es un factor limitante en la presente divulgación y una amplia variedad de vectores es muy conocida en la técnica. Además, está perfectamente dentro de la experiencia del experto elegir secuencias promotoras/reguladoras particulares y ligar operativamente aquellas secuencias promotoras/reguladoras a una secuencia de ADN que codifica un polipéptido deseado. Tal tecnología es muy conocida en la técnica y se describe, por ejemplo, en Sambrook y col. (1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York) y en Ausubel y col. (1997, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York).

La divulgación incluye así un vector que comprende un ácido nucleico aislado que codifica una variante de ADAM15 de mamífero. La incorporación de un ácido nucleico deseado en un vector y la elección de vectores es muy conocido en la técnica como se describe en, por ejemplo, Sambrook y col. (1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York) y en Ausubel y col. (1997, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York).

La divulgación también incluye células, virus, provirus y similares, que contienen tales vectores. Métodos para producir células que comprenden vectores y/o ácidos nucleicos exógenos son muy conocidos en la técnica y se detallan en, por ejemplo, Sambrook y col. (1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York) y en Ausubel y col. (1997, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York).

Los ácidos nucleicos que codifican la variante de ADAM15 pueden clonarse en diversos vectores plasmídicos. Sin embargo, no debe interpretarse que la presente invención se limita a plásmidos o a cualquier vector particular. En su lugar, debe interpretarse que la presente divulgación engloba una amplia plétora de vectores que están fácilmente disponibles y/o son muy conocidos en la técnica.

IV. Célula recombinante

La divulgación incluye una célula recombinante que comprende, entre otros, un ácido nucleico aislado que codifica variante de ADAM15, un ácido nucleico antisentido complementario a la misma, un ácido nucleico que codifica un anticuerpo que se une específicamente a la variante de ADAM15, y similares. En un aspecto, la célula recombinante puede transfectarse transitoriamente con un plásmido que codifica una porción del ácido nucleico que codifica la variante de ADAM15. El ácido nucleico no necesita integrarse en el genoma de la célula ni necesita expresarse en la célula. Además, la célula puede ser una célula procariota o eucariota y no debe interpretarse que la invención se limita a cualquier línea celular o tipo de célula particular. Tales células incluyen, pero no se limitan a, células de riñón y similares.

Debe interpretarse que la divulgación incluye cualquier tipo de célula en el que se introduce un ácido nucleico que codifica una variante de ADAM15 de mamífero (un transgén), que incluye, sin limitación, una célula procariota y una célula eucariota que comprende un ácido nucleico aislado que codifica la variante de ADAM15 de mamífero.

La divulgación también engloba una célula recombinante en la que una variante de ADAM15 de ácido nucleico diana endógeno se activa por introducción de un ácido nucleico activante exógeno en la célula tal que se exprese el ácido nucleico diana endógeno y/o se produzca la proteína de variante de ADAM15. Tales técnicas de activación de genes son muy conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 6.270.989, entre muchas otras.

Si la célula es una célula eucariota, la célula puede ser cualquier célula eucariota que, cuando el transgén de la invención se introduce en su interior, y la proteína codificada por el gen deseado ya no se expresa en ella, se obtiene un beneficio. Un beneficio tal puede incluir el hecho de que se haya proporcionado un sistema en el que la ausencia de expresión del gen deseado pueda estudiarse *in vitro* en el laboratorio o en un mamífero en el que la célula reside, un sistema en el que las células que comprenden la delección del gen introducida puedan usarse como herramientas de investigación, diagnóstico y terapéutico, y un sistema en el que se generen modelos animales que son útiles para el desarrollo de nuevas herramientas de diagnóstico y terapéuticas para estados de enfermedad seleccionados en un mamífero que incluyen, por ejemplo, cáncer, o cualquier otra enfermedad, trastorno o afección mediada por la escisión por ADAM 15 de Her-2, y similares.

Alternativamente, la divulgación incluye una célula eucariota que, cuando el transgén de la divulgación se introduce en su interior, y la proteína codificada por el gen deseado se expresa en ella, en la que no estaba previamente presente o expresada en la célula o en la que se expresa ahora a un nivel o bajo circunstancias diferentes a aquellas antes de introducir el transgén, se obtiene un beneficio. Un beneficio tal puede incluir el hecho de que se haya proporcionado un sistema en el que la expresión del gen deseado pueda estudiarse *in vitro* en el laboratorio o en un mamífero en el que la célula reside, un sistema en el que las células que comprenden el gen introducido puedan usarse como herramientas de investigación, diagnóstico y terapéutico, y un sistema en el que se generen modelos animales que son útiles para el desarrollo de nuevas herramientas de diagnóstico y terapéuticas para estados de enfermedad seleccionados en un mamífero.

Tal célula que expresa un ácido nucleico aislado que codifica la variante de ADAM15 puede usarse para proporcionar la variante de ADAM15 a una célula, tejido o animal completo en el que un mayor nivel de variante de ADAM15 puede ser útil para tratar o aliviar una enfermedad, trastorno o afección asociada a un bajo nivel de expresión y/o actividad de la variante de ADAM 15. Por tanto, la divulgación incluye una célula que expresa variante de ADAM15 (variante 1, variante 2, o ambas) para aumentar o inducir la expresión, traducción y/o actividad de la variante de ADAM15, en la que aumentar la expresión de la variante de ADAM15, nivel de proteína y/o actividad pueden ser útiles para tratar o aliviar una enfermedad, trastorno o afección, ya que el aumentar la variante de ADAM15 también aumenta la escisión de Her-2 para producir p95.

Un experto habitual apreciaría, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, que un vector "activado" o "inactivado" de la invención comprende al menos dos secuencias homólogas a dos porciones del ácido nucleico que va a sustituirse o delecionarse, respectivamente. Las dos secuencias son homólogas a secuencias que flanquean el gen; es decir, una secuencia es homóloga a una región en o cerca de la porción 5' de la secuencia codificante del ácido nucleico que codifica WNK y la otra secuencia está adicionalmente en la dirección 3' de la primera. Un experto en la materia apreciaría, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, que la presente divulgación no se limita a ninguna secuencia de ácidos nucleicos flanqueante específica. En su lugar, el vector que elige diana puede comprender dos secuencias que eliminan algo o todo de (es decir, un vector "inactivado") o que insertan (es decir, un vector "activado") un ácido nucleico que codifica la variante de ADAM15, o un fragmento de la misma, de o en un genoma de mamífero, respectivamente. La característica crucial del vector que elige diana es que comprende porciones suficientes de las dos secuencias localizadas hacia extremos opuestos, es decir, 5' y 3', de los marcos de lectura abiertos (ORF) de la variante de ADAM15 en el caso de un vector "inactivado", para permitir que se produzca la delección/inserción por recombinación homóloga de forma que todo o una porción del ácido nucleico que codifica la variante de ADAM15 se deleccione de o se inserte en una localización en un cromosoma de mamífero.

El diseño de transgenes y vectores que eligen diana activados e inactivados es muy conocido en la técnica y se describe en tratados convencionales tales como Sambrook y col. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York) y en Ausubel y col. (1997, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York), y similares. Las porciones en la dirección 5' y en la dirección 3' flanqueantes o dentro de la región codificante de la variante de ADAM15 que va a usarse en el vector que elige diana pueden seleccionarse fácilmente basándose en métodos conocidos y siguiendo las enseñanzas desveladas en el presente documento basadas en la divulgación proporcionada en el presente documento que incluye las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos de ambas variantes de la variante 1 y la variante 2 de ADAM15 humana. Provisto de estas secuencias, un experto habitual en la materia sería capaz de construir los transgenes y vectores inactivados de la invención.

La divulgación incluye adicionalmente un vector que elige diana inactivado que comprende un ácido nucleico que codifica un marcador de selección tal como, por ejemplo, un ácido nucleico que codifica el gen neo^R, permitiendo así la selección de una célula transgénica en la que el ácido nucleico que codifica la variante de ADAM15, o una porción de la misma, se ha delecionado y sustituido con el gen de resistencia a neomicina por la capacidad de la célula para crecer en presencia de G418. Sin embargo, no debe interpretarse que la presente invención se limite a resistencia a neomicina como marcador de selección. Más bien, pueden usarse otros marcadores de selección muy conocidos en la técnica en el vector que elige diana inactivado para permitir la selección de células recombinantes en los que el gen de variante de ADAM15 se ha delecionado y/o inactivado y sustituido con el ácido nucleico que codifica el marcador de selección de elección. Métodos de selección e incorporación de un marcador de selección en un vector son muy conocidos en la técnica y se describen en, por ejemplo, Sambrook y col. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York) y en Ausubel y col. (1997, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York).

Un experto en la materia apreciaría, basándose en la presente divulgación, que las células que comprenden niveles disminuidos de la proteína de variante de ADAM15, nivel reducido de la actividad de la variante de ADAM15, o ambos, incluyen, pero no se limitan a, células que expresan inhibidores de la expresión de la variante de ADAM15 (por ejemplo, moléculas antisentido o de ribozima).

Métodos y composiciones útiles para mantener las células de mamífero en cultivo son muy conocidos en la técnica, obteniéndose las células de mamífero de un mamífero que incluye, pero no se limita a, una rata y un ser humano.

La célula recombinante de la divulgación puede usarse para estudiar el efecto de alteraciones cualitativas y cuantitativas en los niveles de variante de ADAM15 en una célula, que incluyen el efecto de escisión reducida de Her-2 en una célula que expresa Her-2. Esto es debido al hecho de que se ha demostrado ahora que ADAM15, y variantes de la misma, median en la escisión de Her-2 para producir p95, en el que p95 está asociado a, o media, en el crecimiento y/o proliferación celular alterados y está correlacionado con, entre otras cosas, metástasis de ciertos cánceres. Además, la célula recombinante puede usarse para producir variante de ADAM15 para su uso para fines terapéuticos y/o de diagnóstico. Es decir, una célula recombinante que expresa la variante de ADAM15 puede usarse para producir grandes cantidades de variante de ADAM15 purificada y aislada que pueden administrarse para tratar o aliviar una enfermedad, trastorno o afección asociada a o producida por un nivel elevado o inapropiado

de variante de ADAM15.

Alternativamente, pueden administrarse células recombinantes que expresan la variante de ADAM15 en terapias *ex vivo* e *in vivo* en las que administrando las células recombinantes se administra así la proteína a una célula, un tejido y/o un animal. Adicionalmente, las células recombinantes son útiles para el descubrimiento de procesos afectados y/o mediados por las variantes de ADAM15. Así, la célula recombinante de la divulgación puede usarse para estudiar los efectos de niveles de la variante de ADAM15 elevados o reducidos en una célula, y similares.

También puede usarse la célula recombinante de la divulgación, en la que la célula se ha manipulado por ingeniería de forma que no exprese la variante de ADAM15, o exprese la variante de ADAM15 reducida o alterada que carece de actividad biológica, en terapias de células *ex vivo* e *in vivo* en las que tanto las propias células de un animal (por ejemplo, células de riñón, y similares) como aquellas de un donante de correspondencia singénica se manipulan recombinantemente por ingeniería como se ha descrito en cualquier parte en el presente documento (por ejemplo, por inserción de un ácido nucleico antisentido, un ARNip, o un vector inactivado de forma que la expresión de la variante de ADAM15 y/o niveles de proteína se reduzcan así en la célula recombinante), y la célula recombinante se administra al animal receptor. De esta forma, células recombinantes que expresan la variante de ADAM15 a un nivel reducido pueden administrarse a un animal cuyas células propias expresan elevados niveles de variante de ADAM15, tratando o aliviando así una enfermedad, trastorno o afección asociada a o mediada por la elevada expresión de la variante de ADAM15 como se ha desvelado en cualquier parte en el presente documento, que incluye, pero no se limita a, una enfermedad, trastorno o afección asociada a, o mediada por, escisión de Her-2 para producir p95 por ADAM15, o una variante de la misma (por ejemplo, variante 1 y variante 2 de ADAM15, entre otras).

V. Anticuerpos

La divulgación también incluye un anticuerpo que se une específicamente a la variante de ADAM15, o un fragmento de la misma.

Un experto en la materia entendería, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, que un anticuerpo que se une específicamente a la variante de ADAM15, se une a una proteína de la invención, tal como, pero no se limita a, la variante 1 humana de ADAM15, variante 2, o una porción inmunogénica de las mismas. En una realización, el anticuerpo se refiere a: variante 1 humana de ADAM15, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2, y variante 2 humana de ADAM15, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 4.

Se generan anticuerpos policlonales inmunizando conejos según técnicas inmunológicas estándar muy conocidas en la técnica (véanse, por ejemplo, Harlow y col., 1988, en: *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY; y Wilson y col., 2001, *Science* 293: 1107-1112). Tales técnicas incluyen inmunizar un animal con una proteína química que comprende una porción de otra proteína tal como una proteína de unión a maltosa o porción de polipéptido de marca de glutatión (GSH), y/o un resto de forma que la porción de la variante de ADAM15 se vuelva inmunogénica (por ejemplo, variante de ADAM15 conjugada con hemocianina de lapa californiana, KLH) y una porción que comprende los residuos de aminoácidos de la variante de ADAM15 respectivos. Las proteínas químicas se producen clonando los ácidos nucleicos apropiados que codifican la variante de ADAM15 (por ejemplo, SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 2) en un vector plasmídico adecuado para este fin, tal como, pero no se limita a, pMAL-2 o pCMX.

Sin embargo, no debe interpretarse que la divulgación esté limitada únicamente a estos anticuerpos o a estas porciones de los antígenos de proteína. Más bien, debe interpretarse que la invención incluye otros anticuerpos, ya que ese término se define en cualquier parte en el presente documento, para la variante de ADAM15 humana, o porciones de la misma. Además, debe interpretarse que la presente divulgación engloba anticuerpos, entre otras cosas, que se unen a la variante de ADAM15 y pueden unirse a la variante de ADAM15 presente en transferencias Western, en tinción inmunohistoquímica de tejidos, localizando así la variante de ADAM15 en los tejidos, y en microscopía de inmunofluorescencia de una célula transfectada transitoriamente con un ácido nucleico que codifica al menos una porción de la variante de ADAM15.

Un experto en la materia apreciaría, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, que el anticuerpo puede unirse específicamente a cualquier porción de la proteína y la proteína de longitud completa puede usarse para generar anticuerpos específicos para ella. Sin embargo, la presente divulgación no se limita a usar la proteína de longitud completa como inmunógeno. Más bien, la presente divulgación incluye usar una porción inmunogénica de la proteína para producir un anticuerpo que se une específicamente a la variante de ADAM15 de mamífero. Es decir, la divulgación incluye inmunizar un animal usando una porción inmunogénica, o determinante antigénico, de la proteína de variante de ADAM15.

Los anticuerpos pueden producirse inmunizando un animal tal como, pero no se limita a, un conejo o un ratón, con una proteína de la invención, o una porción de la misma, o inmunizando un animal usando una proteína que comprende al menos una porción de proteína de variante de ADAM15, o una proteína de fusión que incluye una porción de polipéptido de marca que comprende, por ejemplo, una porción de polipéptido de marca de proteína de

unión a maltosa, covalentemente unida a una porción que comprende los residuos de aminoácidos de la variante de ADAM15 apropiados. Un experto en la materia apreciaría, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, que también pueden usarse fragmentos más pequeños de estas proteínas para producir anticuerpos que se unen específicamente a una variante de ADAM15.

Un experto en la materia apreciaría, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, que pueden usarse diversas porciones de un polipéptido de variante de ADAM15 aislado para generar anticuerpos para tanto regiones de variante de ADAM15 conservadas como para regiones del polipéptido no conservadas. Como se ha desvelado en cualquier parte en el presente documento, ADAM15 comprende diversos dominios conservados.

Una vez provisto de la secuencia de WNK y el análisis detallado que localiza los diversos dominios conservados y no conservados de la proteína, el experto entendería, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, cómo obtener anticuerpos específicos para las diversas porciones de un polipéptido ADAM15 de mamífero usando métodos muy conocidos en la técnica o que van a desarrollarse.

Además, el experto, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, apreciaría que las regiones no conservadas de una proteína de interés pueden ser más inmunogénicas que las regiones altamente conservadas que se conservan entre diversos organismos. Además, la inmunización usando una porción inmunogénica no conservada puede producir anticuerpos específicos para la región no conservada, produciendo así anticuerpos que no reaccionan de forma cruzada con otras proteínas que pueden compartir una o más porciones conservadas. Así, un experto en la materia apreciaría, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, que las regiones no conservadas de cada molécula de ADAM15 pueden usarse para producir anticuerpos que son específicos solo para esa ADAM15 y no reaccionan de forma cruzada no específicamente con otras ADAM15 o con otras proteínas. Más específicamente, el experto, una vez provisto de las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, apreciaría fácilmente que pueden producirse anticuerpos que reaccionan con la variante 1 de ADAM15, pero no con la variante 2, y viceversa.

Alternativamente, el experto también entendería, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, que los anticuerpos desarrollados usando una región que se conserva entre una o más moléculas de ADAM15 pueden usarse para producir anticuerpos que reaccionan específicamente con una o más moléculas de ADAM15. Es decir, una vez provisto de las secuencias desveladas en el presente documento, un experto en la materia podría preparar fácilmente, usando métodos muy conocidos en la técnica, anticuerpos que se unen específicamente a la variante 1 de ADAM15 y a la variante 2 de ADAM15. Los métodos para producir anticuerpos que se unen específicamente a un dominio de proteína conservada, que puede ser por lo demás menos inmunogénicos que otras porciones de la proteína, son muy conocidos en la técnica y se han tratado previamente, e incluyen, pero no se limitan a, conjugar el fragmento de proteína de interés con una molécula (por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, y similares), convirtiendo así el dominio de proteína en inmunogénico, o por el uso de adyuvantes (por ejemplo, adyuvante completo y/o incompleto de Freund, y similares), o ambos. Así, la invención engloba anticuerpos que reconocen al menos una variante de ADAM15 y anticuerpos que se unen específicamente con más de una variante de ADAM15, que incluyen anticuerpos que se unen específicamente a todas las variantes de ADAM15 de la invención.

Un experto en la materia apreciaría, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, que las porciones de la variante de ADAM15 son menos homólogas a otras proteínas que comparten dominios conservados. Sin embargo, la presente divulgación no se limita a ningún dominio particular; en su lugar, el experto entendería que pueden usarse otras regiones no conservadas de las proteínas de variante de ADAM15 de la divulgación para producir los anticuerpos de la invención como se ha desvelado en el presente documento.

Por tanto, el experto apreciaría, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, que la presente divulgación engloba anticuerpos que neutralizan y/o inhiben la actividad de la variante de ADAM15 (por ejemplo, inhibiendo las interacciones de variante de ADAM15/proteína Her-2/proteína necesarias) cuyos anticuerpos pueden reconocer una o más variantes de ADAM15, que incluyen, pero no se limitan a, la variante 1 humana de ADAM15, la variante 2 de ADAM15, además de ADAM15 de diversas especies (por ejemplo, ratón, primates no humanos).

Un experto en la materia también entendería, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, que puede ser ventajoso inhibir la actividad y/o expresión de un tipo de molécula de variante de ADAM15 sin afectar la actividad y/o expresión de otras variantes de ADAM15 u otras moléculas de ADAM15. Por ejemplo, puede ser beneficioso inhibir la expresión de la variante 1 de ADAM15, mientras que no se inhibe la expresión y/o actividad de la variante 2 de ADAM15, u otra ADAM15, en otros tejidos en los que el nivel existente de variante 2 de ADAM15, u otras ADAM15, en estos otros tejidos es necesaria para el apropiado funcionamiento continuado de los procesos celulares en ese tejido. Así, si la inhibición de la expresión y/o actividad de ADAM15 se logra usando anticuerpos, ácidos nucleicos antisentido y similares, un experto en la materia apreciaría, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, que la presente invención engloba selectivamente afectar una o más moléculas de ADAM15 y, en ciertos casos, la invención engloba inhibir la expresión o actividad de todas las moléculas de ADAM15. Si una o más moléculas de ADAM15 deben afectarse, puede determinarse fácilmente por el

experto basándose en esa enfermedad, trastorno o afección que está tratándose, y la célula y/o tejido específico que se elige como diana.

La divulgación no debe interpretarse como que está limitada únicamente a los anticuerpos desvelados en el presente documento o a cualquier porción inmunogénica particular de las proteínas de la invención. Más bien, debe interpretarse que la invención incluye otros anticuerpos, ya que ese término se define en cualquier parte en el presente documento, para la variante de ADAM15, o porciones de la misma, o para proteínas que comparten más del 70 % de homología con un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de al menos una de SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 4. Preferentemente, el polipéptido es aproximadamente el 80 % homólogo, más preferentemente aproximadamente el 90 % homólogo, incluso más preferentemente aproximadamente el 95 % homólogo, y lo más preferentemente aproximadamente el 99 % homólogo a al menos una de la variante 1 humana de ADAM15 (SEC ID N°: 2) y la variante 2 humana de ADAM15 (SEC ID N°: 4). Más preferentemente, el polipéptido que se une específicamente a un anticuerpo específico para la variante de ADAM15 de mamífero es al menos uno de la variante 1 humana de ADAM15 y la variante 2 humana de ADAM15. Lo más preferentemente, el polipéptido que se une específicamente a un anticuerpo que se une específicamente a una variante de ADAM15 de mamífero es al menos uno de SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 4.

La divulgación engloba anticuerpos policlonales, monoclonales, sintéticos y similares. Un experto en la materia entendería, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, que la característica crucial del anticuerpo de la divulgación es que el anticuerpo se une específicamente a la variante de ADAM15. Es decir, el anticuerpo de la divulgación reconoce la variante de ADAM15, o un fragmento de la misma (por ejemplo, una porción inmunogénica o determinante antigénico de la misma), en transferencias Western, en inmunotinción de células e inmunoprecipita la variante de ADAM15 usando métodos convencionales muy conocidos en la técnica.

Un experto en la materia apreciaría, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, que los anticuerpos pueden usarse para localizar la proteína relevante en una célula y para estudiar la(s) función (funciones) del antígeno así reconocido en procesos celulares. Además, los anticuerpos pueden usarse para detectar y o medir la cantidad de proteína presente en una muestra biológica usando métodos muy conocidos tales como, pero no se limitan a, transferencia Western y enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA). Además, los anticuerpos pueden usarse para inmunoprecipitar y/o purificar por inmutafinidad su antígeno relacionado usando métodos muy conocidos en la técnica. Además, el anticuerpo puede usarse para reducir el nivel de variante de ADAM15 en una célula, inhibiendo así el (los) efecto(s) de la variante de ADAM15 en una célula. Así, administrando el anticuerpo a una célula o a los tejidos de un animal o al mismo animal, las interacciones de la variante de ADAM15/proteína Her-2/proteína requeridas son, por tanto, inhibidas, de forma que también se inhibe el efecto de la actividad mediada por la variante de ADAM15. Un experto en la materia entendería, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, que los efectos detectables tras inhibir la interacción y/o actividad de la variante de ADAM15/proteína Her-2/proteína usando un anticuerpo anti-variante de ADAM15 pueden incluir, pero no se limitan a, escisión reducida de Her-2, eliminación reducida del ectodominio de Her-2, nivel reducido de p95, nivel reducido de procesos mediados por p95 y similares.

Un experto en la materia apreciaría, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, que la invención engloba administrar un anticuerpo que se une específicamente a la variante de ADAM15 por vía oral, parenteralmente, o ambas, para inhibir la función de la variante de ADAM15 en escindir Her-2.

La generación de anticuerpos policlonales se lleva a cabo inoculando el animal deseado con el antígeno y aislando los anticuerpos que se unen específicamente al antígeno del mismo usando métodos de producción de anticuerpos estándar tales como aquellos descritos en, por ejemplo, Harlow y col. (1988, en: *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY).

Pueden prepararse anticuerpos monoclonales dirigidos contra los fragmentos de longitud completa o de péptidos de una proteína o péptido usando cualquier procedimiento de preparación de anticuerpos monoclonales muy conocido, tales como aquellos descritos, por ejemplo, en Harlow y col. (1988, en: *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY) y en Tuszynski y col. (1988, *Blood*, 72:109-115). También pueden sintetizarse cantidades del péptido deseado usando tecnología de síntesis química. Alternativamente, el ADN que codifica el péptido deseado puede clonarse y expresarse a partir de una secuencia promotora apropiada en células adecuadas para la generación de grandes cantidades de péptido. Se generan anticuerpos monoclonales dirigidos contra el péptido a partir de ratones inmunizados con el péptido usando procedimientos convencionales como se enumera en el presente documento.

El ácido nucleico que codifica el anticuerpo monoclonal obtenido usando los procedimientos descritos en el presente documento puede clonarse y secuenciarse usando tecnología que está disponible en la materia, y se describe, por ejemplo, en Wright y col. (1992, *Critical Rev. Immunol.* 12:125-168), y las referencias citadas en su interior.

Además, el anticuerpo de la divulgación puede "humanizarse" usando la tecnología descrita en, por ejemplo, Wright y col. (1992, *Critical Rev. Immunol.* 12:125-168), y en las referencias citadas en su interior, y en Gu y col. (1997, *Thrombosis and Hematocyst* 77:755-759), y otros métodos de humanizar anticuerpos muy conocidos en la técnica o que van a desarrollarse.

Para generar una biblioteca de anticuerpos en fago, primero se obtiene una biblioteca de ADNc a partir del ARNm que se aísla de células, por ejemplo, el hibridoma, que expresa la proteína deseada que va a expresarse en la superficie del fago, por ejemplo, el anticuerpo deseado. Se producen copias de ADNc del ARNm usando transcriptasa inversa. Se obtiene ADNc que especifica fragmentos de inmunoglobulina por PCR y el ADN resultante se clona en un vector de bacteriófago adecuado para generar una biblioteca de ADN de bacteriófago que comprende ADN que especifica genes de inmunoglobulina. Los procedimientos para preparar una biblioteca de bacteriófagos que comprenden ADN heterólogo son muy conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Sambrook y col., (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York).

El bacteriófago que codifica el anticuerpo deseado puede manipularse de forma que la proteína se exprese en la superficie del mismo de tal manera que esté disponible para unirse a su proteína de unión correspondiente, por ejemplo, el antígeno contra el que se dirige el anticuerpo. Así, cuando el bacteriófago que expresa un anticuerpo específico se incubaba en presencia de una célula que expresa el antígeno correspondiente, el bacteriófago se unirá a la célula. El bacteriófago que no expresa el anticuerpo no se unirá a la célula. Tales técnicas de inmunopurificación son muy conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en Wright y col. (1992, Critical Rev. Immunol. 12:125-168).

Se han desarrollado procesos tales como aquellos descritos anteriormente para la producción de anticuerpos humanos usando expresión en bacteriófago M13 (Burton y col., 1994, Adv. Immunol. 57:191-280). Esencialmente, se genera una biblioteca de ADNc a partir de ARNm obtenido de una población de células productoras de anticuerpo. El ARNm codifica genes de inmunoglobulina reordenados y así el ADNc codifica los mismos. El ADNc amplificado se clona en vectores de expresión M13 que crean una biblioteca de fago que expresa fragmentos Fab humanos sobre su superficie. Los fagos que expresan el anticuerpo de interés se seleccionan por la unión a antígeno y se propagan en bacterias para producir inmunoglobulina Fab humana soluble. Así, a diferencia de la síntesis de anticuerpos monoclonales convencional, este procedimiento inmortaliza ADN que codifica inmunoglobulina humana en vez de células que expresan inmunoglobulina humana.

Los procedimientos que se acaban de presentar describen la generación de fago que codifica la porción Fab de una molécula de anticuerpo. Sin embargo, no debe interpretarse que la invención se limite únicamente a la generación de fago que codifica anticuerpos Fab. Más bien, el fago que codifica anticuerpos monocatenarios (bibliotecas de scFv/anticuerpo de fago) también está incluido en la invención. Las moléculas de Fab comprenden la cadena ligera de Ig entera, es decir, comprenden tanto la región variable como constante de la cadena ligera, pero solo incluyen la región variable y el primer dominio de la región constante (CH1) de la cadena pesada. Las moléculas de anticuerpo monocatenario comprenden una única cadena de proteína que comprende el fragmento Fv de Ig. Un fragmento Fv de Ig incluye solo las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo, que no tienen región constante contenida en él. Pueden generarse bibliotecas de fagos que comprenden ADN de scFv siguiendo los procedimientos descritos en Marks y col. (1991, J. Mol. Biol. 222:581-597). La inmunopurificación de fago así generado para el aislamiento de un anticuerpo deseado se realiza de un modo similar al descrito para las bibliotecas de fagos que comprenden ADN de Fab.

También debe interpretarse que la divulgación incluye bibliotecas de expresión en fago sintéticas en las que las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras pueden sintetizarse de forma que incluyan casi todas las posibles especificidades (Barbas, 1995, Nature Medicine 1:837-839; de Kruif y col. 1995, J. Mol. Biol. 248:97-105).

Además de administrar un anticuerpo a una célula para inhibir la actividad y/o expresión de la variante de ADAM15 de mamífero, la divulgación engloba administrar un anticuerpo que se une específicamente a un variante de ADAM15 de mamífero, o un ácido nucleico que codifica el anticuerpo, en el que la molécula comprende además una secuencia de retención intracelular de forma que el anticuerpo se una a la variante de ADAM15 y prevenga su expresión en la superficie celular, o en otras localizaciones en todo el medio subcelular. Tales anticuerpos, frecuentemente denominados "intracuerpos", son muy conocidos en la técnica y se describen en, por ejemplo, Marasco y col. (patente de EE.UU. nº 6.004.490) y Beerli y col. (1996, Breast Cancer Research and Treatment 38:11-17). Así, la invención engloba métodos que comprenden inhibir la unión de la variante de ADAM15 a una molécula de Her-2, previniéndose así la escisión de Her-2 por la variante de ADAM15 usando métodos que comprenden, entre otras cosas, anticuerpos, compuestos químicos, moléculas pequeñas, peptidomiméticos, fármacos y similares, además de métodos para inhibir la escisión inhibiendo la expresión o el tráfico intracelular de la variante de ADAM15 usando, entre otras cosas, inhibir la variante de ADAM15 que está presente sobre la superficie celular (por ejemplo, métodos que comprenden ribozimas, moléculas antisentido, intracuerpos y similares), y tales métodos como se conocerán en el futuro para inhibir la interacción proteína/proteína sobre la superficie celular entre variante de ADAM15 y Her-2.

VI. Métodos y composiciones relacionadas con la identificación de la función de ADAM en la escisión de Her-2

Ahora se trata la importancia del descubrimiento de los solicitantes de la escisión de Her-2 por ADAM, tal como ADAM10 o ADAM15, y ahora se describen métodos, composiciones y kits relacionados con este logro crucial del siguiente modo.

Métodos relacionados con la inhibición de la escisión por ADAM10/15 de Her-2

Como se trata en detalle en cualquier parte en el presente documento, se ha encontrado que Her-2 desempeña una función en varios carcinomas humanos. Sin desear ceñirse a teoría particular alguna, un mecanismo propuesto por el que Her-2 puede desempeñar una función en el cáncer puede ser por escisión del receptor de Her-2 para formar el receptor constitutivamente activo asociado a la membrana p95. La presencia de p95 se ha correlacionado con formas agresivas de cáncer de mama, además de formas de cáncer de mama que es más probable que se vuelvan a repetir. Por tanto, métodos y composiciones que pueden inhibir la producción de p95 *in vivo* pueden ser útiles en el tratamiento y/o prevención de ciertos tipos de cáncer. Se ha sugerido que la escisión de Her-2 produce una punta de p95 constitutivamente activa de Her-2 y que la elevada señalización asociada o mediada por la punta desempeña una función en la metástasis de células tumorales y está asociada a un mal desenlace clínico en cánceres relacionados con tumores que expresan en exceso Her-2. Sin embargo, no se sabía, hasta la presente invención, qué proteína, o proteínas, mediaban en la escisión de Her-2 para producir un ECD, y, lo que es más importante, para producir la punta de p95 asociada a la célula. Esto fue un obstáculo para el desarrollo de posibles tratamientos y modalidades terapéuticas, ya que la "diana" para la terapia no se había identificado y, por tanto, la terapia no podía limitarse a ninguna diana particular de manera que se limitara cualquier efecto no deseado sobre procesos no relacionados.

La presente invención proporciona, por primera vez, la identificación de una proteína que media en la escisión de Her-2 para producir p95 (además de ECD), denominada en el presente documento "convertasa". Las proteínas identificadas pertenecen a la familia de ADAM. Los miembros de la familia de ADAM de proteínas son conocidos por desempeñar diversas funciones en una célula. Además, se ha mostrado que varias ADAM conocidas tienen actividad de metaloproteasa y tienen secuencias consenso para dominios de metaloproteasa activos. Sin embargo, hasta la presente invención, no se había demostrado que una ADAM, más específicamente ADAM10 y ADAM15, mediara en la eliminación de Her-2 asociada a, entre otras cosas, cáncer.

La divulgación proporciona un método para prevenir la escisión de Her-2 en la que Her-2 está asociada a una célula. Esto es debido a que los datos desvelados en el presente documento demuestran que varias proteínas ADAM se expresan en diversas líneas celulares que contienen Her-2. Tales líneas celulares incluyen, pero no se limitan a, las líneas celulares que eliminan Her-2 BT474, SKOV3, SKBR3, MDA, MCF7 y T47D. Ventajosamente, la presente invención proporciona métodos para la inhibición de la escisión de Her-2 mediada por ADAM en líneas celulares que contienen Her-2. Los datos desvelados en el presente documento demuestran, por primera vez, que la inhibición o abolición de ADAM10 y/o ADAM15 reduce inesperadamente la eliminación de Her-2 en células. Es decir, se ha encontrado que poner en contacto una célula que expresa en exceso Her-2 que contiene ADAM10, ADAM15, o ambas, con un inhibidor de tal ADAM reduce detectablemente la eliminación del ectodominio de Her-2 ECD-105, y por tanto, se inhibe detectablemente la producción de Her-2 de p95.

La invención proporciona además usos para prevenir la escisión de Her-2 *in vivo*. Los datos proporcionados en el presente documento muestran que la inhibición de la escisión de Her-2 *in vivo* está asociada a la inhibición del crecimiento tumoral. Los datos proporcionan adicionalmente que los inhibidores de ADAM solo median en la inhibición de la escisión de Her-2 *in vivo*, inhibición del crecimiento tumoral e inhibición *in vivo* de rutas de señalización de cinasas. Por consiguiente, la inhibición de la escisión de Her-2 *in vivo* puede ser útil en el tratamiento del cáncer.

Por tanto, es una característica de la presente invención proporcionar usos para prevenir la escisión de Her-2 para formar p95 en una célula, *in vitro* o *in vivo*. Como se trata en cualquier parte en el presente documento, la prevención de la formación de p95 puede ser útil en controlar el crecimiento celular y en el tratamiento del cáncer. Los datos desvelados en el presente documento demuestran, entre otras cosas, que la eliminación de Her-2, la proliferación celular y el crecimiento tumoral se inhiben cuando una célula se pone en contacto con una cantidad inhibidora de la escisión de Her-2 de un inhibidor de ADAM10, ADAM15, o ambas. Como entenderá un experto en la materia, una "cantidad inhibidora de la escisión de Her-2" de un inhibidor de ADAM es una cantidad de un inhibidor tal que reduce detectablemente la escisión de Her-2 como se demuestra disminuyendo detectablemente el nivel de p95, ECD de p105, o ambos. Como se describe en mayor detalle en cualquier parte en el presente documento, prevenir la escisión de Her-2 para formar p95 es útil cuando los efectos de la "punta" de p95 constitutivamente activa no se desean, o se busca eliminarlos.

Un experto en la materia apreciaría, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, que cuando una célula o tejido produce tanto ADAM10 como ADAM15, y/o cuando la producción de p95 está mediada por ambas ADAM, que un inhibidor de cada una puede administrarse, tanto simultáneamente como por separado, a la célula o tejido. Alternativamente, el experto entendería que cuando un inhibidor inhibe tanto ADAM10 como ADAM15, un inhibidor tal puede usarse para inhibir la escisión de Her-2 para producir p95. Además, el experto apreciaría, basándose en las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, que pueden administrarse diversas combinaciones de inhibidores para inhibir la actividad de convertasa, y la presente invención no está limitada de ningún modo con respecto a la administración de uno o cualquier número y combinación de inhibidores de ADAM.

Un inhibidor de la escisión de Her-2 por ADAM es un inhibidor del polipéptido ADAM. Un inhibidor de un polipéptido ADAM10 o ADAM15, o ambos, pueden ser un ácido nucleico, un polipéptido, o cualquier otra molécula o compuesto conocido por un experto en la materia relevante por ser útil para la inhibición de la actividad mediada por proteína. Además, un inhibidor de ADAM pueden ser un ácido nucleico antisentido, una ribozima, un anticuerpo o un inhibidor de molécula pequeña. Aunque la presente divulgación se ejemplifica por inhibición de la actividad de ADAM usando una molécula de ARNip, la invención no se limita a esto, o cualquier otro inhibidor de la escisión de Her-2. De hecho, también se han desvelado novedosos MPI en cualquier parte en el presente documento, que pueden usarse para inhibir la escisión por convertasa de Her-2. Así, un experto en la materia apreciaría, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, que la invención no se limita de ninguna forma a estos, o cualquier otro inhibidor de convertasa. Más bien, la invención incluye cualquier inhibidor de ADAM, como se define en las reivindicaciones, que disminuye detectablemente la escisión de Her-2 para producir p95, que incluye cualquiera que vaya a desarrollarse en el futuro como se entendería basándose en las enseñanzas proporcionadas en el presente documento. Más específicamente, la invención incluye cualquier inhibidor MPI de ADAM10, ADAM15, o un inhibidor que inhibe ambas.

Como se describe en cualquier parte en el presente documento, ADAM comprende un dominio de metaloproteasa, y se ha demostrado en el presente documento que tiene actividad de metaloproteasa. Los miembros de la familia de ADAM son proteasas de cinc que comprenden péptido señal de NH₂, pro-dominio, dominio catalítico, dominio de desintegrina, región rica en cisteína, repetición de EGF, región transmembrana, cola citoplásmica. ADAM10 y ADAM15 son ambas proteínas membrana de tipo I y su dominio de proteasa catalíticamente activo está localizado extracelularmente. Este dominio catalítico extracelular pone la actividad de proteasa en yuxtaposición con la región de Her-2 escindida durante la eliminación del ectodominio. Por tanto, un inhibidor de ADAM útil en la presente invención es un inhibidor de la actividad biológica de ADAM (por ejemplo, ADAM10 y ADAM15) en el que tal "actividad biológica" incluye, pero no se limita a, escisión de Her-2, y más particularmente, la escisión de Her-2 para formar p95, ECD, o ambos. Debido a que la escisión de Her-2 para formar p95 participa en el presente documento desempeñando una función en la progresión del cáncer en células que expresan en exceso Her-2, la actividad biológica de ADAM10 o ADAM15, como se usa en el presente documento, también engloba el potencial de inhibir el crecimiento celular, inducir muerte celular y otro efecto anticarcinogénico.

La presente invención caracteriza métodos para inhibir la escisión de Her-2 en una célula que comprende Her-2, *in vitro* o *in vivo*. Como se expone en detalle en cualquier parte en el presente documento, la escisión de Her-2 produce p95 y ECD105 y, basándose en los datos desvelados por primera vez en el presente documento, p95 participa desempeñando posteriormente una función en el desarrollo y la progresión del cáncer. Por tanto, un experto en la materia entendería, basándose en la divulgación en el presente documento, que la inhibición de la escisión de Her-2 reprimirá la producción de p95 y procesos carcinogénicos concomitantes. La reducción de la producción de p95 es útil para la prevención de cualquier afección o trastorno asociado a elevada señalización de Her-2/p95. Por ejemplo, como se desvela en detalle en cualquier parte en el presente documento, la expresión en exceso de Her-2 se produce en el 25-30 % de los cánceres de mama. Los pacientes con tumores que expresan en exceso Her-2 tienen una evolución clínica claramente desfavorable, caracterizada por tiempo acortado hasta la reaparición de la enfermedad y supervivencia reducida. Por tanto, la represión de la producción de p95 puede inhibir y/o disminuir la señalización basada en Her-2/p95, minimizando posteriormente la evolución clínica desfavorable de la enfermedad mediada por Her-2/p95.

En una realización de la presente divulgación, una célula que contiene Her-2 se pone en contacto con un inhibidor de ADAM (por ejemplo, ADAM10, ADAM15, o ambas) que puede inhibir la escisión de Her-2. Como entenderá un experto en la materia, un inhibidor de ADAM que presenta la capacidad para inhibir la escisión de Her-2, es decir, un inhibidor de la producción de p95, puede identificarse usando métodos muy conocidos en la técnica, que incluyen aquellos descritos en cualquier parte en el presente documento. A modo de un ejemplo no limitante, un inhibidor de la escisión de Her-2 puede identificarse monitorizando la escisión de Her-2 en un primer sistema en el que se proporciona ADAM10, o ADAM15, o ambas, en presencia de un supuesto inhibidor de ADAM inhibidor de la escisión de Her-2, y comparando los resultados obtenidos en el primer sistema con los resultados obtenidos de un segundo sistema en el que se proporciona la misma ADAM en ausencia de cualquier inhibidor de ADAM inhibidor de la escisión de Her-2. La inhibición de la escisión de Her-2 en el primer sistema puede identificarse usando numerosos métodos de análisis, que incluyen aquellos métodos de identificación de la escisión de Her-2/producción de p95-ECD105 expuestos en detalle en cualquier parte en el presente documento, seguido de una comparación diferencial de los resultados obtenidos en el primer y segundo sistemas experimentales descritos inmediatamente anteriormente. La presencia de una menor cantidad de p95 (o ECD105) en el supuesto sistema que contiene el inhibidor de ADAM que en el sistema que carece de cualquier supuesto inhibidor de ADAM es una indicación de que el supuesto inhibidor de ADAM funciona inhibiendo la escisión de Her-2 y la producción de p95 mediante la inhibición de ADAM10, 15, o ambas. Evaluando la capacidad del inhibidor para inhibir ADAM10 y ADAM15 por separado, puede determinarse adicionalmente que ADAM se inhibe por el inhibidor y si el inhibidor inhibe o no la escisión de Her-2 por ambas ADAM.

Una realización de la divulgación proporciona un método para inhibir la escisión de Her-2, en el que ADAM10 es el agente que escinde Her-2. La inhibición de la escisión de Her-2 mediada por ADAM10 se confirma usando cualquier método expuesto en el presente documento para el análisis de la inhibición de la escisión de Her-2. Sin desear

ceñirse a teoría particular alguna, la inhibición de la escisión de Her-2 mediada por ADAM10 puede producirse de varias formas. En un aspecto de la divulgación, la escisión por ADAM10 de Her-2 puede inhibirse por un inhibidor de ADAM10 que se une a ADAM10, previniéndose así la interacción de ADAM10 con Her-2 previniéndose el contacto necesario de ADAM10 con Her-2. Alternativamente, la escisión por ADAM10 de Her-2 puede inhibirse por un inhibidor de ADAM10 que se une a ADAM10 y altera la estructura de ADAM10, inhibiéndose o reduciéndose así la interacción de ADAM10 con Her-2. Adicionalmente, la escisión por ADAM10 de Her-2 puede inhibirse por un inhibidor de ADAM10 que se une a ADAM10 e inhibe la actividad proteolítica de ADAM10, previniéndose así la acción proteolítica de ADAM10 en Her-2.

Similarmente, otra realización de la divulgación proporciona un método para inhibir la escisión de Her-2, en el que ADAM15 es el agente que escinde Her-2. La inhibición de la escisión de Her-2 mediada por ADAM15 se confirma usando cualquier método expuesto en el presente documento para el análisis de la inhibición de la escisión de Her-2. Sin desear ceñirse a teoría particular alguna, la inhibición de la escisión de Her-2 mediada por ADAM15 puede producirse de varias formas. En un aspecto de la divulgación, la escisión de Her-2 por ADAM15 puede inhibirse por un inhibidor de ADAM15 que se une a ADAM15, previniéndose así la interacción de ADAM15 con Her-2 previniéndose el contacto necesario de ADAM15 con Her-2. Alternativamente, la escisión de Her-2 por ADAM15 puede inhibirse por un inhibidor de ADAM15 que se une a ADAM15 y altera la estructura de ADAM15, inhibiéndose o reduciéndose así la interacción de ADAM15 con Her-2. Adicionalmente, la escisión de Her-2 por ADAM15 puede inhibirse por un inhibidor de ADAM15 que se une a ADAM15 e inhibe la actividad proteolítica de ADAM15, previniéndose así la acción proteolítica de ADAM15 en Her-2.

La divulgación no se limita a un inhibidor que afecta ADAM para inhibir la escisión de Her-2. En su lugar, la invención incluye un inhibidor que se une a Her-2 para inhibir la escisión de Her-2 por la ADAM, inhibiéndose así la producción de p95, ECD de p105, o ambos. Por consiguiente, otra realización de la divulgación proporciona un método para inhibir la escisión de Her-2 mediada por ADAM10 o ADAM15, en la que la interacción de ADAM10, ADAM15, o ambas, y Her-2 se previene mediante un inhibidor de ADAM que se une a Her-2. En otro aspecto más de la invención, la escisión de Her-2 por ADAM10 o ADAM15 puede inhibirse por un inhibidor de ADAM10 o ADAM15 que se une a Her-2, previniéndose así la interacción de ADAM10 o ADAM15 con Her-2 previniéndose el contacto directo de ADAM10 o ADAM15 con Her-2. En otro aspecto de la divulgación, la escisión de Her-2 por ADAM10 o ADAM15 puede inhibirse por un inhibidor de ADAM que se une a Her-2 y altera la estructura de Her-2, previniéndose así la interacción de ADAM10, ADAM15, o ambas, con Her-2.

En una realización de la divulgación, la ADAM es una ADAM10 de mamífero. Como entenderá un experto en la materia, una ADAM10 de mamífero puede estar presente en una célula de mamífero. Adicionalmente, una ADAM10 de mamífero puede estar presente en una célula de no mamífero. Por ejemplo, un método de la presente divulgación incluye un ácido nucleico que codifica una ADAM10 de mamífero transformada o transfectada en cualquier célula de no mamífero conocida para un experto en la materia por ser útil para la expresión de proteínas no nativas o exógenas.

En una realización de la divulgación, la ADAM es una ADAM15 de mamífero. Como entenderá un experto en la materia, una ADAM15 de mamífero puede estar presente en una célula de mamífero. Adicionalmente, una ADAM15 de mamífero puede estar presente en una célula de no mamífero. Por ejemplo, un método de la presente divulgación incluye un ácido nucleico que codifica una ADAM15 de mamífero transformada o transfectada en cualquier célula de no mamífero conocida para un experto en la materia por ser útil para la expresión de proteínas no nativas o exógenas.

En algunas realizaciones de la divulgación, la ADAM es una ADAM10 de mamífero o una ADAM15 de mamífero. Como entenderá un experto en la materia, tanto ADAM10 como ADAM15 de mamífero pueden estar presentes en una célula de mamífero. Adicionalmente, tanto ADAM10 como ADAM15 de mamífero pueden estar presentes en una célula de no mamífero. Por ejemplo, un método de la presente invención incluye introducir (por ejemplo, co-transformar, co-transfectar, co-transducir, activación génica y similares) un ácido nucleico que codifica una ADAM10 de mamífero y un ácido nucleico que codifica una ADAM15 de mamífero en cualquier célula de no mamífero conocida para un experto en la materia por ser útil para la expresión de proteínas no nativas o exógenas de forma que ambas ADAM estén presentes y se expresen en la misma célula en la que no estuvieron previamente presentes y/o se expresaron.

La presente divulgación también caracteriza un método para inhibir la producción de p95 por una célula. En una realización de la invención, una célula se pone en contacto con una cantidad inhibidora de la escisión de un inhibidor de ADAM, inhibiéndose así la escisión de Her-2 para producir p95. Una "cantidad inhibidora de la escisión" de un inhibidor se define en el presente documento como una cantidad del inhibidor suficiente para producir un nivel detectablemente menor de p95 en la célula que expresa Her-2 cuando se compara con la producción de p95 por una célula por lo demás idéntica no puesta en contacto con el compuesto o con la misma célula antes de que la célula se ponga en contacto con el compuesto.

La presente divulgación también caracteriza un método para inhibir la producción de p95 en la que Her-2 no está asociada a una célula. Los métodos de aislamiento, purificación, estabilización y solubilización de proteínas

asociadas a célula que existen sin asociar a una célula son muy conocidos en la técnica, y no se tratarán adicionalmente. Por tanto, un experto en la materia relevante sabrá cómo preparar y usar proteínas Her-2 y ADAM10, ADAM15, o ambas, cuando las proteínas no están asociadas a una célula intacta (por ejemplo, solubilizada, entre otras cosas) según los métodos de la presente invención.

En una realización de la divulgación, una molécula de Her-2 se pone en contacto con una cantidad inhibidora de la escisión de un inhibidor en una mezcla que comprende una convertasa (por ejemplo, ADAM10, ADAM15, o ambas), inhibiéndose así la escisión de Her-2 para producir p95. Una "cantidad inhibidora de la escisión" de un inhibidor se define en el presente documento como una cantidad del inhibidor suficiente para producir un menor nivel de p95 en una mezcla de reacción que contiene convertasa de ADAM (ADAM 10, 15, o ambas), Her-2 y el inhibidor, en comparación con el nivel de p95 en una mezcla de reacción por lo demás idéntica que no contiene el inhibidor.

En un aspecto de la divulgación, el inhibidor es un inhibidor de ADAM10, ADAM15, o ambas, que se une a ADAM, previniéndose así la interacción de ADAM10, 15, o ambas, previniendo Her-2 el contacto directo de ADAM10, ADAM15, o ambas, con Her-2. En otro aspecto de la divulgación, el inhibidor de la escisión es una ADAM10, ADAM15, o ambas, inhibidor que se une a ADAM10, ADAM15, o ambas, y altera la estructura de ADAM10, ADAM15, o ambas, previniéndose así la interacción de ADAM10, ADAM15, o ambas, con Her-2. En otro aspecto más de la divulgación, el inhibidor de la escisión es una ADAM10, ADAM15, o ambas, inhibidor que se une a ADAM10, ADAM15, o ambas, e inhibe la actividad proteolítica de ADAM10, ADAM15, o ambas, previniéndose así la acción proteolítica de ADAM10, ADAM15, o ambas, sobre Her-2. En otro aspecto más de la divulgación, el inhibidor de la escisión es una ADAM10, ADAM15, o ambas, inhibidor que se une a Her-2, previniéndose así la interacción de ADAM10, ADAM15, o ambas, previniendo Her-2 el contacto directo de ADAM10, ADAM15, o ambas, con Her-2. En otro aspecto adicional de la divulgación, el inhibidor de la escisión es una ADAM10, ADAM15, o ambas, inhibidor que se une a Her-2 y altera la estructura de Her-2, previniéndose así la interacción de ADAM10, ADAM15, o ambas, con Her-2.

La presente divulgación también caracteriza un inhibidor de la escisión que es un inhibidor de la actividad proteolítica de ADAM10, ADAM15, o ambas. Los compuestos que tienen la capacidad para inhibir la actividad de proteasa, es decir, inhibidores de la proteasa, son muy conocidos en la técnica, y por consiguiente, un experto en la materia reconocería y sabría cómo producir y usar un compuesto que es un inhibidor de la proteasa que es específico para una ADAM de interés, por ejemplo, ADAM10, ADAM15, y similares.

Métodos basados en ácidos nucleicos relacionados con la inhibición de la escisión de Her-2 por ADAM10 y ADAM15

El experto apreciaría, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, que la presente divulgación engloba la inhibición de una señal mediada por Her-2 de otro modo transmitida mediante un receptor de Her-2 que se escindió por una ADAM previniendo la escisión del receptor de Her-2 por la ADAM. Es decir, los datos desvelados en el presente documento demuestran que ADAM (por ejemplo, ADAM10, ADAM15, o ambas) escinden Her-2 para producir p95 y el p95 así producido, a su vez, transmite una señal. Los datos demuestran adicionalmente que la inhibición de la producción de p95, y así, la inhibición de la transmisión de una señal mediante el p95 constitutivamente activo, media en varios efectos, que incluyen, pero no se limitan a, disminución de la fosforilación de ciertas proteínas, disminución de la proliferación celular, inducción de muerte celular, y similares. Así, cuando se desean estos efectos, puede usarse una amplia plétora de métodos para inhibir la señalización mediante la punta de p95 para mediar en el efecto deseado, especialmente cuando la célula media en una enfermedad, trastorno o afección, tal como, pero no se limita a, cáncer.

El experto entendería adicionalmente, una vez provisto de las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, que la presente divulgación incluye administrar una ribozima o una molécula de ácido nucleico antisentido a una célula, inhibiéndose así la expresión de ADAM10, 15, o ambas, en la célula, cuando el diseño y uso de tales moléculas para inhibir la expresión de una proteína de interés en una célula son muy conocidos en la técnica como sigue brevemente. Es decir, los datos desvelados en el presente documento demuestran que la inhibición de la expresión de un ARNm que codifica una ADAM que escinde Her-2 para producir ECD, p95, o ambos, disminuye la escisión de Her-2. Además, cualquier método que disminuya el nivel de una ADAM que escinde Her-2 media en un efecto tal como sería fácilmente apreciado por el experto basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento y tal método está englobado por la invención.

Moléculas antisentido y su uso para inhibir la expresión génica son muy conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Cohen, 1989, en: Oligodeoxyribonucleotides, Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press). Ácidos nucleicos antisentido son moléculas de ADN o de ARN que son complementarias a al menos una porción de una molécula de ARNm específica (Weintraub, 1990, Scientific American 262:40). En la célula, los ácidos nucleicos antisentido se hibridan con el ARNm correspondiente, formando una molécula bicatenaria, inhibiéndose así la traducción de genes.

El uso de métodos antisentido para inhibir la traducción de genes se conoce en la técnica, y se describe, por ejemplo, en Marcus-Sakura (1988, Anal. Biochem. 172:289). Tales moléculas antisentido pueden proporcionarse a la célula mediante expresión genética usando ADN que codifica la molécula antisentido como se enseña por Inoue (1993, patente de EE.UU. nº 5.190.931).

Alternativamente, pueden producirse moléculas antisentido sintéticamente y a continuación proporcionarse a la célula. Se prefieren oligómeros antisentido de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100, y más preferentemente aproximadamente 15 a aproximadamente 50 nucleótidos, ya que se sintetizan fácilmente y se introducen en una célula diana. Moléculas antisentido sintéticas contempladas por la invención incluyen derivados de oligonucleótidos conocidos en la técnica que tienen actividad biológica mejorada en comparación con oligonucleótidos sin modificar (véase Cohen, arriba; Tullis, 1991, patente de EE.UU. n° 5.023.243, incorporada por referencia en el presente documento en su totalidad).

Las ribozimas y su uso para inhibir la expresión génica también son muy conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Cech y col., 1992, J. Biol. Chem. 267:17479-17482; Hampel y col., 1989, Biochemistry 28:4929-4933; Eckstein y col., publicación internacional n° WO 92/07065; Altman y col., patente de EE.UU. n° 5.168.053). Las ribozimas son moléculas de ARN que poseen la capacidad para escindir específicamente otro ARN monocatenario de un modo análogo a las endonucleasas de restricción de ADN. Mediante la modificación de secuencias de nucleótidos que codifican estos ARN, pueden manipularse moléculas para reconocer secuencias de nucleótidos específicas en una molécula de ARN y escindir la (Cech, 1988, J. Amer. Med. Assn. 260:3030). Una ventaja importante de este enfoque es que, debido a que son específicas de secuencia, solo se inactivan ARNm con secuencias particulares.

Hay dos tipos básicos de ribozimas, concretamente, tipo Tetrahymena (Hasselhoff, 1988, Nature 334:585) y tipo cabeza de martillo. Las ribozimas tipo Tetrahymena reconocen secuencias que tienen cuatro bases de longitud, mientras que las ribozimas tipo cabeza de martillo reconocen secuencias de bases de 11-18 bases de longitud. Cuanto más larga sea la secuencia, mayor será la probabilidad de que la secuencia se produzca exclusivamente en la especie de ARNm diana. Por consiguiente, se prefieren las ribozimas tipo cabeza de martillo a las ribozimas tipo Tetrahymena para inactivar especies de ARNm específicas, y se prefieren secuencias de reconocimiento de 18 bases a las secuencias de reconocimiento más cortas que pueden producirse aleatoriamente dentro de diversas moléculas de ARNm sin relacionar.

En ciertas situaciones, puede desearse inhibir la expresión de ADAM10, ADAM15, o ambas, y la divulgación, por tanto, incluye composiciones útiles para la inhibición de la expresión de ADAM10, ADAM15, o ambas. Así, la divulgación caracteriza un ácido nucleico aislado complementario a una porción o todo un ácido nucleico que codifica una ADAM10, 15, de mamífero, o ambas, ácido nucleico que está en una orientación antisentido con respecto a la transcripción. Preferentemente, el ácido nucleico antisentido es complementario a un ácido nucleico que tiene al menos aproximadamente el 90 % de homología con ADAM10, 15, o ambas. Preferentemente, el ácido nucleico es aproximadamente el 95 % homólogo, más preferentemente aproximadamente el 96 % homólogo, más preferentemente aproximadamente el 98 % homólogo, y lo más preferentemente aproximadamente el 99 % homólogo a un ácido nucleico complementario a una porción o todo de un ácido nucleico que codifica una ADAM10, 15, de mamífero, o ambas, o un fragmento de la misma, que está en una orientación antisentido con respecto a la transcripción. Lo más preferentemente, el ácido nucleico es complementario a una porción o todo de un ácido nucleico que tiene la secuencia, o un fragmento de la misma, de una secuencia conocida por codificar ADAM10, ADAM15, o ambas. Tal ácido nucleico antisentido sirve para inhibir la expresión, función, o ambas, de ADAM10, ADAM15, o ambas.

En una realización, la presente divulgación caracteriza un método para inhibir la escisión de Her-2, por el cual la escisión mediada por ADAM de Her-2 se inhibe poniendo en contacto una célula con una cantidad inhibidora de la escisión de Her-2 de un ácido nucleico antisentido dirigido a ADAM. Un experto en la materia apreciaría, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, que un inhibidor de ADAM antisentido de la invención incluye moléculas y compuestos que previenen o inhiben que ADAM10, ADAM15, o ambas, sean accesibles a Her-2 sobre la superficie celular. Es decir, la divulgación contempla que un antisentido y/o molécula antisentido que previene la expresión de ADAM10, ADAM15, o ambas, de forma que Her-2 no se escinda para formar p95, pueda ser un inhibidor de la invención.

En un aspecto de la divulgación, un inhibidor de ADAM es un ARNip. Los ARN interferentes pequeños (ARNip) median en un proceso de silenciamiento de genes postranscripcional llamado interferencia por ARN (iARN) en el que los ARNip dirigen la escisión y degradación específica de secuencia de dianas de ARNm celulares a las que el ARNip tiene identidad de secuencias (Tuschl, 2002 Nature Biotech. 20:446-448; Sharp, 2001, Genes Dev. 15:485-490). Los ARNip pueden ser ARN sintéticos bicatenarios de 19 a 21 nucleótidos con nucleótidos protuberantes de 3' de 2 a 3 nucleótidos o pueden expresarse como ARN de horquilla corta (ARNhc), en los que las hebras codificantes y no codificantes individuales se unen por un bucle muy estructurado, a partir de plásmidos o vectores virales que alojan tanto secuencias promotoras como terminadoras de ARN polimerasa III (Elbashir y col., 2001, Nature 411:494-498; Paul y col., 2002, Nature Biotech. 20:505-508; Paddison y col., 2002, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:1443-1448). Como se describe en detalle en Tuschl y col. y Sharp, y como se ha entendido por un experto en la materia, los ARNip pueden usarse para silenciar la expresión de una ADAM que escinde Her-2 (es decir, ADAM10, 15, o ambas) en una célula. Por tanto, la presente divulgación engloba administrar a una célula que expresa Her-2 una cantidad inhibidora de la escisión de Her-2 de un inhibidor de ADAM cuando el inhibidor es un ARNip. En una realización de la divulgación, el ARNip se refiere a ARNm de ADAM10, ARNm de ADAM15, o ambos. En un aspecto, el ARNip dirigido a ADAM comprende un ARN bicatenario, del cual una única hebra es complementaria al ARN de

ADAM10, ARN de ADAM15, o ambos. La presente divulgación no se limita a ningún ARNip particular; más bien, la divulgación engloba una amplia plétora de ARNip que tienen la capacidad de inhibir la escisión de Her-2 por ADAM10, ADAM15, o ambas. De hecho, los ARNip desvelados en el presente documento estuvieron comercialmente disponibles, demostrando que la producción de tales ARNip se realiza rutinariamente en esta materia en el que el nivel de experiencia es alto.

La presente divulgación incluye un ácido nucleico útil en inhibir la escisión de Her-2 por una ADAM10, una ADAM15, o ambas. Es decir, los datos desvelados en el presente documento demuestran que la expresión de una ADAM que escinde Her-2, por ejemplo, ADAM10, ADAM15, y similares, puede silenciarse, o disminuirse, usando un ARNip complementario al ARNm que codifica la ADAM pertinente. La inhibición de ARNm de ADAM usando un ARNip específico para esa ADAM medió, a su vez, en una disminución en la escisión de Her-2 e, incluso más importante, también medió en una disminución en la eliminación de Her-2. Debido a que los datos desvelados en el presente documento demuestran adicionalmente que la inhibición de la eliminación de Her-2 inhibe la proliferación celular, induce muerte celular y puede mediar en un efecto beneficioso en un paciente afectado con un tumor que expresa en exceso Her-2, la inhibición de la expresión de ADAM usando un ARNip puede proporcionar un posible agente terapéutico importante para una enfermedad, trastorno o afección asociada a, o mediada por, la escisión de Her-2, que incluye tal enfermedad, trastorno o afección que está mediada por o asociada a la producción de p95 en una célula.

Como se ha señalado en cualquier parte en el presente documento, estos ácidos nucleicos son útiles porque pueden inhibir la actividad de ADAM en una célula. Muchas metaloproteasas se expresan altamente en células tumorales. Como la actividad de proteasa de ADAM regula la eliminación de factores de crecimiento autocrinos o sus receptores, estas proteínas median en el crecimiento, adhesión o motilidad de células tumorales. ADAM10 se expresa en exceso en feocromocitoma y neuroblastomas (Yavari y col., 1998 Hum. Mol. Genet. 7:1161-67). Además, se ha demostrado mediante tanto experimentos genéticos como bioquímicos que ADAM10 participa en la eliminación de tanto el receptor de Notch como su ligando Delta. Los análisis genéticos de ratones inactivados en ADAM10 o moscas que alojan mutaciones de pérdida de función en el ortólogo de *Drosophila* Kuzbanian, muestran fenotipos sorprendentemente similares como mutaciones de pérdida de función en notch y delta. Y, lo que es más importante, la expresión del gen diana de Notch *hes-5* en el tubo neural de ratones inactivados en ADAM10 se redujo significativamente con una regulación por incremento concomitante del ligando de notch *dll-1*, un gen que está negativamente regulado por la señalización de Notch por retroalimentación (Seals y Courtneidge, 2003, Genes Dev. 17:7-30; Hartmann y col., 2002, Hum. Mol. Genet. 11:2615-24).

Notch puede funcionar como oncogén en ratón y seres humanos. En linfocitos T, por ejemplo, la relocalización cromosómica o integraciones virales que conducen a la expresión de un dominio citoplásmico constitutivamente activo de Notch1 producen leucemia linfoblástica aguda de linfocitos T (Radtke y Raj, 2003, Nat. Rev. Cancer. 3:756-67). Los receptores de Notch y ligandos de Notch también se expresan altamente en adenocarcinomas de colon y cánceres de mama en los que la señalización de Notch puede contribuir a la expresión en exceso de Her-2. Notch es también importante en la angiogénesis, y los ratones inactivados en ADAM10 presentan vasculogénesis defectuosa similar a los ratones inactivados en notch (Hartmann y col., 2002, Hum. Mol. Genet. 11:2615-24). Otro ligando que participa en muchos tipos de tumores es el factor de crecimiento epidérmico; pruebas evidentes indican que se requieren ADAM10 y su actividad de metaloproteasa para la escisión de EGF que se une a heparina y la transactivación de la señalización de EGFR en respuesta a la activación del receptor acoplado a proteína G (Yan y col., 2002, J Cell Biol. 2002. 158:221-6). Por tanto, la actividad biológica de ADAM10 es crucial en varios procesos celulares y el experto apreciaría que la inhibición de su(s) función (funciones) puede tener efecto(s) útil(es).

Entre los muchos usos que ilustran la posible utilidad de inhibir la actividad de ADAM15 está el hecho de que la actividad de ADAM15 es importante para la migración de células mesangiales (MC) del núcleo del glomérulo renal. La migración de estas células del núcleo al espacio pericapilar es una característica de varias enfermedades renales que incluyen glomerulonefritis mesangiocapilar. En un modelo de herida de MC, la expresión de ADAM15 aumentó y se correlacionó con la movilidad de estas células. Los inhibidores de MMP, u oligonucleótidos antisentido, para ADAM15 redujeron esta migración, que indica que la inhibición de la actividad de ADAM15 puede tener efectos beneficiosos en enfermedad caracterizada por motilidad de MC (Martin y col., 2002, J. Biol Chem. 277:33683-33689). Además, los ratones inactivados en ADAM15 implantados con células de melanoma mostraron tamaño reducido del tumor (Horiuchi y col., Mol. Cell. Biol. 2003, 5614).

El ácido nucleico, cuando se administra a una célula que expresa Her-2, inhibe detectablemente la actividad de ADAM. Más preferentemente, el ácido nucleico inhibe detectablemente la expresión de ADAM, incluso más preferentemente, inhibe la escisión de Her-2, todavía más preferentemente, el ácido nucleico inhibe la producción de p95 en la célula, cuando se compara con el nivel de producción de p95 en una célula por lo demás idéntica a la que no se administra el ácido nucleico, y/o con el nivel de p95 en la célula antes de la administración del ácido nucleico. Adicionalmente, el ácido nucleico puede, pero no necesita, inducir muerte celular, inhibir la proliferación celular, inhibir la señalización mediante el receptor de Her-2, y similares.

También pueden usarse ácidos nucleicos antisentido que inhiben la expresión de ADAM10, 15, o ambas, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección mediada por la elevada

expresión del receptor de Her-2 cuando se compara con la expresión del receptor de Her-2 en una célula y/o un paciente no afectado con la enfermedad, trastorno o afección.

Las técnicas para inhibir la expresión de un ácido nucleico en una célula son muy conocidas en la técnica y engloban métodos tales como se desvelan en el presente documento (por ejemplo, inhibición usando un anticuerpo, un ácido nucleico antisentido, un ARNip, una ribozima y similares). Otras técnicas útiles para inhibir la expresión de un ácido nucleico que codifica ADAM10, 15, o ambas, incluyen, pero no se limitan a, usar reactivos de nucleótido que se dirigen a secuencias específicas del promotor de receptor, y similares.

El experto entendería, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, que la escisión de un receptor de Her-2 presente en una célula puede inhibirse o abolirse usando un ácido nucleico que previene la expresión de ADAM10, ADAM15, o ambas, en la célula. Como se expone más completamente en cualquier parte en el presente documento, una vez se conocen las secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos de una ADAM que escinde Her-2, pueden usarse diversos métodos muy conocidos en la técnica para inhibir la escisión de Her-2 para formar p95. Tales métodos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos, ARNip, ribozimas y moléculas antisentido. El diseño y uso de tales compuestos está muy establecido una vez el experto se provee de la secuencia del ácido nucleico que codifica ADAM10, ADAM15, o ambas, tal como se desvela en el presente documento en el que los datos demuestran que las ADAM median en la escisión de Her-2 (por ejemplo, ADAM10, y ADAM15), y tales métodos, por tanto, no se citan en el presente documento ya que son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, el diseñar moléculas antisentido y ribozimas puede inhibir eficazmente la progresión del cáncer de mama inhibiendo la expresión de ADAM10, ADAM15, o ambas, que, a su vez, inhibe la escisión de Her-2 y la producción de p95, sin afectar la expresión de otros miembros de la familia de ADAM, que pueden requerirse para la apropiada función celular. Así, el direccionamiento selectivo de las ADAM que escinden Her-2, mientras que no afectan la función de otras ADAM, pueden evitar efectos perjudiciales de no inhibir específicamente el crecimiento celular, y otros procesos celulares.

Cuando un ácido nucleico antisentido dirigido a ADAM10, ADAM15, o ambas, se administra a una célula para reducir el nivel de ADAM10, ADAM15, o ambas, presente en la célula, un experto en la materia entendería, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, que la cantidad del ácido nucleico que va a administrarse a la célula puede valorarse evaluando el nivel de expresión del ácido nucleico que codifica ADAM10, ADAM15, o ambas, presente en la célula.

Métodos para evaluar el nivel de expresión de ADAM10, ADAM15, o ambas (por ejemplo, usando anticuerpos anti-receptor en transferencia Western u otros análisis basados en inmunitarios tales como ELISA) y/o métodos para evaluar el nivel de expresión de ADAM10, ADAM15, o ambas, en una célula y/o tejidos (por ejemplo, usando análisis de transferencia Northern, qPCR y similares) se desvelan en el presente documento o son muy conocidos para aquellos expertos en la materia. Tales ensayos pueden usarse para determinar la "cantidad eficaz" de ADAM10, ADAM15, o ambas, ácido nucleico antisentido, ribozima y similares, que va a administrarse a la célula con el fin de reducir o aumentar el nivel de expresión de ADAM10, ADAM15, o ambas. La cantidad de ácido nucleico administrada puede calcularse fácilmente y ajustarse como se ejemplifica en el presente documento para ARNip que redujo la expresión de ADAM10 y ADAM15, y redujo concomitantemente la escisión de Her-2 y eliminación mediada por convertasa de ECD. Sin embargo, la presente divulgación no se limita a estos, o cualquier otro, ensayo en particular para determinar una cantidad eficaz de un inhibidor, que incluye un inhibidor basado en ácido nucleico tal como, pero no se limita a, ARNip.

Similarmente, un anticuerpo, o un ácido nucleico, que se une específicamente a una ADAM que escinde Her-2 (ADAM10, ADAM15, o ambas) puede administrarse a una célula inhibiéndose así la escisión de Her-2 por esa ADAM. La producción y uso de "intracuerpos", como tales anticuerpos se denominan en la materia, es muy conocida, y, por tanto, no se trata adicionalmente en el presente documento. El experto, provisto de las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, especialmente que ciertas ADAM median en la escisión de Her-2 para producir p95, apreciaría fácilmente que los intracuerpos, entre muchas otras moléculas, pueden usarse para inhibir la escisión por ADAM de Her-2.

Inhibidores de metaloproteasa (MPI)

Los inhibidores de ADAM de la presente invención incluyen moléculas pequeñas denominadas en el presente documento inhibidores de metaloproteasa (MPI). Un MPI según la invención es capaz de inhibir (por ejemplo, antagonizar) la actividad de una ADAM. En algunas realizaciones, el MPI inhibe la actividad de ADAM10, ADAM15, o ambas. En otras realizaciones, la actividad de ADAM que se inhibe por el MPI es la escisión de un receptor de cinasa tal como, por ejemplo, Her-2. El MPI también puede modular la actividad de otros receptores biológicos que incluyen, por ejemplo, metaloproteasas de la matriz (MMP). En algunas realizaciones, el MPI inhibe la actividad de una o más MMP que incluyen, por ejemplo, MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP8, MMP9, MMP10, MMP12, MMP13, MMP14 y/u otra MMP. El MPI puede ser adicionalmente selectivo para ADAM. Por "selectivo para ADAM" se indica que el MPI es un inhibidor más eficaz (por ejemplo, tiene una menor CI_{50}) de una ADAM que de otras metaloproteasas (por ejemplo, MMP). En algunas realizaciones, el MPI es adicionalmente selectivo para ADAM10 o ADAM15; es decir, el MPI es un inhibidor más eficaz de ADAM10 o ADAM15 que de otras metaloproteasas que

incluyen otras ADAM. En algunas otras realizaciones, un MPI selectivo para una ADAM es aproximadamente 100 veces, aproximadamente 50 veces, aproximadamente 20 veces, aproximadamente 10 veces, aproximadamente 6 veces, aproximadamente 5 veces, aproximadamente 3 veces, o aproximadamente 2 veces más activo para la inhibición de la ADAM que para cualquier MMP (por ejemplo, como se mide por Cl_{50}). En todavía otras realizaciones, el MPI es al menos aproximadamente 2 veces selectivo para una ADAM con respecto a cualquier MMP.

Se han preparado numerosos compuestos que son inhibidores de metaloproteasa y pueden ser MPI útiles en los métodos de la invención. Las siguientes patentes describen algunos MPI de ejemplo que pueden ser útiles según los métodos de la presente invención: las patentes de EE.UU. n° 6.706.723; 6.703.415; 6.703.379; 6.696.456; 6.696.449; 6.689.794; 6.689.771; 6.686.348; 6.683.155; 6.683.093; 6.683.060; 6.677.355; 6.677.321; 6.667.388; 6.667.316; 6.660.738; 6.656.954; 6.656.448; 6.642.255; 6.638.952; 6.624.196; 6.624.177; 6.624.144; 6.620.835; 6.620.823; 6.620.813; 6.608.104; 6.605.742; 6.583.299; 6.579.982; 6.579.890; 6.576.628; 6.569.899; 6.569.855; 6.566.381; 6.566.116; 6.563.002; 6.559.142; 6.555.535; 6.548.667; 6.548.524; 6.545.038; 6.544.980; 6.541.638; 6.541.521; 6.541.489; 6.534.491; 6.511.993; 6.506.764; 6.500.948; 6.500.847; 6.495.699; 6.495.578; 6.495.565; 6.492.422; y 6.492.367. El listado precedente representa solo algunos de los numerosos posibles MPI conocidos en la técnica, y un experto en la materia entendería fácilmente que los métodos de la invención no se limitan a los compuestos explícitamente citados en el presente documento.

En algunas realizaciones, el MPI es un compuesto que tiene al menos un resto ácido hidroxámico. Compuestos de hidroxamato, su preparación y su uso como inhibidores de metaloproteasa están bien establecidos en la materia como se ilustra por las numerosas referencias de patente enumeradas anteriormente y, por ejemplo, Muri, y col. "Hydroxamic acids as pharmacological agents", Curr. Med. Chem. 2002 Sep; 9(17):1631-53, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

Compuestos de hidroxamato adicionales adecuados como MPI incluyen cualquiera de aquellos citados anteriormente, además de aquellos descritos en, por ejemplo, los documentos WO 03/051825; WO 03/106381; documento de EE.UU. n° de serie 60/534.501; documento de EE.UU. n° de serie 60/512.016; y documento de EE.UU. n° de serie 60/515.352, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

Compuestos de hidroxamato adicionales adecuados como MPI incluyen los siguientes: Compuestos 1, 2, 3, 4, 5, 7 y 8 (véase Ejemplos para identidades de compuestos); además de (6S,7S)-N-hidroxi-5-metil-6-[(4-fenilpiperidin-1-il)carbonil]-5-azaespiro[2.5]octano-7-carboxamida, (6S,7S)-N-hidroxi-5-metil-6-[(4-fenil-3,6-dihidropiridin-1(2H)-il)carbonil]-5-azaespiro[2.5]octano-7-carboxamida, (6S,7S)-N-hidroxi-6-[(3-fenilpirrolidin-1-il)carbonil]-5-azaespiro[2.5]octano-7-carboxamida, (6S,7S)-N-hidroxi-6-[(4-(metilsulfonyl)fenil)-3,6-dihidropiridin-1(2H)-il)carbonil]-5-azaespiro(2,5)octano-carboxamida, (2S,3S)-N-hidroxil-1-metil-2-((10aS)-3,4,10,10a-tetrahidropirazino(1,2-a)indol-2(1H)-il-carbonil)piperidin-3-carboxamida, (6S,7S)-N-hidroxi-6-((10aS)-3,4,10,10a-tetrahidropirazino(1,2-a)-indol-2(1H)-il-carbonil)-5-azaespiro(2,5)octano-7-carboxamida, (6S,7S)-N-hidroxi-6-[(4-(3-(metilsulfonyl)fenil)-3,6-dihidropiridin-1(2H)-il)carbonil]-5-azaespiro(2,5)octano-7-carboxamida, (6S,7S)-7-[(hidroxiamino)carbonil]-6-[(4-fenil-3,6-dihidropiridin-1(2H)-il)carbonil]-5-azaespiro[2.5]octano-5-carboxilato de metilo, (6S,7S)-7-[(hidroxiamino)carbonil]-6-[(4-fenil-3,6-dihidropiridin-1(2H)-il)carbonil]-5-azaespiro[2.5]octano-5-carboxilato de bencilo, (6S,7S)-N-hidroxi-5-(metilsulfonyl)-6-[(4-fenil-3,6-dihidropiridin-1(2H)-il)carbonil]-5-azaespiro[2.5]octano-7-carboxamida y (6S,7S)-N-hidroxi-6-[(4-(3-metoxifenil)piperidin-1-il)carbonil]-5-metil-5-azaespiro[2.5]octano-7-carboxamida, cada uno de los cuales puede prepararse según los métodos descritos en el documento de EE.UU. n° de serie 60/534.501, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

MPI adicionales útiles según los métodos de la presente invención incluyen TAPI, prinomastat, batimastat, marimastat, tanomastat, BMS-275291 y CGS27023A, cada uno de los cuales son conocidos como o han estado en desarrollo clínico como inhibidor de la metaloproteasa.

MPI adecuados para su uso según los métodos de la presente invención pueden identificarse por cualquiera de los numerosos ensayos conocidos que prueban la actividad inhibidora de una ADAM. Ensayos de ejemplo útiles para identificar inhibidores de ADAM10 y ADAM15 se proporcionan más adelante.

Ensayo de ADAM10

Se preparó disolución madre del compuesto 5 mM en DMSO. La placa del compuesto se preparó por dilución doble para una curva de 11 puntos, con la mayor concentración de 500 μ M. Se transfirió 1 μ l de la placa de compuesto en DMSO a la placa de ensayo. Se preparó disolución de enzima en tampón de ensayo con una concentración de 100 ng/50 μ l. Se preparó disolución de sustrato ((7-metoxicumarin-4-il)-acetil-Pro-Leu-Ala-Gln-Ala-Val-(3-[2,4-dinitrofenil]-L-2,3-diaminopropionil)-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-NH₂) en tampón de ensayo con una concentración de 20 μ M. Se añadieron 50 μ l de disolución de enzima a la placa de ensayo. La placa de ensayo se incubó durante 5 minutos. A continuación se añadieron 50 μ l de disolución de sustrato a la placa de ensayo. La placa se protegió de la luz y se incubó a 37 °C durante 4 horas. La reacción se detuvo añadiendo 10 μ l de disolución 500 mM de EDTA. La placa se leyó en un lector de placas con excitación de 320 nm y emisión de 405 nm.

Ensayo de ADAM15

Puede ensayarse ADAM15 de un modo similar a ADAM10 (véase, por ejemplo, Fourie y col., J Biol Chem. 2003, 278(33), 30469-77). En resumen, se prepara un sustrato de péptido de fluorescencia extinguida marcando un extremo con un colorante fluorescente y el otro extremo con un colorante extintor. La escisión del péptido por ADAM15 puede medirse por el aumento en la intensidad de fluorescencia como resultado de la disminución en la proximidad del colorante extintor al colorante fluorescente.

Métodos en una célula

La presente divulgación proporciona numerosos métodos para inhibir la escisión de Her-2 en una célula que comprende Her-2, por los cuales un inhibidor de ADAM (por ejemplo, inhibidor de ADAM10 y/o ADAM 15) se administra a una célula. Como se expone en detalle en cualquier parte en el presente documento, la escisión de Her-2 produce p95 y ECD105, y basándose en los datos desvelados por primera vez en el presente documento, p95 participa posteriormente desempeñando una función en el desarrollo y progresión del cáncer. Por tanto, un experto en la materia entendería, basándose en la divulgación en el presente documento, que la inhibición de la escisión de Her-2 reprimirá la producción de p-95. La represión de la producción de p95 es útil para la prevención de cualquier afección o trastorno asociado a la elevada señalización de Her-2/p95. Por ejemplo, como se desvela en detalle en cualquier parte en el presente documento, la expresión en exceso de Her-2 se produce en el 25-30 % de los cánceres de mama. Pacientes con tumores que expresan en exceso Her-2 tienen una evolución clínica claramente desfavorable, caracterizada por tiempo acortado hasta la reaparición de la enfermedad y supervivencia reducida. Por tanto, la represión de la producción de p95 inhibirá y/o disminuirá la señalización basada en Her-2/p95, minimizando posteriormente la evolución clínica desfavorable de la enfermedad mediada por Her-2/p95.

En algunas realizaciones de la invención, se afecta el crecimiento de una célula tumoral que expresa en exceso Her-2. En el método, una célula que expresa en exceso Her-2 se pone en contacto con una cantidad inhibidora de la escisión de Her-2 de un inhibidor de ADAM que es un inhibidor de la metaloproteasa, inhibiéndose la escisión de y así inhibiéndose el crecimiento de una célula que expresa en exceso Her-2. Los inhibidores de ADAM se tratan en mayor detalle en cualquier parte en el presente documento. En algunas realizaciones de la invención, se inhibe el crecimiento de una célula tumoral.

La presente divulgación también proporciona métodos para afectar cualquier célula que expresa Her-2. Tales métodos afectan una célula que expresa Her-2 por ADAM por los cuales la interacción entre la ADAM y Her-2 se potencia o inhibe, afectándose así la escisión mediada por ADAM de Her-2. Debido a que la escisión de Her-2 por ADAM produce p95, que se cree que desempeña una función en el crecimiento y diferenciación celular, los métodos que afectan una célula que expresa Her-2 por ADAM por los cuales la interacción entre ADAM y Her-2 se potencia o inhibe, son útiles para estimular o inhibir el crecimiento y/o diferenciación celular. Este efecto es especialmente útil en una célula en la que hay expresión por defecto de Her-2, y/o en la que se desea mayor expresión de Her-2, elevado nivel de p95 o mayor expresión o función de ADAM como se entendería por el experto basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento.

La divulgación también incluye métodos de afectar el crecimiento de una célula que expresa en exceso Her-2. En el método, una célula que expresa en exceso Her-2 se pone en contacto con una cantidad inhibidora de la escisión de Her-2 de un inhibidor de ADAM, inhibiendo la producción de p95, e inhibiéndose así el crecimiento de una célula que expresa en exceso Her-2. Los inhibidores de ADAM se tratan en mayor detalle en cualquier parte en el presente documento, y basándose en la divulgación en el presente documento, un experto en la materia entenderá que un inhibidor de ADAM de la invención puede inhibir la escisión mediada por ADAM de Her-2 que interacciona con ADAM, Her-2, o ambas.

En otra realización de la divulgación, se afecta la proliferación de una célula que expresa en exceso Her-2. En el método, una célula que expresa en exceso Her-2 se pone en contacto con una cantidad inhibidora de la escisión de Her-2 de un inhibidor de ADAM, inhibiendo la escisión de Her-2 por ADAM e inhibiéndose así la proliferación de una célula que expresa en exceso Her-2. Tal método es útil para la inhibición de la proliferación de células tumorales debido a que estas células pueden expresar en exceso Her-2, pero normalmente no expresan células no tumorales normales. De esta forma, la divulgación proporciona un método selectivo para inhibir el crecimiento de células tumorales mientras que no se afectan células normales que de otro modo se afectarían por métodos antitumorales.

La presente divulgación también proporciona un método de inducir la muerte de una célula que expresa en exceso Her-2. En el método, una célula que expresa en exceso Her-2 se pone en contacto con una cantidad inhibidora de la escisión de Her-2 de un inhibidor de ADAM, inhibiendo la escisión de Her-2 por ADAM e induciendo así la muerte de una célula que expresa en exceso Her-2. Tales métodos serían útiles cuando no solo se deseara la inhibición de la proliferación, sino cuando fueran a destruirse células que están presentes, pero que ya no pueden proliferar.

La divulgación también proporciona un método para inhibir la transducción de señales en una célula, en el que la transducción de señales está mediada por un receptor de Her-2 sobre una célula que expresa en exceso Her-2. El método de la invención comprende poner en contacto una célula que expresa en exceso Her-2 con una cantidad

inhibidora de la escisión de Her-2 de un inhibidor de ADAM. La inhibición de la escisión mediada por ADAM de Her-2 inhibe una ruta de transducción de señales que está mediada por el receptor de Her-2. Esto es debido a que se inhibe la producción de p95, que es una cinasa constitutivamente activa que transmite constitutivamente la señal de otro modo no constitutivamente regulada por el receptor de Her-2. En algunas realizaciones, se inhibe una ruta de proteína cinasa activada por mitógeno (MAP). En algunas realizaciones, se inhibe una ruta de proteína cinasa B (AKT).

En otro aspecto más de la divulgación, se inhibe la fosforilación de una cinasa regulada por señal extracelular (ERK), que conduce a la inhibición de una ruta de transducción de señales mediada por el receptor de Her-2. En otro aspecto de la divulgación se inhibe la fosforilación de una proteína cinasa B (AKT), conduciendo a la inhibición de una ruta de transducción de señales mediada por el receptor de Her-2. Esto es debido a que los datos desvelados en el presente documento demuestran que estas diversas rutas están reguladas por la transducción de una señal mediante el receptor de Her-2. Así, inhibiendo la transducción de una señal mediante un receptor de Her-2 que inhibe la producción de la señal constitutiva que transduce la porción de Her-2, es decir, p95, puede efectuarse la inhibición de las rutas en la dirección 3'. Como p95 regula por incremento estas rutas, el inhibir p95 las regulará por disminución de tal forma que la presente invención proporcione métodos eficaces para hacerlo.

La presente invención también proporciona un método para inhibir el crecimiento tumoral de un tumor que expresa en exceso Her-2. En el método, un tumor que expresa en exceso Her-2 se pone en contacto con una cantidad eficaz de un inhibidor de ADAM. Tales métodos serían útiles en el tratamiento de cáncer.

Métodos de tratamiento

La presente invención proporciona el uso de un inhibidor de ADAM que es un inhibidor de la metaloproteasa que inhibe la escisión de Her-2 *in vivo*, o un anticuerpo anti-Her-2, para el tratamiento de cáncer administrando a un paciente afectado con el cáncer, o probablemente que va a afectarse con el cáncer, una cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor de ADAM. Adicionalmente, en el presente documento se proporcionan usos para tratar cáncer en un paciente inhibiendo la escisión de Her-2 expresada en el cáncer. Adicionalmente, en el presente documento se proporcionan usos para tratar cáncer en un paciente inhibiendo la formación de p95 en el cáncer. La presente invención proporciona además usos para tratar cáncer en un paciente inhibiendo la actividad de escisión de Her-2 de una ADAM expresada en el cáncer.

La presente divulgación proporciona además un método para inhibir metástasis del cáncer administrando a un paciente afectado con el cáncer una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de ADAM. Adicionalmente, en el presente documento se proporcionan métodos para inhibir metástasis del cáncer en un paciente inhibiendo la escisión de Her-2 expresada en el cáncer. Adicionalmente, en el presente documento se proporcionan métodos para inhibir metástasis del cáncer en un paciente inhibiendo la formación de p95 en el cáncer. La presente divulgación proporciona además métodos para inhibir metástasis del cáncer en un paciente inhibiendo la actividad de escisión de Her-2 de una ADAM expresada en el cáncer.

La presente divulgación proporciona además un método para inhibir el crecimiento tumoral administrando a un paciente afectado con el tumor una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de ADAM. Adicionalmente, en el presente documento se proporcionan métodos para inhibir el crecimiento tumoral en un paciente inhibiendo la escisión de Her-2 expresada en el tumor. Adicionalmente, en el presente documento se proporcionan métodos para inhibir el crecimiento tumoral en un paciente inhibiendo la formación de p95 en el tumor. La presente divulgación proporciona además métodos para inhibir el crecimiento tumoral en un paciente inhibiendo la actividad de escisión de Her-2 de una ADAM expresada en el tumor.

En algunas realizaciones, el inhibidor de ADAM es un inhibidor de ADAM10 o ADAM15. En otras realizaciones, el inhibidor de ADAM es un MPI. En todavía otras realizaciones, el inhibidor de ADAM es un MPI que es selectivo para una ADAM. En todavía otras realizaciones, el inhibidor de ADAM es un MPI que es selectivo para ADAM10 o ADAM15.

En algunas realizaciones, el inhibidor de ADAM inhibe la escisión de Her-2 *in vivo*.

En algunas realizaciones, el inhibidor de ADAM se administra en combinación con otro agente farmacéutico tal como un anticuerpo, agente antiproliferativo o citoxina. Ejemplo anticuerpos incluyen anticuerpos anti-Her-2 tales como Herceptin™ (Trastuzumab), 2C4, 4D5, HER-50, HER-66, HER-70 (disponibles de Genentech o UT Southwestern Medical School) y similares. Anticuerpos de ejemplo incluyen adicionalmente anticuerpos anti-EGFR-1 que incluyen, por ejemplo, IMC-C225 (Imclone), ABX-EGF (Abgenix) y similares. Otros anticuerpos de ejemplo incluyen anticuerpos anti-VEGF. Agentes antiproliferativos de ejemplo incluyen inhibidores del factor de crecimiento epidérmico (por ejemplo, OSI-774 (OSI/Genentech), PKI-116 (Novartis) o EKB-569 (Wyeth)), inhibidores de Her-2 (por ejemplo, CP-6545777 (Pfizer) o GW572016 (GlaxoSmithKline)), inhibidores duales de EGFR-1/Her-2 (GW2016 (GlaxoSmithKline) o C1-1033 (Pfizer)), inhibidores de Met cinasas, inhibidores de MEK-1 cinasas, inhibidores de MAPK cinasas, inhibidores de PI3, inhibidores de Src cinasas, inhibidores de PDGF, inhibidores de la señalización de integrina e inhibidores de los receptores del factor de crecimiento similar a la insulina, y moléculas pequeñas tales

como ZD6474 y SU6668. Citotoxinas de ejemplo incluyen quimioterapéuticos tales como Taxol™, Cisplatin™ y similares. Otros anticuerpos, agentes antiproliferativos y citotoxinas adecuados se proporcionan en cualquier parte en el presente documento.

Cánceres tratables por este método incluyen aquellos que expresan en exceso Her-2. En algunas realizaciones, cánceres tratables incluyen aquellos que expresan en exceso Her-2 y presentan escisión de Her-2 para formar p95 y dominio extracelular (ECD) libre. Ejemplos no limitantes de cánceres incluyen cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer gástrico, glioma y similares. En algunas realizaciones, el cáncer es cáncer de mama.

Como se usa en el presente documento, el término "individuo" o "paciente", usados indistintamente, se refiere a cualquier animal, que incluye mamíferos, preferentemente ratones, ratas, otros roedores, conejos, perros, gatos, cerdos, ganado vacuno, ovejas, caballos o primates, y lo más preferentemente seres humanos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la cantidad de compuesto activo (por ejemplo, MPI) que provoca la respuesta biológica o medicinal en un tejido, sistema, animal, individuo o ser humano que está siendo buscada por un investigador, veterinario, doctor médico u otro profesional clínico, que incluye uno o más de los siguientes:

- (1) prevenir la enfermedad; por ejemplo, prevenir una enfermedad, afección o trastorno en un individuo que puede estar predispuesto a la enfermedad, afección o trastorno, pero que todavía no experimenta o muestra la patología o sintomatología de la enfermedad;
- (2) inhibir la enfermedad; por ejemplo, inhibir una enfermedad, afección o trastorno en un individuo que está experimentando o mostrando la patología o sintomatología de la enfermedad, afección o trastorno (es decir, detener adicionalmente el desarrollo de la patología y/o sintomatología); y
- (3) mejorar la enfermedad; por ejemplo, mejorar una enfermedad, afección o trastorno en un individuo que está experimentando o mostrando la patología o sintomatología de la enfermedad, afección o trastorno (es decir, invertir la patología y/o sintomatología).

Como se usa en el presente documento, la expresión "en combinación con" significa que los dos o más agentes farmacéuticos se administran tanto al mismo tiempo como dentro de al menos aproximadamente 24 horas, preferentemente al menos aproximadamente 12 horas, más preferentemente al menos aproximadamente 6 horas, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 3 horas, todavía más preferentemente aproximadamente 1 hora, e incluso más preferentemente menos de aproximadamente 1 hora.

Formulaciones farmacéuticas y formas de dosificación

Cuando se emplean como productos farmacéuticos, los MPI pueden administrarse en forma de composiciones farmacéuticas. Estas composiciones pueden administrarse mediante una variedad de vías que incluyen oral, rectal, transdérmica, subcutánea, intravenosa, intramuscular e intranasal, y pueden prepararse de un modo muy conocido en la ciencia farmacéutica.

La presente invención también incluye composiciones farmacéuticas que contienen, como principio activo, uno o más MPI en combinación con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. En la preparación de las composiciones de la invención, el principio activo se mezcla normalmente con un excipiente, se diluye con un excipiente o se encierra dentro de un vehículo tal en forma de, por ejemplo, una cápsula, sobre, papel u otro recipiente. Cuando el excipiente sirve de diluyente, puede ser un material sólido, semisólido o líquido, que actúa de vehículo, excipiente o medio para el principio activo. Así, las composiciones pueden estar en forma de comprimidos, píldoras, polvos, pastillas para chupar, sobres, sellos, elixires, suspensiones, emulsiones, disoluciones, jarabes, aerosoles (como un sólido o en un medio líquido), pomadas que contienen, por ejemplo, hasta el 10 % en peso del compuesto activo, cápsulas de gelatina blanda y dura, supositorios, disoluciones inyectables estériles y polvos envasados estériles.

En la preparación de una formulación, el compuesto activo puede molerse para proporcionar el tamaño de partícula apropiado antes de combinarlo con los otros componentes. Si el compuesto activo es sustancialmente insoluble, puede molerse a un tamaño de partícula inferior a 200 de malla. Si el compuesto activo es sustancialmente soluble en agua, el tamaño de partícula puede ajustarse moliendo para proporcionar una distribución sustancialmente uniforme en la formulación, por ejemplo, aproximadamente 40 de malla.

Algunos ejemplos de excipientes adecuados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábiga, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe y metilcelulosa. Las formulaciones pueden incluir adicionalmente: agentes lubricantes tales como talco, estearato de magnesio y aceite mineral; agentes humectantes; emulsionantes y agentes de suspensión; agentes conservantes tales hidroxibenzoatos de metilo y propilo; edulcorantes; y aromatizantes. Las composiciones de la invención pueden formularse de manera que se proporcione liberación rápida, sostenida o retardada del principio activo después de la administración al paciente empleando

procedimientos conocidos en la técnica.

Las composiciones pueden formularse en una forma de dosificación unitaria, conteniendo cada dosificación de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 mg, más normalmente aproximadamente 10 a aproximadamente 30 mg, del principio activo. El término "formas de dosificación unitaria" se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con un excipiente farmacéutico adecuado.

El compuesto activo puede ser eficaz en un amplio intervalo de dosificación y se administra generalmente en una cantidad farmacéuticamente eficaz. Se entenderá, sin embargo, que la cantidad del compuesto en realidad administrada se determinará normalmente por un médico, según las circunstancias relevantes, que incluyen la condición que va a tratarse, la vía de administración elegida, el compuesto real administrado, la edad, peso y respuesta del paciente individual, la gravedad de los síntomas del paciente y similares.

Para preparar composiciones sólidas tales como comprimidos, el principio activo principal se mezcla con un excipiente farmacéutico para formar una composición de preformulación sólida que contiene una mezcla homogénea de un compuesto de la presente invención. Cuando se refiere a estas composiciones de preformulación como homogéneas, el principio activo está normalmente uniformemente disperso en toda la composición de manera que la composición pueda subdividirse fácilmente en formas de dosificación unitaria igualmente eficaces tales como comprimidos, píldoras y cápsulas. Esta preformulación sólida se subdivide entonces en formas de dosificación unitaria del tipo descrito anteriormente que contienen de, por ejemplo, 0,1 a aproximadamente 500 mg del principio activo de la presente invención.

Los comprimidos o píldoras de la presente invención pueden recubrirse o combinarse de otro modo para proporcionar una forma de dosificación que da la ventaja de acción prolongada. Por ejemplo, el comprimido o píldora puede comprender un componente de dosificación interna y uno de dosificación externa, estando el último en forma de una envoltura sobre el primero. Los dos componentes pueden separarse por una capa entérica que sirve para resistir a la disgregación en el estómago y permitir que el componente interno pase intacto al duodeno o sea de liberación retardada. Puede usarse una variedad de materiales para tales capas entéricas o recubrimientos, incluyendo tales materiales varios ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales tales como Shellac, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

Las formas líquidas en las que los compuestos y composiciones de la presente invención pueden incorporarse para administración por vía oral o mediante inyección incluyen disoluciones acuosas, jarabes adecuadamente aromatizados, suspensiones acuosas o de aceite, y emulsiones aromatizadas con aceites comestibles tales como aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de coco o aceite de cacahuete, además de elixires y vehículos farmacéuticos similares.

Composiciones para inhalación o insuflación incluyen disoluciones y suspensiones en disolventes acuosos u orgánicos farmacéuticamente aceptables, o mezclas de los mismos, y polvos. Las composiciones líquidas o sólidas pueden contener excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados como se describen arriba. En algunas realizaciones, las composiciones se administran por vía oral o respiratoria nasal para efecto local o sistémico. Las composiciones pueden nebulizarse por el uso de gases inertes. Las disoluciones nebulizadas pueden respirarse directamente del dispositivo nebulizador o el dispositivo nebulizador puede unirse a una tienda facial o respirador de presión positiva intermitente. Pueden administrarse composiciones en disolución, suspensión o en polvo por vía oral o nasalmente de dispositivos que administran la formulación de un modo apropiado.

La cantidad de compuesto o composición administrada a un paciente variará dependiendo de lo que se esté administrando, el fin de la administración, tal como profilaxis o terapia, el estado del paciente, el modo de administración y similares. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones pueden administrarse a un paciente que ya padece una enfermedad en una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente los síntomas de la enfermedad y sus complicaciones. Dosis eficaces dependerán de la afección de enfermedad que esté tratándose, además del criterio del profesional clínico que atiende, dependiendo de factores tales como la gravedad de la enfermedad, la edad, peso y condición general del paciente, y similares.

Las composiciones administradas a un paciente pueden estar en forma de composiciones farmacéuticas descritas anteriormente. Estas composiciones pueden esterilizarse por técnicas de esterilización convencionales, o pueden esterilizarse por filtración. Las disoluciones acuosas pueden envasarse para su uso como tales, o liofilizarse, siendo la preparación liofilizada combinada con un vehículo acuoso estéril antes de la administración. El pH de las preparaciones de compuestos normalmente estará entre 3 y 11, más preferentemente de 5 a 9, y lo más preferentemente de 7 a 8. Se entenderá que el uso de ciertos de los excipientes, vehículos o estabilizadores anteriores producirá la formación de sales farmacéuticas.

La dosificación terapéutica de los compuestos de la presente invención puede variar según, por ejemplo, el uso particular para el que se hace el tratamiento, el modo de administración del compuesto, la salud y condición del

paciente y el criterio del médico que receta. La proporción o concentración de un compuesto de la invención en una composición farmacéutica puede variar dependiendo de varios factores que incluyen dosificación, características químicas (por ejemplo, hidrofobia) y la vía de administración. Por ejemplo, los compuestos de la invención pueden proporcionarse en una disolución de tampón fisiológica acuosa que contiene de aproximadamente el 0,1 a aproximadamente el 10 % en peso/volumen del compuesto para administración parenteral. Algunos intervalos de dosis típicos son de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 1 g/kg de peso corporal por día. En algunas realizaciones, el intervalo de dosis es de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por día. Es probable que la dosificación dependa de variables tales como el tipo y grado de progresión de la enfermedad o trastorno, el estado de salud global del paciente particular, la eficacia biológica relativa del compuesto seleccionado, la formulación del excipiente y su vía de administración. Dosis eficaces pueden extrapolarse de las curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de prueba de modelos *in vitro* o en animales.

Métodos de identificación de un compuesto útil relacionados con la inhibición de la escisión de Her-2 por ADAM10 y ADAM15

La presente divulgación también incluye un método de identificación de un compuesto que puede afectar la interacción de ADAM10, 15, o ambas, con Her-2. El método comprende poner en contacto una primera mezcla de reacción que contiene Her-2 y una ADAM10, 15, o ambas, con un compuesto de prueba, luego ensayar la primera mezcla de reacción para la aparición de p95. Un menor nivel de p95 en la primera mezcla de reacción, cuando se compara con una segunda mezcla de reacción que contiene Her-2 y ADAM10, 15, o ambas, sin el compuesto de prueba, es indicativo de un compuesto que puede afectar la interacción de ADAM10, 15, o ambas, con Her-2. Un compuesto tal se define en el presente documento como que inhibe la interacción de ADAM10, 15, o ambas, con Her-2, y que el menor nivel de p95 es indicativo de una disminución de la proteólisis de Her-2 por ADAM. La divulgación incluye cualquier compuesto identificado por los métodos desvelados en el presente documento.

La divulgación engloba un método de identificación de un compuesto que inhibe la escisión de Her-2. El método comprende poner en contacto una ADAM con un compuesto de prueba en una mezcla que comprende un sustrato de ADAM conocido. Tales sustratos son muy conocidos en la técnica e incluyen diversos péptidos conocidos por ser escindidos por ADAM bajo condiciones de reacción conocidas. Así, un experto en la materia, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, apreciaría que, desde que se sabe ahora, por primera vez, que ADAM10 y ADAM15 escinden específicamente Her-2, la capacidad de un compuesto de prueba para inhibir la escisión de Her-2 puede ensayarse evaluando la capacidad del compuesto para inhibir la escisión de un sustrato conocido por tanto una, como ambas, de estas ADAM. Por tanto, puede usarse una amplia plétora de ensayos reconocidos en la técnica para evaluar la actividad de ADAM10, ADAM15, o ambas, para identificar un compuesto útil que pueda inhibir la escisión de Her-2 por aquellas enzimas. Más específicamente, la escisión de una ADAM conocida (10, 15 o ambas) puede evaluarse en ausencia de un compuesto de prueba. La escisión del mismo sustrato puede evaluarse, bajo condiciones idénticas, en ausencia del compuesto de prueba. Entonces puede compararse la escisión del sustrato en presencia o ausencia del compuesto. Un experto en la materia entendería que cuando hay detectablemente menos escisión del sustrato en presencia del compuesto en comparación con el nivel de escisión del sustrato en ausencia del compuesto, el compuesto inhibe la escisión por ADAM de su sustrato. Por consiguiente, el experto apreciaría, provisto de las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, que debido a que los datos desvelados en el presente documento demuestran que ADAM, más específicamente, ADAM10 y ADAM15, median en la escisión de Her-2, una sustancia que inhibe la escisión de un sustrato por ADAM10, ADAM15, o ambas, también inhibirá la escisión de Her-2 por ADAM10, ADAM15, o ambas. Así, la divulgación engloba un ensayo útil para identificar inhibidores útiles de la escisión de Her-2. Estos compuestos son útiles porque se sabe que la escisión de Her-2 por ADAM media en un efecto perjudicial, lo más probablemente mediado por la producción de la porción p95 de Her-2. Sin desear ceñirse a teoría particular alguna, independientemente del mecanismo por el cual la inhibición de la escisión de Her-2 medie en diversos efectos sobre procesos celulares, como se demuestra por los datos desvelados en el presente documento, la utilidad de un compuesto que inhibe la escisión de Her-2 mediada por ADAM10, ADAM 15, o ambas, se demuestra ampliamente por los datos desvelados en el presente documento. La divulgación engloba un compuesto identificado usando este método.

La presente divulgación también incluye un método de identificación de un compuesto que puede afectar la interacción de ADAM10, 15, o ambas, con Her-2. El método comprende poner en contacto una primera mezcla de reacción que contiene Her-2 y ADAM con un compuesto de prueba, luego ensayar la primera mezcla de reacción para la aparición de ECD105. Un menor nivel de ECD105 en la primera mezcla de reacción, cuando se compara con una segunda mezcla de reacción que contiene Her-2 y ADAM10, 15, o ambas, sin el compuesto de prueba, es indicativo de un compuesto que puede afectar la interacción de ADAM10, 15, o ambas, con Her-2. Un compuesto tal se define en el presente documento como que inhibe la interacción de ADAM10, 15, o ambas, con Her-2, ya que el menor nivel de ECD105 es indicativo de una disminución de la proteólisis de Her-2 por ADAM10, 15, o ambas. La divulgación incluye cualquier compuesto identificado por los métodos desvelados en el presente documento.

En una realización de la divulgación se identifican los compuestos que pueden inhibir la escisión mediada por ADAM10, 15, o ambas, de Her-2 para formar p95 y ECD105. Un experto en la materia sabrá, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, que ADAM10 o ADAM15 de longitud completa purificada,

formas truncadas de ADAM10 o ADAM15 que retienen el dominio de metaloproteasa, o medio acondicionado que contiene formas solubles de ADAM10 o ADAM15 recombinante que retienen los dominios de metaloproteasa, pueden ensayarse usando cualquiera de una variedad de ensayos de proteasa. ADAM10 o ADAM15 pueden ensayarse mediante el uso de sustratos de péptido que engloban el sitio de escisión natural de Her-2 u otros sustratos conocidos para convertasas, que incluyen, pero no se limitan a: APP, Notch, delta, TNF-alfa, TGF-alfa, HB-EGF, CSF-1, receptor del factor de crecimiento nervioso, receptor del factor de crecimiento de hepatocitos Met, neuregulina, fractalquina, colágeno y gelatina. Los formatos de los ensayos para detectar la escisión de un sustrato por ADAM10 o ADAM15, o ambas, podrían incluir, pero no se limitan a, marcar el sustrato con un grupo fluorescente sobre un lado del sitio de escisión y con un grupo extintor de la fluorescencia sobre el lado opuesto del sitio de escisión. Tras la escisión, estos sustratos de péptido fluorogénicos proporcionan una señal detectable. La generación de un producto escindido podría ensayarse usando anticuerpos para neo-epítope que reconocieron los extremos N o C recientemente generados. En este último caso, los formatos de los ensayos podrían incluir polarización por fluorescencia (Levine y col., 1997, Anal. Biochem. 247:83-88) o HTRF (Preaudator y col., 2002, J. Biomol. Screen. 7:267-274). Alternativamente, el sustrato puede marcarse con un grupo saliente colorimétrico que se absorbe más fuertemente tras la escisión.

En un aspecto de la divulgación, un compuesto identificado por un método de la presente divulgación, compuesto que es capaz de inhibir la escisión mediada por ADAM de Her-2 para p95 y ECD105, se cita en las Figuras 6 a 10. En otro aspecto de la presente invención, un compuesto identificado por un método de la presente invención, compuesto que es capaz de inhibir la escisión mediada por ADAM de Her-2 para p95 y ECD105, incluye (6S,7S)-N-hidroxi-5-metil-6-[(4-fenilpiperidin-1-il)carbonil]-5-azaespiro[2.5]octano-7-carboxamida, (6S,7S)-N-hidroxi-5-metil-6-[(4-fenil-3,6-dihidropiridin-1(2H)-il)carbonil]-5-azaespiro[2.5]octano-7-carboxamida, (6S,7S)-N-hidroxi-6-[(3-fenilpirrolidin-1-il)carbonil]-5-azaespiro[2.5]octano-7-carboxamida, (6S,7S)-N-hidroxi-6-[(4-(metilsulfonyl)fenil)-3,6-dihidropiridin-1(2H)-il)carbonil]-5-azaespiro(2,5)octano-carboxamida, (2S,3S)-N-hidroxi-1-metil-2-((10aS)-3,4,10,10a-tetrahidropirazino(1,2-a)indol-2(1H)-il-carbonil)piperidin-3-carboxamida, (6S,7S)-N-hidroxi-6-((10aS)-3,4,10,10a-tetrahidropirazino(1,2-a)indol-2(1H)-il-carbonil)-5-azaespiro(2,5)octano-7-carboxamida, (6S,7S)-N-hidroxi-6-((4-(3-(metilsulfonyl)fenil)-3,6-dihidropiridin-1(2H)-il)carbonil)-5-azaespiro(2,5)octano-7-carboxamida, (6S,7S)-7-[(hidroxiamino)carbonil]-6-[(4-fenil-3,6-dihidropiridin-1(2H)-il)carbonil]-5-azaespiro[2.5]octano-5-carboxilato de metilo, (6S,7S)-7-[(hidroxiamino)carbonil]-6-[(4-fenil-3,6-dihidropiridin-1(2H)-il)carbonil]-5-azaespiro[2.5]octano-5-carboxilato de bencilo, (6S,7S)-N-hidroxi-5-(metilsulfonyl)-6-[(4-fenil-3,6-dihidropiridin-1(2H)-il)carbonil]-5-azaespiro[2.5]octano-7-carboxamida y (6S,7S)-N-hidroxi-6-[[4-(3-metoxifenil)piperidin-1-il]carbonil]-5-metil-5-azaespiro[2.5]octano-7-carboxamida, cada uno de los cuales puede prepararse según los métodos descritos en documento de EE.UU. nº de serie 60/534.501.

Por tanto, la presente divulgación también incluye un método de identificación de un compuesto que puede potenciar la interacción de ADAM con Her-2. El método comprende poner en contacto una primera mezcla de reacción que contiene Her-2 y ADAM10, 15, o ambas, con un compuesto de prueba, luego ensayar la primera mezcla de reacción para la aparición de p95. Un mayor nivel de p95 en la primera mezcla de reacción, cuando se compara con una segunda mezcla de reacción que contiene Her-2 y ADAM sin el compuesto de prueba, es indicativo de un compuesto que puede potenciar la interacción de ADAM con Her-2. Un compuesto tal se define en el presente documento como que potencia la interacción de ADAM con Her-2, ya que el mayor nivel de p95 es indicativo de un aumento de la escisión de Her-2 por ADAM. La invención incluye cualquier compuesto identificado por este método.

Sinergia de MPI con otros agentes farmacéuticos

Método de afectar sinérgicamente una célula tumoral

Ventajosamente, la presente invención proporciona usos para el tratamiento sinérgico de cáncer en el que los datos desvelados en el presente documento demuestran, por primera vez, un novedoso método sinérgico para inhibir el crecimiento y/o para inducir la muerte de una célula tumoral que expresa en exceso Her-2, tal como la encontrada en muchos cánceres, que incluyen cánceres de mama, ovario, próstata, de pulmón de células no pequeñas, colon, glioma, pancreático y similares. Los métodos desvelados en el presente documento comprenden administrar una cantidad inhibidora de Her-2 sinérgicamente eficaz de al menos un MPI que inhibe la escisión de Her-2, y al menos uno de los siguientes agentes sinérgicos: (1) un anticuerpo que antagoniza el crecimiento de células mediado por Her-2, y, opcionalmente, (2) un agente citotóxico, y/o (3) un inhibidor de un miembro de la familia de tirosina cinasa de EGFR. Por el término "agente sinérgico" se indica cualquier compuesto o sustancia que incluye, por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos y moléculas pequeñas, que muestran sinergia con un MPI. En algunas realizaciones, los métodos implican administrar una cantidad sinérgicamente eficaz de al menos un MPI que inhibe la escisión de Her-2 y uno o más de un agente sinérgico seleccionado de un anticuerpo, citotoxina e inhibidor de tirosina cinasa de EGFR. En otras realizaciones, los usos implican administrar una cantidad sinérgicamente eficaz de al menos un MPI que inhibe la escisión de Her-2, al menos un anticuerpo y al menos un agente antiproliferativo. En otras realizaciones, los usos implican administrar una cantidad sinérgicamente eficaz de al menos un MPI que inhibe la escisión de Her-2, al menos un anticuerpo y al menos un inhibidor de molécula pequeña de EGFR-1. En otras realizaciones, los usos implican administrar una cantidad sinérgicamente eficaz de al menos un MPI que inhibe la escisión de Her-2 y al menos un agente antiproliferativo. En otras

realizaciones, los usos implican administrar una cantidad sinérgicamente eficaz de al menos un MPI que inhibe la escisión de Her-2 y al menos una citotoxina. En otras realizaciones, los usos implican administrar una cantidad sinérgicamente eficaz de al menos un MPI que inhibe la escisión de Her-2, al menos una citotoxina y al menos un agente antiproliferativo.

Inesperadamente, se ha encontrado que el uso de: (1) al menos un MPI que inhibe la escisión de Her-2, en el que tal escisión medió en la liberación de ECD produciendo así una "punta" de p95 que sigue asociada a la célula, y (2) un anticuerpo que antagoniza el crecimiento celular mediado por Her-2, tal como Herceptin™, proporciona un efecto sinérgico que produce la inhibición del crecimiento de la célula de forma que pueda administrarse menos anticuerpo para mediar en el mismo efecto inhibitor del crecimiento que una mayor cantidad del mismo anticuerpo. Además, la adición de al menos un inhibidor de un miembro de la familia de tirosina cinasa de EGFR potencia adicionalmente el efecto citostático de Herceptin™, y/o el inhibidor, de forma que, entre otras cosas, la inhibición del crecimiento y proliferación celular se induzca usando cantidades mucho menores, es decir, uno a dos logaritmos, del anticuerpo que cuando el anticuerpo se usa en ausencia del MPI. Similarmente, cuando el MPI se administra a una célula en presencia del anticuerpo antagonista y en presencia adicional de un agente citotóxico (por ejemplo, Taxol™), se induce muerte celular usando una cantidad mucho menor del anticuerpo y/o el agente citotóxico que cuando el anticuerpo o el agente citotóxico se usan en ausencia del MPI. Por ejemplo, los datos demuestran sorprendentemente que se requirió aproximadamente 10-100 veces menos anticuerpo antagonista en presencia del MPI que cuando el anticuerpo se usó sin el MPI para mediar en el mismo efecto. Similarmente, los datos demuestran que se requirió menos agente citotóxico (por ejemplo, Taxol) cuando se administró con el anticuerpo y el MPI que cuando se administró a una célula en ausencia de la combinación de un anticuerpo y un MPI.

Además, la invención se refiere al novedoso descubrimiento de que la proteasa que escinde Her-2 para producir la punta de p95 es un polipéptido ADAM tal como, por ejemplo, ADAM10 o ADAM15, de forma que la invención se refiere a usar un MPI que inhibe ADAM (por ejemplo, ADAM10, ADAM15, o ambas) en los métodos sinérgicos expuestos en el presente documento. Aunque la invención no se limita a ningún MPI particular, algunas realizaciones de la invención implican MPI que inhiben ADAM10, ADAM15, o ambas.

Con o sin el compuesto citotóxico o un inhibidor de un miembro de la familia de tirosina cinasa de EGFR, la co-administración de un MPI inhibidor de la escisión y un anticuerpo antagonista de Her-2 proporciona un sorprendente efecto sinérgico tal que una cantidad mucho menor del anticuerpo media en un efecto citostático inhibitor del crecimiento en una célula que expresa en exceso Her-2 que cuando el anticuerpo se administra en ausencia del MPI. Por tanto, la divulgación proporcionada en el presente documento proporciona una mejora significativa en los agentes terapéuticos basándose en la administración de un anticuerpo antagonista de Her-2. Esto es debido a que es muy sabido en la técnica que los métodos relacionados con la administración de, por ejemplo, Herceptin™, están enormemente impedidos por la pequeña cantidad de anticuerpo que llega a la célula tumoral, reduciendo así enormemente el beneficio terapéutico derivado de tal terapia basada en anticuerpos. Así, los métodos desvelados en el presente documento vencen un antiguo obstáculo en la materia de la terapia tumoral basada en anticuerpos.

Así, el experto apreciaría, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, que la terapia celular basada en anticuerpos, en la que se desea un efecto citostático (es decir, inhibición del crecimiento), citotóxico (es decir, muerte celular), o ambos, mejora enormemente administrando un MPI inhibidor de la escisión de Her-2 conjuntamente con un anticuerpo antagonista de Her-2. Adicionalmente, cuando se desea un efecto citotóxico (es decir, destrucción de células), el efecto citotóxico de un agente se potencia sinérgicamente administrando el agente citotóxico (que engloba una amplia plétora de compuestos que incluyen, pero no se limitan a, Taxol) conjuntamente con un MPI inhibidor de la escisión de Her-2 y un anticuerpo antagonista de Her-2. Así, el sorprendente efecto sinérgico proporcionado co-administrando un anticuerpo antagonista de Her-2 y un MPI inhibidor de la escisión de Her-2 proporciona terapia celular citotóxica enormemente mejorada cuando se desea muerte celular usando un compuesto citotóxico conjuntamente con el anticuerpo y el MPI.

Además, los datos desvelados en el presente documento demuestran que el efecto antitumoral sinérgico también se observa cuando un MPI y un anticuerpo se administran conjuntamente con un inhibidor de un miembro de la familia de tirosina cinasa de EGFR (por ejemplo, Iressa). Así, el efecto antitumoral sinérgico está sorprendentemente mediado incluso cuando no se sabe que el inhibidor afecte directamente Her-2 y/o su procesamiento.

Así, un inhibidor de molécula pequeña específico para un miembro de la familia de tirosina cinasa de EGFR, ejemplificado por EGFR-1, también media en un efecto inhibitor del crecimiento celular citostático sinérgico cuando se administra con Herceptin™ y un MPI, y un experto en la materia entendería, basándose en estos sorprendentes datos, que los compuestos que pueden administrarse con el MPI y el anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, moléculas y compuestos que, en cualquier forma o estado actúan antagonizando la formación, progresión y mantenimiento de tumores, o cualquier proceso biológico relacionado. Ejemplos de estos agentes incluyen, pero no se limitan a, agentes antiproliferativos tales como otros inhibidores del factor de crecimiento epidérmico, inhibidores de Her-2, inhibidores de Met cinasas, inhibidores de MEK-1 cinasas, inhibidores de MAPK cinasas, inhibidores de PI3, inhibidores de Src cinasas, inhibidores de PDGF, inhibidores de la señalización de integrinas e inhibidores de los receptores del factor de crecimiento similar a la insulina y cualquier anticuerpo poli- y monoclonal que antagonice las anteriores cinasas/receptores/rutas de señalización; agentes antiangiogénesis tales como otros inhibidores de la

metaloproteinasas y anticuerpos anti-VEGF y moléculas pequeñas tales como ZD6474 y SU6668.

Los agentes antiproliferativos también incluyen agentes que se usan como tratamiento hormonal. Ejemplos de tales agentes incluyen, pero no se limitan a, Casodex™ (también denominado bicalutamida, AstraZeneca), que convierte los carcinomas dependientes de andrógenos en no proliferativos y el antiestrógeno tamoxifeno, que inhibe la proliferación o crecimiento de cáncer de mama dependiente de estrógenos. Ejemplos también incluyen, pero no se limitan a, sustancias naturales, vacunas, oligonucleótidos antisentido, ribozimas, interferencias por ARN y terapias génicas que se conocen en la técnica y como se desarrollarán en el futuro para tratar tumores malignos que expresan en exceso Her-2 y otros.

El experto apreciaría que la presente invención engloba el uso de más de un MPI inhibidor de la escisión de Her-2 y/o anticuerpo antagonista, y no se limita a ningún MPI o anticuerpo particular. Además, la invención engloba el uso de cualquier agente citotóxico, cualquier inhibidor expuesto en cualquier parte en el presente documento (por ejemplo, un inhibidor de un miembro de la familia de tirosina cinasas de EGFR, entre otros), y similares, en cualquier combinación o permutación de los mismos.

Un experto en la materia podría establecer fácilmente, basándose en las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, si un anticuerpo, un MPI, o cualquier otro inhibidor o sustancia de interés, o cualquier combinación de los mismos, cuando se administra a una célula que expresa en exceso Her-2, media en el efecto sinérgico deseado desvelado en el presente documento. Esto es debido a que, como se ejemplifica en el presente documento, los métodos para evaluar si (1) una célula expresa en exceso Her-2, (2) un MPI inhibe la escisión de Her-2, (3) un anticuerpo antagoniza el crecimiento celular en la célula que expresa en exceso Her-2, y (4) la combinación del anticuerpo antagonista con el MPI reduce la cantidad de anticuerpo que debe administrarse para lograr el mismo nivel de inhibición de la escisión de Her-2, que, a su vez, media en el efecto deseado (por ejemplo, inhibición del crecimiento y división celular y/o promoción de muerte celular) se desvelan en el presente documento y/o son muy conocidos en la técnica. Por consiguiente, siguiendo las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, el rutinario puede mediar en la inhibición del crecimiento celular deseado y/o citotoxicidad usando una amplia plétora de combinaciones que comprenden al menos un anticuerpo que se une específicamente a Her-2 y al menos un MPI, con o sin un compuesto adicional, y cualquier permutación de las mismas.

La presente invención proporciona usos para el tratamiento sinérgico de una variedad de enfermedades o trastornos mediados por una célula que expresa en exceso Her-2, que incluyen, pero no se limitan a, cáncer tal como cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, glioma, cáncer pancreático, cáncer de colon, cáncer de pulmón de células no pequeñas y similares. Esto es debido a que, ventajosamente, el uso sinérgico de la presente invención reduce el crecimiento y/o viabilidad de una célula tumoral que expresa en exceso Her-2, reduciendo así la carga tumoral, produciendo la regresión tumoral, o ambas.

En general, pueden administrarse numerosos agentes sinérgicos en una combinación con un MPI que incluyen, por ejemplo, agentes antineoplásicos. Como se usa en el presente documento, el término “agente antineoplásico” es sinónimo de “agente quimioterapéutico” y se refiere a compuestos que previenen que las células cancerosas se multipliquen (es decir, agentes antiproliferativos). En general, el (los) agente(s) antineoplásico(s) de la presente invención se clasifica(n) en dos clases, agentes citotóxicos y citostáticos. Sin desear ceñirse a teoría particular alguna, los agentes citotóxicos previenen que las células cancerosas se multipliquen: (1) interfiriendo con la capacidad de la célula para replicar el ADN y (2) induciendo la muerte celular y/o apoptosis en las células cancerosas. Los agentes citostáticos o quiescentes actúan modulando, interfiriendo o inhibiendo los procesos de transducción de señales celulares que regulan la proliferación celular.

Clases de compuestos que pueden usarse como agentes citotóxicos incluyen las siguientes:

Agentes alquilantes (incluyendo, sin limitación, mostazas de nitrógeno, derivados de etilenimina, sulfonatos de alquilo, nitrosoureas y triazenos): Mostaza de uracilo, clormetina, ciclofosfamida (Cytosan™), ifosfamida, melfalan, clorambucilo, pipobromano, trietilen-melamina, trietileno fosforamina, busulfano, carmustina, lomustina, estreptozocina, dacarbazina y temozolomida.

Antimetabolitos (incluyendo, sin limitación, antagonistas de ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina e inhibidores de adenosina desaminasa): Metotrexato, 5-fluorouracilo, floxuridina, citarabina, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, fosfato de fludarabina, pentostatina y gemcitabina.

Productos naturales y sus derivados (por ejemplo, alcaloides de la vinca, antibióticos antitumorales, enzimas, linfocinas y epipodofilotoxinas): Vinblastina, vincristina, vindesina, bleomicina, dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, idarubicina, Ara-C, paclitaxel (el paclitaxel está comercialmente disponible como Taxol™), mitramicina, desoxico-formicina, mitomicina-C, L-asparaginasa, interferones (especialmente IFN- α), etopósido y tenipósido.

Otros agentes citotóxicos son navelbeno, CPT-11, anastrozol, letrozol, capecitabina, reloxafina, ciclofosfamida, ifosamida y droloxafina.

Los agentes que afectan los microtúbulos interfieren con la mitosis celular y son muy conocidos en la técnica por su actividad citotóxica. Agentes que afectan los microtúbulos útiles en la invención incluyen, pero no se limitan a, alocolchicina (NSC 406042), halicondrina B (NSC 609395), colchicina (NSC 757), derivados de colchicina (por ejemplo, NSC 33410), dolastatina 10 (NSC 376128), maitansina (NSC 153858), rizoxina (NSC 332598), paclitaxel (Taxol™, NSC 125973), derivados de Taxol™ (por ejemplo, derivados NSC 608832), tiocolchicina (NSC 361792), tritilcisteína (NSC 83265), sulfato de vinblastina (NSC 49842), sulfato de vincristina (NSC 67574), epotilonas naturales y sintéticas que incluyen, pero no se limitan a, epotilona A, epotilona B y discodermolida (véase Service, 1996, Science 274:2009), estramustina, nocodazol, MAP4 y similares. Ejemplos de tales agentes también se describen en la bibliografía científica y de patentes, véanse, por ejemplo, Bulinski, 1997, J. Cell Sci. 110:3055-3064; Panda, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:10560-10564; Muhlradt, 1997, Cancer Res. 57:3344-3346; Nicolaou, 1997, Nature 387:268-272; Vasquez, 1997, Mol. Biol. Cell. 8:973-985; Panda, 1996, J. Biol. Chem 271:29807-29812.

El término "paclitaxel", como se usa en el presente documento, se refiere al fármaco comercialmente disponible como Taxol™ (número NSC: 125973). Taxol™ inhibe la replicación de células eucariotas potenciando la polimerización de restos de tubulina en haces de microtúbulos estabilizados que son incapaces de reorganizarse en las estructuras apropiadas para la mitosis. De los muchos fármacos quimioterapéuticos disponibles, el paclitaxel ha generado interés debido a su eficacia en ensayos clínicos contra tumores resistentes a fármacos, que incluyen tumores de ovario y de glándulas mamarias (Hawkins (1992) Oncology, 6: 17-23, Horwitz, 1992, Trends Pharmacol. Sci. 13: 134-146, Rowinsky, 1990, J. Natl. Canc. Inst. 82:1247-1259).

Otros agentes citotóxicos de ejemplo son compuestos con actividad similar a paclitaxel. Éstos incluyen, pero no se limitan a, paclitaxel y derivados de paclitaxel (compuestos similares a paclitaxel) y análogos. El paclitaxel y sus derivados están comercialmente disponibles. Además, los métodos de preparación de paclitaxel y derivados y análogos de paclitaxel son muy conocidos para aquellos expertos en la materia (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 5.569.729; 5.565.478; 5.530.020; 5.527.924; 5.508.447; 5.489.589; 5.488.116; 5.484.809; 5.478.854; 5.478.736; 5.475.120; 5.468.769; 5.461.169; 5.440.057; 5.422.364; 5.411.984; 5.405.972; y 5.296.506).

Así, agentes citotóxicos que son adecuados para su uso en los métodos y composiciones de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, agentes estabilizantes de microtúbulos tales como paclitaxel (también conocido como Taxol™), docetaxel (también conocido como Taxotere™), 7-O-metilmetilpaclitaxel (desvelado en la patente de EE.UU. n° 5.646.176), 4-desacetil-4-metilcarbonatopaclitaxel, 3'-terc-butil-3'-N-terc-butiloxycarbonil-4-desacetil-3'-desfenil-3'-N-desbenzoil-4-O-metoxycarbonil-paclitaxel (desvelado en la patente de EE.UU. n° 6.537.988), carbonato de metilo C-4 de paclitaxel (desvelado en documento WO 94/14787), epotilona A, epotilona B, epotilona C, epotilona D, desoxiepotilona A, desoxiepotilona B, [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-7-11-dihidroxi-8,8,10,12,16-pentametil-3-[1-metil-2-(2-metil-4-tiazolil)ethenil]-4-aza-17-oxabicyclo[14.1.0]heptadecano-5,9-diona (desvelada en el documento WO 99/02514), [1S-[1R*,3R*(E),7R*,10S*,11R*,12R*,16S*]]-3-[2-[2-(aminometil)-4-tiazolil]-1-metiletenil]-7,11-dihidroxi-8,8,10,12,16-pentametil-4-17-dioxabicyclo[14.1.0]heptadecano-5,9-diona (desvelada en las patentes de EE.UU. n° 6.262.094 y 6.537.988), y derivados de los mismos; y agentes disruptores de microtúbulos.

También son adecuados agentes citotóxicos tales como epidofilotoxina; una enzima antineoplásica; un inhibidor de la topoisomerasa; procarbazona; mitoxantrona; complejos de coordinación con platino tales como cis-platino y carboplatino; modificadores de la respuesta biológica; inhibidores del crecimiento; agentes terapéuticos antihormonales; leucovorina; tegafur; y factores de crecimiento hematopoyéticos.

Agente(s) citostático(s), tales como Herceptin™, son agentes que hacen que las células se vuelvan "no proliferativas" o "quiescentes". El agente citostático antiproliferativo de la invención es un anticuerpo antagonista de Her-2, como se ejemplifica por Herceptin™. Un experto en la materia entendería, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, que un anticuerpo antagonista de Her-2 engloba Herceptin™, pero no se limita a tal anticuerpo. Más bien, la presente invención incluye otros anticuerpos antagonistas de Her-2, tal como se conocen presentemente, que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos anti-Her-2 (por ejemplo, 2C4, 4D5, Trastuzumab-DM1; todos disponibles de Genentech, Inc.) y anticuerpos anti-EGFR-1 (por ejemplo, IMC-C225 (ImClone Systems, Inc.) y ABX-EGF (Abgenix, Inc.)), o tales anticuerpos antagonistas como pueden desarrollarse en el futuro.

Como se usa en el presente documento, "agente citostático" es sinónimo de "agente quiescente" y se refiere a cualquier medio de ralentizamiento de la tasa de la división celular o crecimiento tumoral de manera que las células se conviertan en no proliferativas o de manera que su comportamiento se aproxime al de células no proliferativas. Agentes citostáticos o "quiescentes" antiproliferativos a modo de ejemplo de la invención incluyen, sin limitación, Herceptin™ (también denominado trastuzumab).

Los métodos para la administración segura y eficaz de la mayoría de estos agentes quimioterapéuticos son conocidos para aquellos expertos en la materia. Además, su administración se describe en la bibliografía estándar. Por ejemplo, la administración de muchos de los agentes quimioterapéuticos se describe en "Medical Desk Reference" (PDR, por ejemplo, edición de 1996, Medical Economics Company, Montvale, NJ), cuya divulgación se incorpora en el presente documento por referencia como si se expusiera en su totalidad.

El experto entendería, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, que la cantidad de MPI inhibidor de la escisión de Her-2 es normalmente tal que una cantidad detectable de la escisión de Her-2 se inhiba cuando se compara con el nivel de escisión de Her-2 en la célula antes de la administración del MPI o cuando se compara con el nivel de la escisión de Her-2 en una célula por lo demás idéntica a la cual no se administra el MPI. Preferentemente, el nivel detectable de la escisión de Her-2 disminuye aproximadamente al menos el 30 %, más preferentemente aproximadamente al menos el 40 %, incluso más preferentemente aproximadamente al menos el 50 %, todavía más preferentemente al menos aproximadamente el 60 %, preferentemente al menos aproximadamente el 70 %, incluso más preferentemente al menos aproximadamente el 80 %, lo más preferentemente al menos aproximadamente el 90 %. Incluso más preferentemente, el nivel detectable de la escisión de Her-2 se inhibe al menos aproximadamente el 95 %, todavía más preferentemente al menos aproximadamente el 99 %, y lo más preferentemente se inhibe aproximadamente el 100 %. Por consiguiente, aunque se requiere un nivel umbral de inhibición de convertasa, la inhibición no necesita ser, aunque puede ser, completa, de forma que, preferentemente, se desea que al menos el 90 % de la inhibición de la escisión de Her-2 proporcione el efecto sinérgico cuando se añada un agente citostático y/o citotóxico.

Así, un experto en la materia entendería, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, que la cantidad de MPI media en una disminución detectable en el nivel de la escisión de Her-2 con el fin de mediar en un efecto sinérgico cuando un anticuerpo antagonista de Her-2 se administra con el MPI. La cantidad del anticuerpo antagonista requerida será entonces mucho menor al nivel del anticuerpo requerido para mediar en el mismo efecto citostático en ausencia del MPI. La cantidad sinérgica del MPI y el anticuerpo antagonista puede determinarse fácilmente para cada célula tumoral que expresa en exceso Her-2 de interés, y variará por, entre otras cosas, el nivel de Her-2 expresada en la célula, y otros parámetros como se evalúan rutinariamente por aquellos expertos en la materia.

En resumen, el efecto sinérgico logrado usando los novedosos métodos y composiciones de la presente invención es mayor que la suma de los efectos que resultan de los métodos y composiciones que comprenden usar el agente citotóxico (por ejemplo, Taxol™) o citostático (es decir, un anticuerpo antagonista de Her-2 tal como, pero no se limitan a, Herceptin™), o un inhibidor de una familia de tirosina cinasa de EGFR (por ejemplo, el inhibidor de molécula pequeña de EGFR-1, Iressa™), tanto individualmente como en ausencia de un MPI inhibidor de la escisión de Her-2. Ventajosamente, tal sinergia entre compuestos permite el uso de dosis más pequeñas de al menos un compuesto, proporciona mayor eficacia a las mismas dosis y/o previene o retrasa la formación de resistencia a múltiples fármacos.

Ventajas adicionales frente a los métodos previamente desvelados incluyen la capacidad de la presente combinación de un MPI y al menos un agente seleccionado del grupo que consiste en un agente citostático (es decir, un anticuerpo antagonista de Her-2), un inhibidor de una familia de tirosina cinasa de EGFR (por ejemplo, Iressa™) y/o un agente citotóxico (por ejemplo, Taxol™, Cisplatin™ y similares), de variarse individualmente dependiendo de la naturaleza de la célula que expresa en exceso Her-2 que va a tratarse. Los datos desvelados en cualquier parte en el presente documento indican que el efecto terapéutico de las presentes composiciones puede lograrse con cantidad inferior a la óptima del (de los) agente(s) citotóxico(s) o citostático(s) y MPI que la que se requeriría si tales agentes y compuestos se administraran individualmente. El novedoso enfoque desvelado en el presente documento de combinar, entre otras cosas, Herceptin y MPI evita cualquier efecto de toxicidad adversa no basada en el mecanismo que podría resultar de la administración de una cantidad de agente(s) citotóxico(s) o citostático(s) y compuestos MPI solo suficiente para lograr el mismo efecto terapéutico.

Las presentes composiciones logran un efecto terapéutico sinérgico y presentan ventaja terapéutica inesperada con respecto al efecto de cualquiera de los compuestos de componentes o métodos cuando se administran individualmente. Además, tales combinaciones pueden dirigirse eficazmente a células proliferativas, proporcionando un efecto sinérgico cuando un MPI inhibidor de la escisión de Her-2 se combina con un inhibidor de Her-2 citostático (es decir, un anticuerpo antagonista tal como, por ejemplo, Herceptin™) y/o con un agente citotóxico tal como, pero no se limita a, Taxol™, y/o con un inhibidor de un miembro de la familia de tirosina cinasa de EGFR.

El (Los) agente(s) citostático(s) antiproliferativo(s) (es decir, un anticuerpo antagonista tal como, **por ejemplo**, Herceptin™, un inhibidor de un miembro de la familia de tirosina cinasa de EGFR y similares) puede(n) administrarse, preferentemente, tras la administración de un MPI inhibidor de la escisión de Her-2; sin embargo, el anticuerpo antagonista puede administrarse a una célula simultáneamente y/o contemporáneamente con el MPI. Por tanto, puede añadirse un agente adicional (por ejemplo, un agente citotóxico, un inhibidor de un miembro de la familia de tirosina cinasa de EGFR y similares) antes, después o simultáneamente con el anticuerpo antagonista, para producir una inhibición sinérgica del crecimiento celular (para agentes citostáticos) o aumentar la muerte celular (para agentes citotóxicos).

En una realización preferida de la presente invención, el anticuerpo antagonista inhibidor de la escisión de Her-2 y el MPI inhibidor de la escisión de Her-2 se administran contemporáneamente. Sin embargo, el experto apreciaría, basándose en las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, que el MPI puede administrarse antes de la administración del anticuerpo u otro agente.

Como se usa en el presente documento, el término “simultánea” o “simultáneamente” significa que el MPI y el anticuerpo se administran dentro de al menos aproximadamente 24 horas, preferentemente al menos aproximadamente 12 horas, más preferentemente al menos aproximadamente 6 horas, incluso más preferentemente al menos aproximadamente 3 horas, todavía más preferentemente aproximadamente 1 hora, e incluso más preferentemente menos de aproximadamente 1 hora.

Métodos de identificación de un compuesto sinérgico útil

El experto apreciaría, una vez provisto de las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, que agentes sinérgicos adicionales tales como, por ejemplo, anticuerpos antagonistas para Her-2, útiles para poner en práctica los métodos de la divulgación, pueden identificarse y aislarse fácilmente usando métodos reconocidos en la materia para identificar agentes que tienen las propiedades deseadas de inhibir detectablemente el crecimiento celular mediado por Her-2 y que presentan adicionalmente un efecto sinérgico con un MPI inhibidor de la escisión de Her-2 de forma que una menor cantidad del agente sinérgico pueda inhibir el mismo nivel de crecimiento celular en presencia del MPI en comparación con la cantidad de agente sinérgico requerida para inhibir el mismo nivel de crecimiento celular en ausencia del MPI.

Similarmente, la presente divulgación engloba métodos de identificación de novedosos MPI sinérgicos que inhiben la escisión de Her-2, y MPI identificados usando tales métodos. El experto apreciaría que los métodos comprenden poner en contacto una célula que expresa en exceso Her-2 con un compuesto de prueba, en presencia o ausencia de un anticuerpo antagonista de Her-2, tal como, por ejemplo, Herceptin. El nivel de inhibición de la escisión de Her-2 se evalúa en una célula puesta en contacto con tanto el compuesto de prueba como el anticuerpo y también en una célula por lo demás idéntica puesta en contacto solo con el compuesto de prueba, y en otra célula más por lo demás idéntica puesta en contacto con solo el anticuerpo. El nivel del crecimiento celular mediado por Her-2 en las tres células se compara cuando un nivel de crecimiento celular que es inferior en la célula puesta en contacto con tanto el anticuerpo como el compuesto de prueba en comparación con el nivel en tanto la célula puesta en contacto con el anticuerpo solo como en la célula puesta en contacto con el compuesto de prueba solo, o cuando el nivel de crecimiento celular de la célula puesta en contacto con el anticuerpo y el compuesto de prueba es inferior a la suma del nivel de crecimiento de la célula puesta en contacto con el anticuerpo y el nivel de crecimiento de la célula puesta en contacto con el compuesto de prueba combinado, es una indicación de que el compuesto de prueba inhibe sinérgicamente el crecimiento celular mediado por Her-2 en una célula cuando se administra con el anticuerpo. La invención engloba compuestos identificados usando este método, tales compuestos incluyen, pero no se limitan a, aquellos ejemplificados en el presente documento, por ejemplo, el compuesto 5 y AG3340 (Prinomastat).

La presente divulgación engloba métodos de identificación de un agente sinérgico novedoso que inhibe la proliferación de una célula que expresa en exceso Her-2 y cualquier agente identificado usando tales métodos. Es decir, los métodos comprenden poner en contacto una célula que expresa en exceso Her-2 con un compuesto de prueba, en presencia de un anticuerpo antagonista de Her-2, tal como, por ejemplo, Herceptin, y un MPI (por ejemplo, el compuesto 5 y AG3340 (Prinomastat)). El nivel de inhibición de la proliferación se evalúa en una célula puesta en contacto con tanto el compuesto de prueba como el anticuerpo y MPI, en una célula por lo demás idéntica puesta en contacto solo con el compuesto de prueba, y en otra célula más por lo demás idéntica puesta en contacto con solo el anticuerpo y MPI. El nivel de crecimiento celular en las tres células se compara cuando un menor nivel de crecimiento celular en la célula puesta en contacto con el compuesto de prueba, el anticuerpo y el MPI, en comparación con el nivel en tanto la célula puesta en contacto con el anticuerpo y MPI como en la célula puesta en contacto con el compuesto de prueba solo, o cuando el nivel de crecimiento celular en la célula puesta en contacto con el compuesto de prueba, el anticuerpo y el MPI es inferior a la suma del nivel de crecimiento celular en la célula puesta en contacto con el anticuerpo y el MPI combinados con el nivel de crecimiento celular en la célula puesta en contacto con el compuesto de prueba, es una indicación de que el compuesto de prueba inhibe sinérgicamente el crecimiento celular mediado por Her-2 en una célula cuando se administra con el anticuerpo y el MPI. La invención engloba compuestos identificados usando este método, tales compuestos incluyen, pero no se limitan a, aquellos ejemplificados en el presente documento, por ejemplo, Iressa™.

Kits

La invención engloba adicionalmente kits para la práctica de los métodos desvelados en el presente documento, como se define en las reivindicaciones. Es decir, la divulgación incluye diversos kits que comprenden un compuesto, tal como un ácido nucleico que codifica un ácido nucleico complementario a un ácido nucleico que codifica una ADAM que escinde Her-2, pero en una orientación antisentido con respecto a la transcripción, un ARNip específico para una ADAM que escinde Her-2 (por ejemplo, ADAM10, ADAM15, o variante de las mismas), y/o composiciones de la invención, un aplicador y materiales de instrucciones que describen el uso del compuesto para realizar los métodos de la invención. Los kits se refieren al novedoso descubrimiento de que ADAM10, y ADAM15, escinden Her-2 para producir una punta de p95 que sigue asociada a una célula y media en y/o está asociada a diversas afecciones, enfermedades o trastornos tal que inhibir la escisión proporciona un beneficio.

Los kits también se refieren al sorprendente descubrimiento de que hay variantes de corte y empalme de ADAM15 detectada en una célula que expresa Her-2 y de la que se elimina Her-2. De hecho, los datos desvelados en el

presente documento demuestran, por primera vez, dos novedosas variantes de ADAM15, es decir, la variante 1 y la variante 2 incluso más larga, cuando la variante 1 aparece preferencialmente detectable en células que eliminan Her-2, produciendo una punta de p95 que sigue asociada a la célula.

- 5 Los kits también se refieren al novedoso descubrimiento de que la administración de ciertos MPI a una célula, cuando se combinan con diversos compuestos desvelados en el presente documento, proporciona un novedoso efecto sinérgico relacionado con la inhibición de la escisión de Her-2 para producir la punta de p95.

10 Aunque más adelante se describen kits a modo de ejemplo, el contenido de otros kits útiles será evidente para el experto en vista de la presente divulgación. Cada uno de estos kits se incluye dentro de la invención.

15 En un aspecto, la invención incluye un kit para aliviar una enfermedad mediada por la expresión en exceso de un receptor de Her-2, como se define en las reivindicaciones. El kit se usa de acuerdo con los usos desvelados en la invención. Brevemente, el kit puede usarse para poner en contacto una célula con un ácido nucleico complementario a un ácido nucleico que codifica un receptor de Her-2 cuando el ácido nucleico está en una orientación antisentido con respecto a la transcripción para reducir la expresión del receptor, o con un anticuerpo que se une específicamente a tal receptor o un ácido nucleico que codifica el anticuerpo, en el que la inhibición o reducción en la escisión de Her-2 media en un efecto beneficioso, o con un compuesto que inhibe la escisión de Her-2 por la ADAM, o combinaciones de los mismos. Además, el kit comprende un aplicador y un material de instrucciones para el uso del kit. Estas instrucciones simplemente forman parte de los ejemplos proporcionados en el presente documento.

20 El kit pueden incluir adicionalmente una cantidad sinérgica de un anticuerpo que afecta la escisión de Her-2, tal como, pero no se limita a, Herceptin. Adicionalmente, el kit puede comprender además una cantidad sinérgica de un agente citotóxico, tal como, entre otros, Taxol.

25 En otro aspecto, la invención incluye un kit para aliviar una enfermedad mediada por la expresión en exceso de un receptor de Her-2. El kit se usa de acuerdo con los métodos desvelados en la invención. Brevemente, el kit puede usarse para poner en contacto una célula con un compuesto que puede inhibir la escisión mediada por ADAM de Her-2. Como se trata en cualquier parte en el presente documento, un compuesto tal puede interaccionar con una ADAM, con Her-2, o con ambas, inhibiendo por consiguiente la escisión de Her-2 por una ADAM para formar p95 y ECD105. La inhibición de la escisión de Her-2 media así en un efecto beneficioso.

30 La invención incluye un kit que comprende una cantidad sinérgica de un anticuerpo antagonista de Her-2, un inhibidor de ADAM, un aplicador, un patrón y un material de instrucciones que describe administrar la composición a una célula o un animal. Esto debe interpretarse que incluye otras realizaciones de kits que son conocidas para aquellos expertos en la materia, tales como un kit que comprende un patrón y un disolvente (preferentemente estéril) adecuado para disolver o suspender la composición de la invención antes de administrar el compuesto a una célula o un animal. Preferentemente, el animal es un mamífero. Más preferentemente, el mamífero es un ser humano.

40 La invención engloba un kit para inhibir la proliferación de una célula que expresa en exceso Her-2. El kit comprende una cantidad sinérgica de un anticuerpo que es un antagonista de Her-2, y un inhibidor de ADAM. El kit puede comprender además una cantidad sinérgica de un agente citotóxico, que incluye, pero no se limita a, Taxol, cisplatino y similares.

45 El experto apreciaría fácilmente, basándose en la divulgación proporcionada en el presente documento, que la presente invención incluye una amplia variedad de kits para poner en práctica los diversos métodos de la invención.

50 En un aspecto de la invención, un kit de la presente invención incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición se proporciona en una cantidad apropiada como se expone en cualquier parte en el presente documento. Además, la vía de administración y la frecuencia de administración son como se han expuesto previamente en cualquier parte en el presente documento.

La invención se describe adicionalmente en detalle por referencia a los siguientes ejemplos experimentales.

55 EJEMPLOS

Ejemplo 1: Identificación de ADAM10 y ADAM15 como agentes que escinden específicamente Her-2

60 Los datos desvelados en el presente documento demuestran, por primera vez, que la escisión de Her-2 para producir un ectodominio que es liberado de una célula y una punta de p95 que sigue asociada a la célula está específicamente mediada por ADAM10 y por ADAM15. Estos datos facilitan el desarrollo de posibles agentes terapéuticos relacionados con la inhibición de la escisión de Her-2. Los materiales y métodos se describen a continuación.

65

Reactivos celulares

Se obtuvieron líneas celulares de cáncer de mama humano BT474 (HTB-20), SKBR3 (HTB-30), SKOV3 (HTB-77), MDA-MB-231 (HTB-26) y T47D (HTB-133) de la Colección Americana de Cultivos de Tejido Tipo (ATCC, Manassas, VA). Las células se mantuvieron rutinariamente en los medios recomendados por la ATCC con ligeras modificaciones. Las células se mantuvieron a 37 °C en una estufa de incubación humidificada suministrada con 5 % de CO₂. Las células BT-474 se cultivaron en RPMI 1640 (Invitrogen) complementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS), 0,01 mg/ml de insulina bovina y aminoácidos no esenciales 0,1 mM. Las células SKBR-3 se cultivaron en McCoy's 5a (Invitrogen) complementado con 10 % de FBS. Las células T47D se cultivaron en RPMI 1640 (Invitrogen) complementado con 10 % de FBS y 10 ug/ml de insulina bovina. Las células MDA-MB-231 (HTB-26) se cultivaron en DMEM (Invitrogen) complementado con 10 % de FBS. Las células SKOV3 se cultivaron en McCoy's 5a (Invitrogen) complementado con 10 % de FBS. Tanto las células BT-474 como SKBR-3 expresan en exceso Her-2 sobre la superficie y tienen alto nivel de escisión de Her-2.

Los resultados de los experimentos descritos en el presente documento son los siguientes.

Identificación de proteasas responsables de escindir Her-2

Los datos desvelados en el presente documento demuestran que ADAM10 y ADAM15 son responsables de la escisión de Her-2 para producir p95, un receptor asociado a la membrana constitutivamente activo, y ECD105, un dominio extracelular soluble derivado del receptor de Her-2. Los datos desvelados en el presente documento demuestran que diversas ADAM se expresan en células que eliminan Her-2. Además, los datos demuestran que los ARNip de ADAM10 inhibieron la eliminación de Her-2 en células que eliminan Her-2. Más específicamente, la eliminación de Her-2 en las líneas celulares BT474 y SKBr3 que eliminan Her-2 se inhibió aproximadamente el 50-70 % por ARNip de ADAM10 en comparación con células en ausencia de ARNip.

Similarmente, los datos desvelados demuestran que ADAM15 también escinde Her-2 porque el ARNip de ADAM15 redujo la eliminación de Her-2 aproximadamente el 25-30 % en células SKBr3 y aproximadamente el 10 % en células BT474 en comparación con células por lo demás idénticas en ausencia de ARNip de ADAM15.

Adicionalmente, los datos desvelados en el presente documento demuestran que hay una correlación significativa entre la inhibición de la "convertasa" de Her-2 y la inhibición de ciertas ADAM como se evalúa determinando la Cl₅₀ para numerosos compuestos para la inhibición basada en enzimas bioquímicas y la inhibición de la eliminación de Her-2.

Hay veintitrés (23) miembros anotados de la familia de ADAM en seres humanos (Figura 1). ADAM1 y ADAM3 están anotados como pseudogenes y se excluyeron del análisis adicional ya que no codifican miembros de la familia de ADAM funcionales. Doce de los miembros humanos restantes de la familia de ADAM contienen las secuencias HEXGHXXGXXHD (SEC ID N°: 45) para sitios activos de metaloproteasa (ADAM 8, 9, 10, 12, 15, 17, 19, 20, 21, 28, 30 y 33). Con la excepción de ADAM20 y ADAM21, los miembros de la familia catalíticamente activos humanos tienen estructuras génicas de intrón/exón complejas. La ausencia de intrones en la región codificante de las proteínas ADAM20 y ADAM21 eleva la posibilidad de que también puedan ser pseudogenes (Poindexter y col., 1999, Gene 237:61-70). Adicionalmente, un análisis de las secuencias genómicas y de ADNc de dominio público para ADAM20 revela que el marco de lectura abierto extiende el extremo N de la metionina de iniciación consenso y contiene 50 residuos del extremo N que carecen de un péptido señal. Basándose en este último análisis, ADAM20 puede codificar una ADAM no funcional.

Análisis de qPCR de líneas celulares de cáncer de mama

Se evaluó el patrón de expresión de ADAM catalíticamente activos en líneas celulares de eliminación de HER2 con el fin de estrechar la lista de candidatos a convertasa de HER2. Se aisló ARN total de líneas celulares usando el sistema de aislamiento total de ARN RNeasy y ADNsa según las instrucciones del fabricante (Qiagen, Valencia, CA). Se determinó la pureza y concentración del ARN espectrofotométricamente (260 nm/280 nm); se evaluó la integridad del ARN por análisis en Agilent Bioanalyzer. Las relaciones de ARNr fueron > 2,0 para todas las muestras ensayadas en este estudio, que indica ARN intacto de alta calidad. Se realizó PCR en tiempo real basada en fluorescencia esencialmente como se ha descrito (Gibson y col., 1996, Genome Research 6:995-1001). Se diseñaron cebadores y sondas para detectar y discriminar ARNm de 12 genes de la familia de ADAM diferentes: ADAM8, ADAM9, ADAM10, ADAM12, ADAM15, ADAM17, ADAM19, ADAM20, ADAM21, ADAM28, ADAM30 y ADAM33. Se sintetizaron oligonucleótidos por Applied Biosystems (Foster City, CA). Todas las secuencias de los cebadores/sondas se muestran en la Figura 2.

Las secuencias de las sondas se modificaron en el extremo 5' con el colorante indicador 6-FAM y en el extremo 3' con el colorante extintor TAMRA. Las sondas que detectan ARNr 18s humano se modificaron en el extremo 5' con VIC y en el extremo 3' con TAMRA (Applied Biosystems, Foster City, CA). Se generó ADNc de molde usando el kit de RT-PCR Advantage según las instrucciones del fabricante (Clontech, Palo Alto, CA) usando hexámeros aleatorios y 1 µg de ARN total tratado con ADNsal. Se realizó perfilado de la expresión por PCR en tiempo real basada en

Taqman usando 25 ng de cada ADNc según las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, Foster City, CA) monitorizándose la fluorescencia en tiempo real con un ABI Prism 7900 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los niveles de expresión relativa se determinaron esencialmente como se ha descrito (Gibson, 1996) usando curvas patrón para cada transcrito. Los valores de abundancia relativa para cada tipo de célula se corrigieron para la

amplificación del ruido de fondo restando los niveles de abundancia de ARNm obtenidos de reacciones de control realizadas en ausencia de transcriptasa inversa. La normalización entre tipos de células se realizó usando ensayos específicos para ARNr 18s, una especie de ARN de control invariante presente en todas las muestras. Todas las mediciones de expresión se realizaron por triplicado.

El análisis de qPCR demostró que diversas líneas celulares que eliminan Her-2 a diversos niveles expresan ciertas ADAM. Es decir, se evaluó la eliminación de Her-2 usando un ensayo de ELISA para detectar el ECD en medio acondicionado obtenido de diversos cultivos celulares. El nivel relativo de eliminación de Her-2 se indicó por uno a cuatro signos "+", siendo "+" bajos niveles de eliminación y siendo "++++" altos niveles de eliminación (Figura 3). Se determinó la expresión de ADAM 8, 9, 10, 12, 15, 17, 19, 20, 21, 28, 30 y 33 en cada línea celular. Dos de las mayores líneas de eliminación de Her-2, que tienen cuatro signos más ("++++") cada una, BT474 y SKBR3, no expresaron niveles detectables de ADAM28 o ADAM30, eliminándose así estas ADAM como posibles convertasas. Además, estudios previos sugirieron que ADAM17 (TACE) no fue un candidato a convertasa de HER2 (Rio y col., 2002, J. Biol. Chem. 275:10379-103870). Los datos demostraron que ocho de las ADAM catalíticamente activas se expresaron en todas las líneas celulares de eliminación examinadas. Los datos no demostraron una correlación entre el nivel de eliminación de Her-2 y la expresión de cualquier ADAM particular. Sin desear ceñirse a teoría particular alguna, la ausencia de correlación entre ARN y el nivel de eliminación sugiere que la convertasa de HER-2 no es limitante de la velocidad a los niveles de expresión observados en estas líneas celulares.

Silenciamiento específico mediado por ARNip de ADAM

Basándose en los datos del perfilado transcripcional obtenidos usando qPCR, se diseñaron ARNip y produjeron aquella expresión específicamente reducida de ADAM8, 9, 10, 15, 21 y 33. Los ARNip para ADAM17 también se desarrollaron para su uso como controles negativos en experimentos de eliminación. Los ARNips están comercialmente disponibles.

La transfección de ARNip en células se realizó usando Oligofectamine (Elbashir y col., 2001, Nature 411:494-498) y se evaluó el silenciamiento por análisis Western. Brevemente, se sembraron células en placas de múltiples pocillos de manera que la densidad no fuera superior al 50 % de confluencia en el momento de la transfección. Las células se recogieron 48 a 96 horas tras la transfección lavando una vez con PBS y recogiendo en PBS raspando. Se lisaron los sedimentos de células en tampón que contenía HEPES 25 mM, pH 7,5; NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, 5 % de glicerol, 1 % de Triton X-100 y una mezcla de inhibidores de proteinasa (Roche). Después de la incubación sobre hielo durante 30 minutos, el residuo celular se eliminó por centrifugación a 14.000 rpm a 4 °C. La concentración total de proteína se midió usando el método del ácido bicinonínico (Pierce), y cantidades equivalentes de extractos celulares se resolvieron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa.

Las proteínas ADAM se detectaron por inmunotransferencia usando anticuerpos comercialmente disponibles específicos para cada proteína (anti-ADAM9, Ab-1 Oncogene Research; anti-ADAM10, Ab-1 Oncogene Research; anti-ADAM8, RP1 Triple Point Biologics; anti-ADAM15, RP1 Triple Point Biologics; anti-ADAM17, Ab-1 Oncogene Research; anti-ADAM21, Chemicon International; y anti-ADAM33, antisero de conejo policlonal producido internamente contra un péptido inmunizante correspondiente a los aminoácidos 777 a 790). Los filtros se lavaron con PBS-Tween 20 y a continuación se incubaron con el anticuerpo secundario apropiado conjugado con peroxidasa de rábano picante (Pierce), se lavaron de nuevo y los inmunoconjugados se revelaron usando reactivos quimioluminiscentes potenciados (Pierce) y se visualizaron por exposición a película de rayos X. En muchos experimentos, el mismo filtro se trató con reactivo Restore (Pierce) y se volvió a sondear con un anticuerpo anti-ADAM diferente o con anti-gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (RDI) para la normalización de la carga de proteína.

Inicialmente se usaron conjuntos de 4 oligonucleótidos de ARNip contra cada diana ("Smart Pool Technology", Dharmacon). Para los conjuntos de ARNip que redujeron eficazmente la eliminación de Her2 (ADAM10 y ADAM15), se obtuvieron los oligos de ARNip individuales que comprenden cada Smart Pool junto con su información de secuencia correspondiente. Entonces, los ARNip individuales se transfectaron por separado y se evaluó su capacidad para reducir la eliminación de Her-2 como se ha descrito con el fin de identificar los oligonucleótidos de ARNip eficaces. La secuencia de los ARNip que redujo eficazmente la proteína ADAM10 llamada ADAM10-3 es 5'-GGACAACTTAACAACAAT (SEC ID N°: 7) que se corresponde con los nucleótidos 1272 a 1300 (con respecto a ATG) de la secuencia de longitud completa de ADAM10 (SEC ID N°: 5). La secuencia del ARNip de ADAM15 que fue la ADAM15-2 más eficaz es 5'-GCCCAACCCTGGTGTGGTA (SEC ID N°: 8) correspondiente a los nucleótidos 281-299 (con respecto a ATG) de la secuencia de longitud completa de ADAM15.

Se evaluó la eficacia de cada ARNip para inhibir específicamente la expresión de la ADAM para la que se diseñó. Los datos desvelados en el presente documento demuestran que cada ARNip fue específico para su ADAM respectiva e inhibió aquella ADAM, pero no inhibió detectablemente la expresión de otras ADAM (Figuras 4A-4D).

Más específicamente, el ARNip de ADAM10 inhibió ADAM10, pero no afectó el nivel de ADAM9 como se ha determinado usando análisis de transferencia Western (Figura 4A). Similarmente, el ARNip de ADAM9 no afectó detectablemente la expresión de ADAM10, pero inhibió espectacularmente la expresión de ADAM9 (Figura 4B). Además, el ARNip de ADAM15 inhibió específicamente la expresión de ADAM15, pero no inhibió detectablemente la expresión de ADAM17 (Figura 4C y 4D). También se mostró que el ARNip de ADAM17 inhibió la expresión de ADAM17 (Figura 4D).

Además, los datos demostraron que ADAM8 y ADAM21 tuvieron efecto mínimo sobre los niveles de proteína. Además, la proteína ADAM33 no fue detectable en extractos de células BT474 o SKBr3 de control sin tratar y no se investigó adicionalmente.

Por tanto, los datos desvelados en el presente documento demuestran el diseño satisfactorio y la producción de ARNip que inhiben específicamente una ADAM, pero no las otras ADAM cuando se expresan en una célula que elimina Her-2. Además, los ARNips redujeron cada uno el nivel de su ADAM específica aproximadamente el 75 % en comparación con una célula idéntica en ausencia del ARNip.

Inhibición por ARNip de la eliminación de Her-2

A continuación, los diversos ARNips se examinaron para ver qué efecto, si lo hay, de la inhibición de las diversas ADAM tenían sobre la eliminación de Her-2. Para detectar el ECD de Her2 escindido, las células se sembraron en placas de 24 pocillos a aproximadamente el 50 % de confluencia. Después de una incubación durante la noche para permitir la unión de las células, las células se transfectaron con ARNip usando Oligofectamine (Elbashir y col., 2001, Nature 411:494-498). Veinte cuatro horas después, las células se alimentaron de nuevo con medio fresco. Después de una incubación de 24 horas adicional, el medio se eliminó, las células se lavaron una vez con solución salina tamponada con fosfato y se añadió medio fresco a cada pocillo. Después de 48 horas de incubación, el medio acondicionado se recogió, se centrifugó a 5000 rpm durante 5 minutos, y el sobrenadante se retiró para el análisis inmediato por ELISA o se congeló a -20 °C hasta que tal análisis pudo realizarse. La detección del ECD de Her2 se realizó usando un kit de ELISA comercial para c-erbB2/c-neu (Oncogene Research Products, catálogo n° QIA10) según el protocolo del fabricante.

Los datos desvelados en el presente documento demuestran que el ARNip de ADAM10 redujo la eliminación de Her-2 aproximadamente el 50-70 % en tanto células BT474 como SKBr3 (Figuras 5A y 5B, respectivamente). Los ARNip para ADAM8, 9, 17 y 33 no afectaron detectablemente la eliminación de Her-2 en ninguna línea celular (Figuras 5A y 5B). Sin embargo, el ARNip de ADAM15 redujo la eliminación de Her-2 en células BT474 aproximadamente el 10 %. Más sorprendentemente, el mismo ARNip redujo la eliminación de Her-2 aproximadamente el 25-30 % en célula SKBr3, demostrando que los efectos del ARNip de ADAM15 eran dependientes de la célula.

Los datos desvelados en el presente documento demuestran que ADAM10 y ADAM15 median en la eliminación de Her-2 tal que la inhibición de ADAM en una célula produce una disminución detectable en la eliminación de Her-2 por la célula.

Correlación de la inhibición de la convertasa de Her-2 e inhibición de ADAM

Fuente de enzimas for ensayos bioquímicos: Excepto para ADAM17 y MT1-MMP, todas las MMP y ADAM humanas recombinantes se obtuvieron de R&D Systems (Mineápolis, MN). Sus números de catálogo son los siguientes: MMP1 (901-MP), MMP2 (902-MP), MMP3 (513-MP), MMP7 (907-MP), MMP8 (908-MP), MMP9 (911-MP), MMP10 (910-MP), MMP12 (919-MP), MMP13 (511-MM), ADAM9 (939-AD) y ADAM10 (936-AD). MT1-MMP se obtuvo de US Biological (Swampscott, MA) con un número de catálogo de M2429. Se purificó ADAM17 porcina internamente a partir de bazo porcino.

Sustratos para ensayos bioquímicos: Se obtuvo sustrato de péptido fluorogénico (7-metoxicumarin-4-il)acetil-Pro-Leu-Gly-Leu-(3-[2,4-dinitrofenil]-L-2,3-diaminopropionil)-Ala-Arg-NH₂ (SEC ID N°: 46) de R&D Systems (Mineápolis, MN) con un número de catálogo de ES001. Se usó como sustrato para MMP1, MMP2, MMP7, MMP8, MMP9, MMP12, MMP13 y MT1-MMP. Se obtuvo sustrato de péptido fluorogénico (7-metoxicumarin-4-il)acetil-Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nva-Trp-Arg-Lys(2, 4-dinitrofenil)-NH₂ (SEC ID N°: 47) de R&D Systems con un número de catálogo de ES002. Se usó como sustrato para MMP3 y MMP10. Se obtuvo sustrato de péptido fluorogénico (7-metoxicumarin-4-il)-acetil-Pro-Leu-Ala-Gln-Ala-Val-(3-[2,4-dinitrofenil]-L-2,3-diaminopropionil)-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-NH₂ (SEC ID N°: 48) de R&D Systems con un número de catálogo de ES003. Se usó como sustrato para ADAM10 y ADAM17.

Ensayos bioquímicos: En general, se eligieron condiciones de tampón de ensayo basadas en obtener actividades enzimáticas óptimas. Las condiciones de tampón de ensayo específicas se resumen a continuación. Para MMP1, MMP2, MMP3, MMP7 y MMP12, el tampón de ensayo contiene tricina 50 mM, NaCl 10 mM, CaCl₂ 10 mM, ZnCl₂ 1,0 mM, pH 7,4.

Para MMP8 y MMP13, el tampón de ensayo contiene tricina 50 mM, NaCl 10 mM, CaCl₂ 10 mM, ZnCl₂ 1,0 mM, 0,001 % de Brij35, pH 7,4. Para MMP9 y MMP10, el tampón de ensayo contiene Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM,

CaCl₂ 10 mM, 0,001 % de Brij35, pH 7,5. Para MT1-MMP, el tampón de ensayo contiene Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM, CaCl₂ 10 mM, 0,001 % de Brij35, pH 7,5.

Para ADAM9, el tampón de ensayo contiene Tris 25 mM, ZnCl₂ 2,5 uM y ,001 % de Brij35, 01 mg/ml de BSA, pH 9,0. Para ADAM10, el tampón de ensayo contiene Tris 25 mM, ZnCl₂ 2,5 uM y 0,005 % de Brij35, pH 9,0. Para ADAM17, el tampón de ensayo contiene Tris 25 mM, ZnCl₂ 2,5 uM y 0,001 % de Brij35, pH 9,0.

Para activar enzimas MMP, se disuelven 10 ó 20 µg de Pro-MMP liofilizadas en 100 µl de agua. Se añade disolución madre 100 mM de acetato *p*-aminofenilmercúrico (APMA) en DMSO a Pro-MMP dando la concentración final 1,0 mM. Incubar la enzima con APMA a 37 °C durante un periodo tiempo especificado más adelante. Para MMP1, MMP7 y MMP8, el tiempo de incubación es 1 hora. Para MMP10 y MMP13, el tiempo de incubación es 2 horas. Para MMP3 y MMP9, el tiempo de incubación es 24 horas.

En general, se preparó disolución madre 5 mM del compuesto en DMSO. Se realizó dilución sucesiva doble empezando con una concentración específica para dar la placa de compuesto. Se transfirió 1,0 µl de compuesto en DMSO de la placa de compuesto a la placa de ensayo. Se preparó disolución de enzima en tampón de ensayo con una concentración especificada más adelante. Se preparó disolución de sustrato en tampón de ensayo con una concentración de 20 µM. Se añadieron 50 µl de disolución de enzima a la placa de ensayo. La placa de ensayo se incubó durante 5 minutos. A continuación se añadieron 50 µl de disolución de sustrato a la placa de ensayo. La placa se protegió de la luz y la reacción se incubó a temperatura ambiente o 37 °C durante un periodo de tiempo especificado más adelante. La reacción se detuvo añadiendo 10 µl de disolución 500 mM de EDTA. La placa se leyó en un lector de placas con excitación de 320 nm y emisión de 405 nm. El porcentaje de inhibición se calculó para cada concentración y el valor de CI₅₀ se generó a partir del ajuste de la curva.

Condiciones específicas para cada ensayo are as siguiente: concentración de la enzima MMP1 1000 ng/ml, temperatura ambiente, 1 hora de incubación; concentración de la enzima MMP2 200 ng/ml, temperatura ambiente, 1 hora de incubación; concentración de la enzima MMP3 1000 ng/ml, temperatura ambiente 1 hora de incubación; concentración de la enzima MMP7 100 ng/ml, temperatura ambiente, 1 hora de incubación; concentración de la enzima MMP8 500 ng/ml, temperatura ambiente, 2 horas de incubación; concentración de la enzima MMP9 100 ng/ml, temperatura ambiente, 1 hora de incubación; concentración de la enzima MMP10 1000 ng/ml, temperatura ambiente, 2 horas de incubación; concentración de la enzima MMP12 200 ng/ml, temperatura ambiente, 1 hora de incubación; concentración de la enzima MMP13 200 ng/ml, temperatura ambiente, 1,5 horas de incubación; concentración de la enzima MT1-MMP 200 ng/ml, temperatura ambiente, 1 hora de incubación; concentración de la enzima ADAM9 4000 ng/ml, incubada a 37 °C 6 horas; concentración de la enzima ADAM10 700 ng/ml, incubada a 37 °C 6 horas; concentración de la enzima ADAM17 600 ng/ml, incubada a 37 °C 1 hora.

Estudios de correlación entre ensayos de eliminación y bioquímicos

Debido a que la eliminación de Her-2 se produce en la superficie celular, se esperó una buena correlación entre la inhibición de la convertasa de Her-2 basada en células y la inhibición basada en enzimas bioquímicas. Por consiguiente, se ensayaron aproximadamente 500 compuestos contra ADAM10 y ADAM17 (también denominados TACE), además de diez (10) metaloproteinasas de la matriz (MMP), por ejemplo, MMP1, MMP2, MMP3, MMP7, MMP8, MMP9, MMP10, MMP12, MMP13 y MT1-MMP.

Para cada posible convertasa ensayada, se produjo una representación del logaritmo de CI₅₀ que representa la CI₅₀ para la inhibición de la posible convertasa frente a la inhibición de la eliminación de Her-2. Los datos desvelados en el presente documento, mostrados en las Figuras 6-10, demuestran que no hubo correlación entre la inhibición de enzima y la inhibición de la eliminación de Her-2 con respecto a MMP2 (Figura 6), MMP12 (Figura 7), ADAM17 (Figura 8), ADAM9 (Figura 9), demostrando que estas enzimas no fueron posibles convertasas. Los puntos que se encuentran fuera de las líneas paralelas superior e inferior son más de 10 veces divergentes de la curva de correlación ideal (línea central).

Los datos desvelados demuestran una fuerte correlación entre la CI₅₀ de compuestos que inhibieron ADAM10 y la CI₅₀ de los mismos compuestos para la inhibición de la eliminación de Her-2 (Figura 10). Estos datos demuestran que ADAM10 es una convertasa.

En resumen, la expresión de diversas ADAM podría inhibirse selectivamente usando diversos ARNip. Además, en líneas celulares que eliminaron Her-2, ADAM10 y ADAM15 redujeron la eliminación de Her-2. Además, los datos de inhibición bioquímica demostraron que ADAM10 es una convertasa ya que los compuestos que inhiben la eliminación de Her-2 también inhibieron ADAM10 al mismo grado. Estos datos demuestran ampliamente, por primera vez, que ADAM10 media en la escisión de Her-2 para producir ECD y p95 en una célula. Así, ADAM10 es una posible diana terapéutica para el tratamiento de enfermedades, trastornos o afecciones mediadas por la escisión de Her-2 para producir ECD, p95, o ambos.

Identificación de novedosas variantes de corte y empalme de ADAM15

Los datos desvelados en el presente documento demuestran el corte y empalme alternativo en la región codificante de ADAM15 (Figuras 13A, 13B, 14A y 14B). La secuencia publicada de ADAM15 representa una forma más corta que la secuencia desvelada en el presente documento. Se clonaron dos versiones de ADAM15, la primera tuvo un exón adicional (Figuras 13A y 13B) frente a la secuencia publicada previamente conocida y la segunda tuvo dos exones adicionales (Figuras 14A y 14B).

Se usó RT-PCR para demostrar que la versión con un exón adicional (variante 1) es la más abundante en las líneas celulares de eliminación y de no eliminación de HER2. La secuencia de ácidos nucleicos de la variante 1 humana de ADAM15 se representa en la Figura 13A-1 y 13A-2 (SEC ID N°: 1), mientras que la secuencia de aminoácidos de la variante (SEC ID N°: 2) se expone en la Figura 13B. La secuencia de ácidos nucleicos de la variante más larga de la variante 2 humana de ADAM15 se expone en la Figura 14A (SEC ID N°: 3) y la secuencia de aminoácidos de la variante 2 (SEC ID N°: 4) se proporciona en la Figura 14B.

La comparación de los dos exones alternativamente cortados y empalmados con las secuencias genómicas de rata y de ratón indicaron que los exones se conservan a través de especies. Las formas de corte y empalme alternativas alteran la cola citoplásmica de ADAM15. Las secuencias codificadas por los exones alternativamente cortados y empalmados contienen dominios ricos en prolina con múltiples secuencias de unión al dominio de homología 3 a Src consenso (SH3) (Mayer y Eck, 1995, Current Biology 5:364-367). Estas secuencias alternativamente cortadas y empalmadas proporcionan sitios para las interacciones proteína-proteína entre ADAM15 y las proteínas que contienen el dominio SH3. De hecho, una reciente descripción de variantes de corte y empalme similares en ratón (Shimizu y col., 2003, Biochem. Biophys. Res. Commun. 309: 779-785) indica que las secuencias alternativamente cortadas y empalmadas alteran la afinidad de unión de ADAM15 murina para proteínas de la familia Src Lck y Src. Sin desear ceñirse a teoría particular alguna, las diversas variantes de corte y empalme novedosas de ADAM15 pueden relacionarse con la escisión de Her-2 y proporcionar posibles dianas para el desarrollo de terapéuticos útiles relacionados con la inhibición de la escisión de Her-2. Esto es especialmente cierto cuando una de las variantes, la variante 1 humana de ADAM15, parece estar correlacionada con la eliminación de Her-2.

Ejemplo 2: Efecto antitumoral sinérgico entre MPI y un anticuerpo antagonista de Her-2

Los datos desvelados en el presente documento demuestran la inhibición satisfactoria del crecimiento de células tumorales usando inhibidores recientemente identificados, por ejemplo, MPI, del procesamiento enzimático de Her-2 (p185). Estos inhibidores pueden ser posibles terapéuticos para el desarrollo de terapia para cánceres que expresan en exceso Her-2 y/o que eliminan ECD. Brevemente, se estudiaron líneas celulares en las que Herceptin™ induce la detención de la detención del crecimiento de células malignas. La inhibición del procesamiento del receptor de Her-2 por inhibidores de metaloproteasa solos, o en combinación con concentraciones inferiores a la óptima de Herceptin™, puede detener el crecimiento y afectar la susceptibilidad a la apoptosis en células de la línea celular de cáncer de mama que expresa en exceso Her-2. Además, los datos desvelados en el presente documento demuestran la sorprendente sinergia de Herceptin™ y MPI en la detención del crecimiento celular de células malignas que expresan en exceso Her-2.

Los materiales y métodos se describen a continuación.

Células, compuestos, fármacos y otros reactivos

Se obtuvieron líneas celulares de cáncer de mama humano BT-474 (n° HTB-20), SKBR-3 (n° HTB-30) y MCF-7 (n° HTB-22) de la Colección Americana de Cultivos de Tejido Tipo (ATCC, Manassas, VA). Las células se mantuvieron rutinariamente en los medios recomendados por la ATCC con ligeras modificaciones. Las células se mantuvieron a 37 °C en una estufa de incubación humidificada suministrada con 5 % de CO₂. Las células BT-474 se cultivaron en RPMI 1640 (Invitrogen) complementado con 10 % de suero bovino fetal (FBS), 0,01 mg/ml de insulina bovina, HEPES 10 mM y aminoácidos no esenciales 0,1 mM. Las células SKBR-3 se cultivaron en McCoy's 5a (Invitrogen) complementado con 10 % de FBS. Las células MCF-7 se mantuvieron en medio esencial mínimo de Eagle (ATCC) complementado con 10 % de FBS y 0,01 mg/ml de insulina bovina. Tanto las células BT-474 como SKBR-3 expresan en exceso Her-2 sobre la superficie y tienen alto nivel de escisión de Her-2, pero las células MCF-7 no expresan en exceso Her-2. Se compraron Herceptin™, Paclitaxel™ (Taxol™) y Cisplatino™ de Hanna Pharmaceuticals (Wilmington, DE). Herceptin™ se preparó como una disolución madre (1 mg/ml) en agua estéril una vez cada cuatro semanas para mantener su actividad.

Los compuestos (MPI) usados en los siguientes experimentos incluyeron el compuesto 5 ((6S,7S)-N-hidroxi-5-metil-6-[[4-(2-metil-4-nitrofenil)piperazin-1-il]carbonil]-5-azaespiro[2.5]octano-7-carboxamida), el compuesto 6 ((6S,7S)-N-hidroxi-5-metil-6-[[4-[5-(trifluorometil)piridin-2-il]piperazin-1-il]carbonil]-5-azaespiro[2.5]octano-7-carboxamida), el compuesto 8 ((1S,2S)-2-((4-(4-fluorofenil)piperazin-1-il)carbonil)-N-hidroxiclohexanocarboxamida), el compuesto 4 ((3R)-N-hidroxi-2-((4-metoxifenil)sulfonil)-1,2,3,4-tetrahidroisoquinoline-3-carboxamida) y el compuesto 7 (Prinomastat), cada uno de los cuales puede obtenerse comercialmente, prepararse según la bibliografía, o prepararse según los métodos descritos en el documento de EE.UU. n° de serie 60/543.501, cuya divulgación se

incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. Todos los compuestos usados en estos estudios se prepararon rutinariamente como disoluciones madre 5 mM en 100 % de DMSO (Sigma).

Se obtuvieron especímenes de tumor por Oncotech (Tustin, CA) según su protocolo autorizado por la IRB usando procedimientos convencionales conocidos en la técnica. Los cultivos celulares se mantuvieron en matraces de cultivo de tejido. Las células previstas para el tratamiento experimental se recogieron en fase logarítmica con EDTA y se sembraron a una densidad de 1×10^5 células/pocillo en placas de poliestireno de 24 pocillos en 0,5 ml de RPMI con 10 % de FCS. Los experimentos para determinar los efectos de MPI sobre el receptor de Her-2 eliminado se realizaron como se describe más adelante para las células BT-474.

Ensayos de proliferación celular

Se realizaron rutinariamente ensayos de proliferación con dos protocolos: recuento de células y ensayo de incorporación de BrdU. Para el recuento de células, se sembraron células (1×10^5) en cada pocillo de placas de 12 pocillos y se cultivaron durante la noche. Entonces, células se trataron durante 6 días con fármacos y compuestos como se indica en experimentos individuales. Los medios de cultivo se sustituyeron con medios nuevos que contenían las mismas concentraciones de fármacos y compuestos después de los 3 primeros días de tratamiento. Se contaron las células viables con hemocitómetros inmediatamente después de la tinción con azul de tripano.

El ensayo de incorporación de BrdU se realizó usando un kit de ELISA de proliferación celular colorimétrica por instrucciones del fabricante (n° 1647229, Roche Molecular Biochemicals), midiendo la síntesis de ADN en células proliferantes. Brevemente, se sembraron células ($5-10 \times 10^3$) en cada pocillo de placas de 96 pocillos y se cultivaron durante la noche. Al día siguiente, los medios de cultivo se sustituyeron con medios nuevos que contenían fármacos y compuestos como se indica para los experimentos individuales. Después de 2-6 días de tratamiento, se añadió disolución de marcado BrdU 10 μ M (concentración final) al medio y las células se incubaron durante 4-5 horas adicionales a 37 °C. Se retiró el medio de marcado y se añadió 200 μ l/pocillo de FixDenat a las células y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. La disolución FixDenat se eliminó minuciosamente, y se añadió 100 μ l/pocillo de disolución de trabajo de conjugado de anticuerpo anti-BrdU-POD y se incubó durante 90 minutos a temperatura ambiente. Entonces, el conjugado de anticuerpo se eliminó y las células se aclararon tres veces con 200 μ l/pocillo de disolución de lavado. Finalmente, se añadieron 100 μ l/pocillo de disolución de sustrato y los resultados se obtuvieron usando un lector de microplacas (Spectra Max PLUS, Molecular Devices) durante el revelado del color. Se obtuvieron múltiples lecturas en diversos momentos de tiempo y se obtuvieron resultados en el intervalo lineal del ensayo. Los datos desvelados en el presente documento representan números promedio y se presentan desviaciones estándar de experimentos duplicados representativos. Se incluyeron controles apropiados para los ensayos.

Ensayos de apoptosis

Se realizaron ensayos de apoptosis con un kit de ELISA^{PLUS} de detección de muerte celular (cat. n° 1774425, Roche Molecular Biochemicals) que medía la fragmentación de ADN en células apoptóticas. Brevemente, se sembraron células (1×10^4) en cada pocillo de placas de 96 pocillos y se cultivaron durante la noche. Al día siguiente, los medios de cultivo se sustituyeron con medios nuevos que contenían fármacos y compuestos como se indica en experimentos individuales. Después de 3 días de tratamiento, las células se centrifugaron a 200 x g durante 10 minutos y el sobrenadante se eliminó cuidadosamente. El sedimento de células se resuspendió en 200 μ l de tampón de lisis y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. El lisado se centrifugó a 200 x g durante 10 minutos. Se transfirieron 20 μ l del sobrenadante a otra microplaca. Se añadieron 80 μ l del inmunoreactivo apropiado a cada pocillo. La microplaca se cubrió con una lámina protectora adhesiva y se agitó suavemente durante aproximadamente 2 horas a temperatura ambiente. La disolución se eliminó y la placa se aclaró 3 veces con 250 μ l/pocillo de tampón de incubación. Finalmente, se añadieron 100 μ l/pocillo de disolución de ABTS y los resultados se leyeron con un lector de microplacas Spectra Max PLUS (Molecular Devices) durante el revelado del color. Se obtuvieron múltiples lecturas en diversos momentos de tiempo y se obtuvieron resultados en el intervalo lineal del ensayo. Se presentan números promedio y desviaciones estándar de experimentos duplicados representativos. Se incluyeron controles apropiados en los ensayos.

ELISA de Her-2

Se sembraron células BT474 en 100 μ l de medio RPMI que contenía 10 % de FCS + 10 μ g/ml de insulina en placas de 96 pocillos a 2×10^4 células/pocillo. Las células se incubaron durante la noche a 37 °C. A la mañana siguiente, se eliminó el medio y se añadieron de nuevo 100 μ l de medio nuevo con o sin compuesto. Las células se incubaron durante aproximadamente 72 horas a 37 °C. Después de aproximadamente 72 horas, los sobrenadantes se eliminaron. Las muestras se diluyeron 1:10 y se analizaron usando un kit de ELISA de Her-2 comercialmente disponible por instrucciones del fabricante (Oncogene Research, catálogo n° QIA10).

Transferencia Western

Se sembraron células BT474 en 1 ml de medio RPMI que contenía 10 % de FCS + 10 μ g/ml de insulina en placas de

12 pocillos a 1×10^5 células/pocillo. Las células se incubaron durante la noche a 37 °C. A la mañana siguiente, se eliminó el medio y se añadió de nuevo 1 ml de medio RPMI sin suero nuevo +/- compuesto. Las células se incubaron durante 5 días a 37 °C. Después de 5 días, los sobrenadantes se eliminaron. Se añadieron 15 µl de sobrenadante a 15 µl de tampón de muestra (Novex, catálogo nº LC2676) y las muestras se cargaron sobre un gel en gradiente de Tris-Glicina al 4-12 % (Novex, EC6035). Las muestras se separaron durante 2 horas a 125 voltios. A continuación, los geles se transfirieron sobre membrana de PVDF (NEN, catálogo nº NEF-100) a 30 voltios durante la noche en frío. A la mañana siguiente, las transferencias se bloquearon en 5 % de leche/PBS/0,05 % de Tween-20 durante 1 hora a temperatura ambiente. Se diluyó anticuerpo para Her-2 (NeoMarkers, catálogo nº MS-1350-P1) 1:200 en 5 % de leche/PBS/0,05 % de Tween-20 y se incubó con las transferencias durante 2 horas a temperatura ambiente. Las transferencias se lavaron 5 veces (10 minutos cada lavado) en PBS/0,05 % de Tween-20. Se diluyó un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con HRP 1:2000 y se añadió a las transferencias durante 1 hora a temperatura ambiente. Las transferencias se lavaron 5 veces (10 minutos cada lavado) en PBS/0,05 % de Tween-20. A continuación, las transferencias se incubaron durante 5 minutos con sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Pico (Pierce, catálogo nº 34080) y se expusieron a la película.

En experimentos para determinar los efectos del tratamiento de MPI sobre la señalización de células, células BT474 se sembraron a 1×10^5 células/ml en 2 ml de medio (RPMI + 10 % de FCS + 10 µg/ml de insulina) en placas de 12 pocillos. A la mañana siguiente, el medio se sustituyó y las células se trataron con MPI o Herceptin durante 5 días, cambiando el medio y sustituyendo el MPI en el día 3. Después de 5 días, las células se recogieron, se lisaron en 200 µl de tampón de lisis frío en hielo que contenía Tris 10 mM, pH 7,2, NaCl 150 mM, 1 % de Triton X-100, 1 % de ácido desoxicólico, 0,1 % de SDS, 50 µg/ml de leupeptina, 50 µg/ml de aprotinina, vanadato de sodio 1 mM, fluoruro de sodio 50 mM, PMSF 1 mM. Después de 10 minutos sobre hielo, las muestras se centrifugaron en microcentrífuga a 13.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C y se recogieron los sobrenadantes. Para el análisis, se añadieron 15 µl de 2X tampón de muestra Laemmli (BioRad, cat nº 161-0737) a 15 µl de extracto, las muestras se hirvieron durante 5 minutos y se cargaron sobre geles de Tris-Glicina al 12 % de 12 pocillos (Novex, cat nº EC60052). Los geles migraron en 1X tampón Tris-Glicina-SDS (Gibco BRL) usando el aparato de minigel Novex durante aproximadamente 1,5 horas. Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron sobre membrana de PVDF (NEN, cat nº NEF1000) en 1X tampón Tris-Glicina (Biorad, cat nº 161-0734) que contenía 20 % de MeOH durante 2-3 horas usando el sistema de transferencia BioRad miniblót. Después de la transferencia, las membranas se bloquearon en PBS + 5 % de leche + 0,1 % de Tween-20 durante 1 h a TA. Se añadió anticuerpo primario (anti-pERK, 1:1000, NEB, cat nº 9101 o anti-fosfo-AKT, 1:1000, NEB, cat nº 9271) en 15 ml de PBS + 5 % de leche + 0,1 % de Tween-20 y se incubó durante la noche en frío. Las transferencias se lavaron 3X, 15 minutos cada una en PBS + 0,1 % de Tween-20. Se diluyó anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (de cabra anti-IgG de conejo, 1:2000, NEB, cat nº 7074) en 15 ml de PBS + 5 % de leche + 0,1 % de Tween-20 y se incubó con la transferencia durante 1 hora a TA. Las transferencias se lavaron 3X, 15 minutos cada una en PBS + 0,1 % de Tween-20. Se añadió reactivo de detección quimioluminiscente (Pierce, cat nº 34080) a la transferencia y se incubó 5 minutos a TA antes de exponer a la película.

Identificación de los inhibidores de convertasa de Her-2

Se probaron una serie de inhibidores de metaloproteasa basados en ácido hidroxámico (MPI), que incluyen, pero no se limitan a, TAPI, compuesto 5, compuesto 6, compuesto 8, compuesto 4 y compuesto 7. Estos inhibidores se añadieron, a concentraciones variables, a los cultivos de células BT474, una línea celular de cáncer de mama que expresa en exceso Her-2 conocida por procesar enzimáticamente Her-2 de la superficie celular (p185) y liberar el dominio extracelular (ECD) en el sobrenadante de cultivo, es decir, la eliminación de ECD. Después de 72 horas, se recogieron los sobrenadantes de cultivo celular y se ensayaron para el contenido de ECD de Her-2 usando un ensayo de ELISA.

Los MPI probados variaron ampliamente en eficacia, de casi sin inhibición a 10 µM a aproximadamente el 50 % de inhibición del procesamiento de ECD a 10-50 nM. Los resultados obtenidos usando un compuesto representativo se representan en la Figura 15. Los resultados de ELISA se confirmaron por transferencia Western. La transferencia Western de sobrenadantes de cultivo identificó la presencia de una proteína de aproximadamente 105 kDa, el tamaño del ECD de Her-2, que es reconocida por un anticuerpo monoclonal reactivo anti-ECD de Her-2. La presencia de esta banda se reduce o abole por aquellos MPI que puntúan como inhibidores eficaces en el ELISA de ECD de Her-2 (Figura 16). Los MPI que inhibieron detectablemente la escisión de Her-2 para producir un nivel de ECD, que fue inferior al nivel de ECD producido en ausencia del inhibidor, se llaman inhibidores activos de "convertasa" porque inhiben la eliminación del ECD tras la escisión de Her-2 (p185). El compuesto también fue eficaz en bloquear el procesamiento de ECD en una célula de tumor de mama primario que expresa en exceso Her-2 (Figura 17).

Para examinar las consecuencias biológicas del procesamiento de Her-2, se añadieron concentraciones variables de un inhibidor de convertasa de Her-2 activo (compuesto 5), o uno estructuralmente relacionado, pero inactivo (compuesto 6), a cultivos de células BT474. En algunos casos, estos cultivos también se complementaron con concentraciones variables de Herceptin™. Después de variar los periodos de cultivo celular (2-6 días), los cultivos celulares se recogieron y se evaluó el crecimiento celular por recuento de células e incorporación de BRdU usando protocolos convencionales.

Como se demuestra por los datos desvelados en el presente documento, a concentraciones inferiores a 5 μM , MPI solo no afectó detectablemente el crecimiento de la línea celular de cáncer. A mayores concentraciones de cada compuesto, se detectaron efectos no específicos que probablemente reflejan toxicidad química.

- 5 La administración de Herceptin™ a las células condujo a la inhibición del crecimiento de un modo dependiente de la concentración, con un efecto máximo de aproximadamente el 50 % de la inhibición a concentraciones superiores a 1 $\mu\text{g/ml}$. A 0,2 $\mu\text{g/ml}$, Herceptin™ no tuvo efecto significativo sobre el crecimiento de células BT474.

- 10 Sorprendentemente, la combinación de dosis inferiores a las óptimas de Herceptin™ y un inhibidor de la convertasa de Her-2 activo, pero no el inhibidor de la convertasa de Her-2 estructuralmente relacionado, pero inactivo, redujo el crecimiento de células BT474 más eficazmente que las concentraciones óptimas de Herceptin™ solo o el inhibidor de convertasa solo (Figuras 18 y 19). Este patrón sinérgico también se observó con SKBR3, otra línea celular de cáncer de mama que expresa en exceso Her-2 que elimina ECD de Her-2.

- 15 A diferencia, el crecimiento de la línea celular de cáncer de mama MCF7, que expresa niveles basales de Her-2 y no elimina ECD *in vitro*, no se afectó significativamente por Herceptin™, el inhibidor de la convertasa de Her-2 activo, o la combinación del anticuerpo Herceptin™ y el inhibidor de la convertasa activo (Figuras 18 y 19). Estos resultados demuestran que la inhibición mediada por MPI de la eliminación de ECD de Her-2 puede sinergizar con concentraciones inferiores a la óptima de Herceptin™ para inducir la detención del crecimiento de células de la línea celular de cáncer de mama que expresa en exceso Her-2. Además, los datos desvelados en el presente documento demuestran que el efecto sinérgico está mediado por, o está asociado a, la inhibición del procesamiento de Her-2 de longitud completa (p185) en un dominio ECD que puede eliminarse y una porción de cinasa constitutivamente activa asociada a célula (p95) ya que, a diferencia de las células que expresan en exceso p185 y eliminan ECD, las células que no expresan en exceso Her-2 o eliminan ECD no son inhibidas en el crecimiento por el tratamiento con Herceptin™ y/o un MPI activo de convertasa.

- 25 En un estudio separado, se mostró que un inhibidor de convertasa de amplia especificidad (compuesto 7) potenciaba sinérgicamente la actividad antiproliferativa de dosis inferiores a las óptimas de Herceptin™ en células BT474 que expresan en exceso Her-2. El potenciamiento sinérgico del efecto antiproliferativo se detectó cuando las células se trataron con dosis inferiores a las óptimas de Herceptin™ que oscilaban de 0,067 a 5 $\mu\text{g/ml}$ y una dosis eficaz (1 μM) del compuesto 7 (Figura 22).

Estudios de señalización en la dirección 3' de Her-2

- 35 Se ha mostrado por estudios previos que la expresión en exceso de Her-2 conduce a la fosforilación y activación de las rutas de transducción de señales de MAP cinasa y AKT, y que este evento es crítico para la proliferación y supervivencia celular. Además, se ha mostrado que el tratamiento de células cancerosas usando concentraciones óptimas de Herceptin™ bloquea la activación de ambas rutas, produciendo supuestamente la detención del crecimiento observada. Como el inhibidor de convertasa en combinación con bajas dosis de Herceptin™ condujo a la inhibición del crecimiento de células que expresan en exceso Her-2 a un nivel sorprendente que indica sinergia, se examinó el efecto de este tratamiento sobre las rutas de señalización de MAP cinasa y AKT.

- 45 Se monitorizó la fosforilación de AKT y la MAP cinasa ERK por análisis de transferencia Western usando anticuerpos específicos de fosfo. Se trataron cultivos de células BT474 durante 6 días con concentraciones variables del inhibidor de convertasa solo o en combinación con Herceptin™. Similar a los resultados observados sobre el crecimiento celular, el tratamiento de células BT474 con 0,2 $\mu\text{g/ml}$ de Herceptin™ en combinación con el inhibidor de convertasa (compuesto 4) condujo a una reducción detectable en la fosforilación de tanto AKT como ERK. El tratamiento de células con tanto el inhibidor de convertasa a concentraciones inferiores a 5 μM como 0,2 $\mu\text{g/ml}$ de Herceptin™ solo no demostró un efecto detectable sobre la fosforilación de AKT o ERK (Figura 20). Además, estas rutas no fueron alteradas en las células MCF7 que no expresan en exceso Her-2 tras el tratamiento con Herceptin™, el inhibidor de convertasa o la combinación sinérgica de estos compuestos.

- 50 Sin desear ceñirse a teoría particular alguna, los datos desvelados en el presente documento demuestran que la sinergia observada con Herceptin™ y el inhibidor de convertasa sobre el crecimiento celular tiene una base bioquímica, evidentemente resultante, al menos en parte, de la inhibición de la(s) ruta(s) de AKT y/o MAP cinasa.

- 55 De acuerdo con informes publicados, las cantidades de saturación de Herceptin previenen la escisión de Her-2 *in vitro* (Figura 21). Sin embargo, a dosis inferiores a las óptimas de Herceptin, esto no se produce. El MPI junto con bajas dosis de Herceptin son al menos aditivos en prevenir la escisión de Her-2. Esto se produce a las mismas dosis cuando se observan efectos sinérgicos de Herceptin y MPI sobre el crecimiento celular.

- 60 Los estudios desvelados en el presente documento demuestran, por primera vez, que un inhibidor de la convertasa de Her-2 potencia los efectos de Herceptin™ en bloquear el crecimiento de líneas celulares de mama que expresan en exceso Her-2 *in vitro*, y parece que inhibe la(s) ruta(s) de AKT y/o MAP cinasa. Estos datos demuestran que un inhibidor del procesamiento de Her-2 puede ser un agente terapéutico útil en pacientes con cáncer de mama que expresan en exceso Her-2 como parte de una pauta de tratamiento con múltiples fármacos, tratamiento que puede

incluir Herceptin™.

Combinaciones de inhibidores de convertasa y Herceptin™ potencian la actividad antitumoral de agentes quimioterapéuticos en células de cáncer de mama que expresan en exceso Her-2

Para explorar adicionalmente las posibles aplicaciones clínicas del sinergismo desvelado en el presente documento entre inhibidores de convertasa y Herceptin™, se evaluó la actividad antitumoral de agentes quimioterapéuticos estándar (por ejemplo, Taxol™ y Cisplatin™) en combinación con inhibidores de convertasa (por ejemplo, compuesto 7) y Herceptin™ en las líneas celulares de cáncer de mama las células BT474, SKBR3 y MCF7. Los resultados muestran que las combinaciones del compuesto 7 y Herceptin™ potencian significativamente la actividad antitumoral de Taxol™ y Cisplatin™ en células BT474 y SKBR3 que expresan en exceso Her-2, pero no en células MCF7 que no expresan en exceso Her-2 (Figuras 23 y 24).

Sin desear ceñirse a teoría particular alguna, los resultados sugieren que la potenciada actividad antitumoral sinérgica por combinaciones de Herceptin™ e inhibidores de convertasa (por ejemplo, compuesto 7) está mediada por un efecto específico (por ejemplo, inhibición de la escisión de Her-2) sobre Her-2 por el inhibidor de convertasa en células que expresan en exceso Her-2. Los resultados demuestran adicionalmente que combinaciones triples de agente(s) citotóxico(s) (por ejemplo, Taxol™ o Cisplatin™), Herceptin™ e inhibidores de convertasa (por ejemplo, el compuesto 7) tienen actividad antitumoral superior en comparación con cualquier agente usado individualmente, o combinaciones de dos cualesquiera de los tres agentes.

Se ha informado previamente que los agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, Taxol™ y Cisplatin™) pueden inducir muerte celular programada o apoptosis en células de cáncer de mama. Por consiguiente, se realizaron estudios para determinar si la sinergia entre inhibidor(es) de convertasa y Herceptin™ podría afectar la apoptosis inducida por Taxol™ o Cisplatin™ en células de cáncer de mama. Sorprendentemente, las combinaciones del inhibidor de convertasa el compuesto 7 y Herceptin™ potenciaron sinérgicamente la apoptosis inducida por Taxol™ o Cisplatin™ en células BT474 y SKBR3 que expresan en exceso Her-2, pero no en células MCF7 que no expresan en exceso Her-2.

Estos resultados indican que la potenciada apoptosis inducida por combinaciones de un agente citotóxico (por ejemplo, Taxol™), un anticuerpo antagonista (por ejemplo, Herceptin™) y un inhibidor de convertasa (por ejemplo, el compuesto 7) está mediada por un efecto específico (por ejemplo, inhibición de la escisión de Her-2) sobre Her-2 por el inhibidor de convertasa en células que expresan en exceso Her-2. Los resultados demuestran adicionalmente que combinaciones triples de agente(s) citotóxico(s) (por ejemplo, Taxol™ o Cisplatin™), anticuerpo antagonista (ejemplificado por Herceptin™) y un inhibidor de convertasa (por ejemplo, el compuesto 7) inducen el mayor nivel de apoptosis con respecto a cualquier agente individual de los tres o combinaciones de dos cualesquiera de los tres agentes. Posiblemente, este efecto sinérgico combinado de los tres agentes sobre la inducción de apoptosis puede contribuir parcialmente a actividad antitumoral potenciada global.

Ejemplo 3: Efecto sinérgico de MPI e inhibidores de miembros de la familia de tirosina cinasa de EGFR

Los datos desvelados en el presente documento demuestran, por primera vez, que combinaciones de inhibidores de convertasa y Herceptin™ potencian la actividad antiproliferativa de Iressa™ (un inhibidor selectivo de cinasa de EGFR1) en células de cáncer de mama que expresan en exceso Her-2.

Desde un punto de vista de la genética, el cáncer es un tipo de enfermedad resultante de acciones anormales y complicadas de múltiples genes (o sus proteínas codificadas) que desempeñan funciones importantes en la formación, progresión y mantenimiento de la enfermedad (Ponder, 2001, Nature 411:336-341). Aquellos genes se clasifican comúnmente en, pero no se limitan a, proto-oncogenes, oncogenes y genes supresores de tumores. Las acciones de los genes o sus proteínas codificadas incluyen, pero no se limitan a, alteraciones de sus códigos genéticos o en el nivel de su expresión y/o actividad en células cancerosas. Muchas tirosina cinasas de receptor (por ejemplo, cinasas de la familia EGFR) pertenecen a la clase de proto-oncogenes (Blume-Jensen. y col., 2001, Nature 411:355-365). Cuando se mutan o activan solos o con otros genes relacionados con el cáncer, pueden producir la transformación de células normales en células cancerosas. Las alteraciones y activación de estos genes causantes del cáncer se detectan frecuentemente en líneas celulares y tejidos primarios aislados de pacientes con cáncer. Por consiguiente, estos tipos de genes son frecuentemente elegidos como diana para la prevención e intervención del cáncer. Sin embargo, hasta la fecha no se ha conseguido la eficaz terapia del cáncer basada en el control de genes del cáncer, y sigue existiendo una gran necesidad sin satisfacer de tales terapias. Además, hay una necesidad que se sentía desde hace tiempo de herramientas para el desarrollo de tales terapias.

Para explorar la posible utilidad de sinergia detectada entre inhibidores de convertasa y Herceptin™, se realizaron estudios para determinar si combinaciones de inhibidores de convertasa y Herceptin™ podrían potenciar la actividad antiproliferativa de Iressa™, un inhibidor de cinasas de molécula pequeña sintético selectivamente activo contra el receptor 1 de EGF. Iressa™, desarrollado por AstraZeneca, ha demostrado actividad antitumoral contra una variedad de células cancerosas que incluyen, pero no se limitan a, células de cáncer de mama. Iressa™ actúa antagonizando el crecimiento de células cancerosas inhibiendo la señalización y mitogénesis mediada por EGFR1.

Recientemente, Iressa™ fue autorizado para el tratamiento de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas en Japón, Australia y los Estados Unidos.

Los resultados del ensayo de proliferación (Figura 26) demuestran que las combinaciones de inhibidor de convertasa (por ejemplo, el compuesto 7) y Herceptin™ potenciaron sinérgicamente la actividad antiproliferativa de Iressa™ en células BT474 de cáncer de mama que expresan en exceso Her-2, pero no en células MCF7 que no expresan en exceso Her-2. El resultado presenta una estrategia terapéutica diferente a la que combina agente(s) citotóxico(s) (por ejemplo, Taxol y Cisplatin), Herceptin™ e inhibidor(es) de convertasa.

Los datos desvelados en el presente documento demuestran que en un tumor que expresa en exceso Her-2, la combinación de inhibidores de convertasa (por ejemplo, el compuesto 7), un anticuerpo antagonista de Her-2 (por ejemplo, Herceptin™) y un tercer agente terapéutico (citotóxico o citostático, basado en gen/diana de proteína, que incluye, pero no se limitan a, Iressa™), que por sí mismo también posee al menos actividad antitumoral detectable, se logró mayor actividad antitumoral sinérgica.

Ejemplo 4

Actividad in vivo de MPI

Este ejemplo describe estudios *in vivo* llevados a cabo con inhibidores selectivos de la eliminación de Her-2 que incluyen el compuesto 1 ((6S,7S)-7-[(hidroxiamino)carbonil]-6-[(4-fenil-3,6-dihidropiridin-1(2H)-il)carbonil]-5-azaespiro[2.5]octano-5-carboxilato de metilo) y el compuesto 2 ((6S,7S)-7-[(hidroxiamino)carbonil]-6-[(4-fenilpiperazin-1-il)carbonil]-5-azaespiro[2.5]octano-5-carboxilato de metilo), en un modelo de xenoinjerto de cáncer de mama con una línea celular que expresa en exceso Her-2. Estos resultados, que indican una fuerte correlación entre la inhibición de la eliminación de Her-2 y la actividad antitumoral, soportan que la inhibición de la eliminación de Her-2 ofrece un novedoso enfoque al tratamiento de cánceres que expresan en exceso Her-2. El término "selectivo" indica que los compuestos probados fueron inhibidores más eficaces de uno o más miembros de la familia ADAM de metaloproteasas que de miembros de las metaloproteasas de la matriz (MMP).

Los inhibidores de convertasa probados a continuación pueden prepararse por cualquiera de numerosos métodos conocidos en la técnica y se describen en el documento de EE.UU. n° de serie 60/534.501, cuya divulgación se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

Estudios de xenoinjerto

Para el modelo de tumor BT-474-SC1 (véase *Resultados* más adelante), pellas de estrógeno de liberación lenta (Innovative Research of America) se insertaron subcutáneamente (s.c.) en el flanco de cada ratón 24 horas antes de la inoculación de células tumorales. Se obtuvieron ratones desnudos Balb/C y SCID-bg de Charles River Laboratories. Las células se recogieron de sus placas de cultivo de tejido, se contaron, se centrifugaron y se resuspendieron en medio de crecimiento sin suero y BD Matrigel™ a una relación 1:1 inmediatamente antes de la implantación. En o bien una o bien dos localizaciones, 1-2x10⁷ células BT-474-SC1 viables se inyectaron s.c. en el flanco superior de cada ratón. Para todos los modelos, los tumores se midieron semanalmente y se calcularon sus volúmenes usando la fórmula [volumen = (longitud x anchura²) ÷ 2]. Una vez el volumen medio del tumor del número requerido de ratones alcanzó el tamaño deseado (normalmente > 150 mm³), se aleatorizaron en grupos de tratamiento que normalmente contenían entre 6 y 12 ratones. A continuación, los animales se trataron con compuesto o vehículo (10 % de DMAC, 30 % de propilenglicol) por bomba mini-osmótica (Alzet, Cupertino, CA) implantada i.p. o s.c. durante 7 a 28 días para lograr la exposición del compuesto deseado - controlado alterando la velocidad de flujo de la bomba y/o la concentración de compuesto dentro de las bombas. Se monitorizaron semanalmente el tamaño del tumor y los pesos corporales (una medida de la salud del animal). También se extrajeron muestras de sangre (retro-orbitales) mientras que las bombas osmóticas fueron funcionales y el plasma se separó por centrifugación y se guardó a -80 °C para los posteriores análisis farmacocinéticos y/o de ELISA, para determinar los niveles de ECD de Her-2 circulante (descritos anteriormente). Obsérvese que en experimentos diseñados para evaluar los efectos del tratamiento del compuesto sobre niveles de ECD de Her-2 circulante, se extrajeron muestras de sangre en el día en el que se implantaron las bombas osmóticas (día 0) y a continuación de nuevo seis días después (día 6).

Medición de niveles de ECD en plasma

Para medir los niveles de ECD de Her-2 circulante en ratones, se aislaron plasmas de las muestras de sangre descrita anteriormente y se analizaron brevemente después de recogerse o se guardaron congeladas a -80 °C hasta el análisis. Para evaluar los niveles de ECD de Her-2, se diluyeron muestras de plasma 1:5 y se analizaron usando un kit de ELISA de Her-2 comercialmente disponible por instrucciones del fabricante (Oncogene Research, catálogo n° QIA10).

Inmunohistoquímica y transferencia Western

Para los análisis Western/ de inmunotransferencia, muestras tumorales congeladas rápidamente se pulverizaron y se lisaron en tampón RIPA estándar usando un homogeneizador Dounce y/o una máquina Polytron. Las muestras se incubaron sobre hielo durante 15 minutos y se centrifugaron a 10.000 x g durante 15 min en una sala fría. Se retiraron los sobrenadantes, se determinaron las concentraciones de proteína y 20 microgramos de proteína se sometieron a procedimientos de inmunotransferencia patrón (descritos anteriormente). Los anticuerpos primarios usados se compraron de Cell Signaling Technologies (Beverly, MA). Se usaron anticuerpos para ERK1/2 total (n° 9102) y fosforilado (n° 9102) a una dilución 1:1000 ya que fueron anticuerpos para Akt/PKB total (n° 9272) y fosforilado (n° 9271). Para IHC, los tejidos se deshidrataron mediante una serie de alcoholes y 100 % de xileno (Poly Scientific), en un procesador modelo Thermo-Shandon Excelsior. Posteriormente, los tejidos se colocaron en moldes base (Tissue-Tek) y se incorporaron en cera de parafina con la ayuda de un Histocentre2 (Thermo-Shandon, Pittsburgh, PA). Se enfrentaron los bloques y se cortaron secciones de 5 µM con un microtomo convencional (por ejemplo, Leica RM2155), se flotaron en un baño de agua caliente y se adhirieron a microportaobjetos previamente limpios (Superfrost, VWR, West Chester, PA). Antes de la tinción, los portaobjetos se calentaron a 55-60 °C durante 1 hora, y a continuación se enfriaron a temperatura ambiente. Se desparafinaron por tres pases de 5 minutos cada uno a través de xileno, y se rehidrataron por pase a través de 100 % y 95 % de etanol (3 pases, 1 minuto cada uno, seguido de lavados de 5-1 minutos en agua destilada.

Se inactivó peroxidasa endógena por incubación a temperatura ambiente en 1 % de H₂O₂ durante 15 minutos, seguido de dos lavados en H₂O destilada/desionizada (ddH₂O). La recuperación del antígeno se logró con tampón citrato pre-calentado (disolución de desenmascaramiento de antígeno, Vector Laboratories, Burlingame, CA) en un protocolo de desenmascaramiento en microondas estándar - 10 minutos a plena potencia. Los portaobjetos se enfriaron durante 1 hora, se aclararon en ddH₂O y se dispusieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Mediatech, Herndon, VA). Las secciones de tejido se rodearon con un rotulador de barrera hidrófoba (Vector Labs) y avidina endógena y se bloquearon (avidina y biotina) siguiendo el protocolo de los fabricantes (Blocking Kit, Vector Labs). Los portaobjetos se lavaron con PBS, seguido de la adición de 10 % de suero de cabra (Vector Labs) en PBS durante 30 minutos. Los anticuerpos se diluyeron en 0,5 % de BSA (Vector Labs)/PBS, del siguiente modo:

Anti-Ki67 de conejo (Novocastra Laboratories, Newcastle upon Tyne, RU) 1:3000

Anti-fosfo-AKT de conejo: Ser473 (Cell Signaling, Beverly, MA) 1:200.

Se añadió anticuerpo y los portaobjetos se incubaron en una cámara humidificada a 4 °C durante la noche. A continuación, el anticuerpo se aspiró y los portaobjetos se lavaron con PBS. El anticuerpo secundario biotinilado (de cabra anti-conejo, Vector Labs) se diluyó 1:500 en 0,5 % de BSA/PBS, y se añadió a cada sección durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los portaobjetos se lavaron de nuevo con PBS y se cubrieron con una disolución de peroxidasa de rábano picante conjugada con avidina-biotina (reactivo R.T.U. Vectastain Elite ABC, Vector Labs) durante 30 minutos y se lavaron un tiempo final en PBS. Los portaobjetos se revelaron usando sustrato de peroxidasa artificial, normalmente NovaRed (Vector Labs) siguiendo los protocolos del fabricante. Los portaobjetos se contratiñeron con hematoxilina de Mayer (Sigma St. Louis, MO) y los portaobjetos se sometieron a un procedimiento de deshidratación estándar y se cubrieron con cubreobjetos con (Cytoseal 60, Richard Allen) y se observaron usando un Nikon Eclipse E800. Se capturaron imágenes con el software ACT-1 (Nikon Corporation, Melville, NY).

*Resultados**A. Modelo de xenoinjerto*

Con el fin de llevar a cabo los estudios *in vivo*, se identificó y caracterizó un modelo adecuado que expresó en exceso Her-2 y eliminó niveles significativos de ECD de Her-2. Adicionalmente, mientras que Her-2 puede regularse por incremento en una variedad de líneas celulares de cáncer por múltiples mecanismos, se eligió una línea celular en la que la expresión en exceso de Her-2 resultaba de la amplificación genómica del gen que codifica Her-2 debido a que se cree que este tipo de mutación genética soporta más fuertemente una función para Her-2 en el fenotipo transformado del tipo de célula. Aunque la bibliografía describe varias líneas celulares que poseen este fenotipo de 'eliminación', se eligió el modelo de BT-474 basándose en su capacidad para formar tumores en ratones inmunodeprimidos (van Slooten, H.J., y col., 1995, British J Cancer 72:22-30).

Se derivó un subclon de BT-474, denominado en el presente documento BT474-SC1, que tuvo tanto captura tumoral mejorada como elevada cinética de crecimiento, según métodos rutinarios. Usando plasma obtenido de ratón que lleva tumores BT474-SC1, se estableció que este subclon eliminaba Her-2 similar a la línea celular parental. Esta línea celular se usó para los experimentos descritos más adelante.

B. Inhibición de la eliminación de Her-2 in vivo

Se probó primero la capacidad de los inhibidores de la eliminación de Her-2, el compuesto 1 y el compuesto 2, para

reducir los niveles circulantes de ECD de Her-2 en el plasma de ratones que llevan xenoinjertos de tumor de cáncer de mama humano BT-474-SC1. Se inyectaron ratones inmunodeprimidos con células BT-474-SC1 mezcladas con Matrigel™ subcutáneamente en los flancos superiores de los ratones. De los experimentos previos se determinó que cuando la carga tumoral superó aproximadamente 200 mm³, los niveles de ECD de Her-2 circulantes fueron detectables (en muestras de plasma usando el ensayo de ELISA citado previamente) y suficientemente significativos tal que existió una ventana para la posible inhibición cuantificable (datos no mostrados). Como tales, los tumores se midieron semanalmente y cuando el número deseado de ratones tuvo tumores del tamaño requerido, se asignaron aleatoriamente a uno de los dos grupos de tratamiento, vehículo o compuesto. Entonces, todos los ratones se sangraron antes de la implantación de las bombas osmóticas en miniatura para determinar un nivel inicial de ECD circulante (día 0). Seis días después de iniciarse el tratamiento (día 6), los ratones se sacrificaron y se recogieron tejidos de interés, que incluyen sangre y tumores. Las muestras de plasma de los días 0 y 6 se analizaron por ELISA para determinar los niveles de ECD de Her-2 (Figura 27). Usando este método, cada ratón fue capaz de servir de su propio control. La mayoría de los animales tratados con vehículo mostró un modesto aumento en sus niveles de ECD eliminados con respecto al periodo de tiempo de seis días; sin embargo, los ratones tratados con un inhibidor de convertasa selectivo (compuesto 2) tuvieron un nivel significativamente menor de ECD circulante en el día 6 en comparación con los animales tratados con vehículo ($p < 0,0001$), además de basándose en los individuos (comparando días 0 y 6).

C. Inhibición del crecimiento tumoral

Para determinar el efecto de la inhibición de la eliminación de Her-2 sobre el crecimiento tumoral, los presentes inventores evaluaron el efecto del tratamiento con el compuesto 2 sobre el tamaño del tumor en el modelo de xenoinjerto BT474-SC1. Como se muestra en la Figura 28, los tumores tratados con el compuesto 2 fueron significativamente más pequeños en el día 6 que los tumores con vehículo ($p = 0,0001$) y, múltiples tumores demostraron una remisión parcial (superior a una reducción del 25 % en el volumen del tumor). Una comparación de la magnitud de cambio en ECD (56 %) y el volumen del tumor (27 %) indicó que la disminución de los niveles de ECD no fue una reflexión de la disminución del volumen del tumor.

Los estudios *in vivo* descritos anteriormente demuestran la capacidad de la inhibición de convertasa, que incluye inhibición selectiva de convertasa, para reducir la eliminación de Her-2 de células tumorales y afectar la carga tumoral de una manera aguda. Con el fin de caracterizar la eficacia terapéutica de inhibidores selectivos de convertasa, se realizaron experimentos en el mismo sistema de modelo que expone los ratones a tratamiento prolongado. En un experimento tal, otro inhibidor selectivo de convertasa, el compuesto 3 ((6S,7S)-6-[(4-fenil-3,6-dihidropiridin-1(2H)-il)carbonil]-N-hidroxi-5-azaespiro[2.5]octano-7-carboxamida), se evaluó en el mismo modelo de BT474-SC1 con respecto a un periodo de 28 días. Aunque los tumores en ratones tratados con vehículo se triplicaron en tamaño del periodo experimental, se observó una supresión completa del crecimiento tumoral en los ratones tratados con el compuesto 3 (Figura 29). Para comparación, se trató otro grupo de ratones con Trastuzumab/Herceptin™, un anticuerpo humanizado que se une a Her-2 directamente. Obsérvese que ambos tratamientos produjeron cambios similares a la cinética de crecimiento de los tumores BT-474-SC1 y la ausencia de solapamiento en la curva de crecimiento simplemente refleja un mayor volumen del tumor medio para los animales tratados con el compuesto 3 al inicio de los experimentos. Tomados conjuntamente, los datos indican que la administración de inhibidores de convertasa, que incluyen inhibidores selectivos de convertasa, disminuye los niveles circulantes de ECD de Her-2 eliminado, reduce agudamente la carga tumoral y previene eficazmente el crecimiento tumoral durante, e incluso (por ejemplo, al menos dos semanas) después de cesar la administración.

D. Inhibición de rutas de señalización de Her-2

Los tumores eliminados de grupos tratados con el compuesto 2 y vehículo se sometieron a análisis inmunohistoquímico y transferencia Western. La señalización de Her-2 normalmente conduce a la activación de rutas que controlan la proliferación y supervivencia celular. Para determinar primero si los inhibidores de convertasa fueron capaces de afectar el índice proliferativo de xenoinjertos de cáncer de mama humano, los ratones que llevaban tumores BT-474-SC1 se trataron con inhibidores selectivos de convertasa durante 14 días, momento en el que se sacrificaron y se extrajeron sus tumores y se dividieron en porciones para congelación y fijación (para incorporación en parafina e inmunohistoquímica). Las secciones de tumor incorporadas en parafina se montaron sobre portaobjetos y se usaron para inmunohistoquímica (IHC) para teñir para Ki-67, un marcador del ciclo celular activo (Figura 30A, panel superior). Los tumores tratados con inhibidores de convertasa tuvieron significativamente menos tinción de células positivas para Ki-67, indicando disminución de la proliferación celular.

Además, se ha mostrado que el señalizar Her-2 activa la ruta de Akt/PKB, se cree indirectamente, mediante la fosforilación de residuos específicos. Se ha mostrado que la activación de esta ruta afecta las rutas de supervivencia y proliferación de células tumorales (véase, por ejemplo, Datta, S.R., y col., 1999, Genes and Development 13:2905-2927) y parece que células que expresan altos niveles de Her-2 son sensibles a perturbaciones en esta ruta (Hermanto, U., y col., 2001, Oncogene, 20:7551-7562). Así, se cree que inhibir la actividad de Akt disminuirá potencialmente la proliferación de células tumorales, mientras que al mismo aumentará la sensibilidad de células a estreses que inducen apoptosis (por ejemplo, agentes quimioterapéuticos para el cáncer).

Para analizar los efectos de la inhibición de convertasa sobre la actividad de Akt, se realizó IHC específica para Akt fosforilada sobre muestras tumorales de control o tratadas (descritas anteriormente) (Figura 30A, panel inferior). Además, para examinar los efectos de la inhibición de convertasa sobre la fosforilación de Akt en el tumor completo, los niveles de Akt total y fosfo-Akt también se examinaron por análisis de inmunotransferencia usando anticuerpos específicos (Figura 30B). Tanto la IHC como la inmunotransferencia indicaron que el tratamiento con inhibidores selectivos de la eliminación disminuye la cantidad de Akt fosforilada en tumores.

Resumen

En resumen, el tratamiento de ratones que llevan xenoinjertos de tumor BT-474-SC1, un modelo de cáncer de mama humano con alta expresión de Her-2, con inhibidores de convertasa disminuyó los niveles de eliminación de ECD de Her-2 en circulación. Se muestra que tal inhibición de la eliminación de Her-2 está asociada a una inhibición del crecimiento tumoral. Efectos moleculares de la inhibición de la eliminación incluyeron disminuciones en el índice proliferativo de tumores tratados, como se evalúa por tinción con Ki67, y disminuciones en la ruta de supervivencia que señala en células tumorales, como se ejemplificó por la disminución de niveles de Akt fosforilada. Este último efecto permite que estas moléculas sean sinérgicas con otros tratamientos terapéuticos cuando se administran conjuntamente.

Los resultados anteriores indican que los inhibidores selectivos de convertasa disminuyen los niveles de ECD de Her-2 circulantes en un modelo animal de cáncer de mama humano. Esta disminución está asociada a la supresión de la supervivencia y señalización del ciclo celular y un efecto inhibidor del crecimiento tumoral.

Aunque la presente invención se ha desvelado con referencia a realizaciones específicas, es evidente que otras realizaciones y variaciones de la presente invención pueden idearse por otros expertos en la materia sin apartarse del verdadero alcance de la invención. Las reivindicaciones adjuntas pretenden interpretarse para incluir todas aquellas realizaciones y variaciones equivalentes.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Incyte Corporation
Friedman, Steven M.
Scherle, Peggy A.
Liu, Xiangdong
Burn, Timothy C.
Huber, Reid
Liu, Phillip C.C.
Hollis, Gregory F.
vaddi, Krishna
Fridman, Jordan

<120> Composiciones, métodos y kits relacionados con la escisión de HER-2

<130> INCY0005-500

<150> US 60/460,678

<151> 2003-04-04

<150> US 60/472,494

<151> 2003-05-22

<150> US 60/432,030

<151> 2003-12-22

<150> US 60/548,986

<151> 2004-03-01

<160> 48

<170> Patente en version 3.2

<210> 1

5 <211> 2864

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

10 **ccgagggcgac ctggccgccg gccgctcctc cgcgcgctgt tccgcacttg ctgccctcgc 60**
 ccggcccgga gcgccgctgc catgcggctg gcgctgctct gggccctggg gtccttgggc 120
 gcgggcagcc ctctgccttc ctggccgctc ccaaataatag gtggcactga ggagcagcag 180
 15 **gcagagtcag agaaggcccc gagggagccc ttggagcccc aggtccttca ggacgatctc 240**
 ccaattagcc tcaaaaaggt gcttcagacc agtctgcctg agcccctgag gatcaagttg 300
 20 **gagctggacg gtgacagtca tatcctggag ctgctacaga atagggagtt ggtcccaggc 360**
 cgcccaaccc tgggtgtgta ccagcccgat ggcactcggg tggtcagtga gggacacact 420
 ttggagaact gctgctacca ggggaagagt cggggatatg caggctcctg ggtgtccatc 480
 25 **tgcacctgct ctgggctcag aggcttggtg gtcctgaccc cagagagaag ctataccctg 540**
 gagcaggggc ctggggacct tcagggtcct cccattattt cgcgaatcca agatctccac 600
 30 **ctgccaggcc acacctgtgc cctgagctgg cgggaatctg tacacactca gacgccacca 660**
 gagcaccccc tgggacagcg ccacattcgc cggaggcggg atgtggtaac agagaccaag 720
 35 **actgtggagt tggtgattgt ggctgatcac tcggaggccc agaaataccg ggacttccag 780**

40

45

50

55

60

65

	cacctgctaa accgcacact ggaagtggcc ctcttgctgg acacattctt ccggcccctg	840
	aatgtacgag tggcactagt gggcctggag gcctggaccc agcgtgacct ggtggagatc	900
5	agcccaaacc cagctgtcac cctcgaaaac ttcctccact ggcgcagggc acatttgctg	960
	cctcgattgc cccatgacag tgcccagctg gtgactggta cttcattctc tgggcctacg	1020
	gtgggcatgg ccattcagaa ctccatctgt tctcctgact tctcaggagg tgtgaacatg	1080
10	gaccactcca ccagcatcct gggagtcgcc tcctccatag cccatgagtt gggccacagc	1140
	ctgggcctgg accatgattt gcctgggaat agctgcccct gtccagggtcc agccccagcc	1200
	aagacctgca tcatggaggc ctccacagac ttcctaccag gcctgaactt cagcaactgc	1260
15	agccgacggg ccctggagaa agccctcctg gatggaatgg gcagctgcct cttcgaacgg	1320
	ctgcctagcc taccacctat ggctgctttc tgcggaata tgtttgtgga gccgggagag	1380
20	cagtgtgact gtggcttcct ggatgactgc gtcgatccct gctgtgattc tttgacctgc	1440
	cagctgaggc caggtgcaca gtgtgcatct gacggaccct gttgtcaaaa ttgccagctg	1500
	cgcccgtctg gctggcagtg tcgtcctacc agaggggatt gtgacttgcc tgaattctgc	1560
25	ccaggagaca gctcccagtg tccccctgat gtcagcctag gggatggcga gccctgcgct	1620
	ggcgggcaag ctgtgtgcat gcacgggcgt tgtgcctcct atgcccagca gtgccagtca	1680
	ctttggggac ctggagccca gcccgtgctg ccactttgcc tccagacagc taatactcgg	1740
30	ggaaatgctt ttgggagctg tgggcgcaac ccagtgga gttatgtgtc ctgcacctct	1800
	agagatgcca tttgtgggca gctccagtg cagacaggta ggaccagcc tctgctgggc	1860
	tccatccggg atctactctg ggagacaata gatgtgaatg ggactgagct gaactgcagc	1920
35	tgggtgcacc tggacctggg cagtgatgtg gccagcccc tcctgactct gcctggcaca	1980
	gcctgtggcc ctggcctggg gtgtatagac catcgatgcc agcgtgtgga tctcctgggg	2040
40	gcacaggaat gtcgaagcaa atgccatgga catgggggtct gtgacagcaa caggcactgc	2100
	tactgtgagg agggctgggc accccctgac tgcaccactc agctcaaagc aaccagctcc	2160
	ctgaccacag ggctgctcct cagcctcctg gtcttattgg tcctggtgat gcttggtgcc	2220
45	agctactggt accgtgccc cctgcaccag cgactctgcc agctcaaggg acccacctgc	2280
	cagtacaggg cagcccaatc tggctcctct gaacggccag gacctccga gagggccctg	2340
50	ctggcacgag gcactaaggc tagtgctctc agcttcccgg ccccccttc caggccgctg	2400
	ccgcctgacc ctgtgtccaa gagactccag tctcaggggc cagccaagcc cccaccccca	2460
	aggaagccac tgccctgccga cccccagggc cggtgcccac cgggtgacct gcccgcccca	2520
55	ggggctggaa tcccgccct agtggtaccc tccagaccag cgccaccgcc tccgacagtg	2580
	tcctcgctct acctctgacc tctccggagg ttccgctgcc tccaagccgg acttagggct	2640
	tcaagaggcg ggcgtgccct ctggagtccc ctaccatgac tgaaggcgcc agagactggc	2700
60	gggtgtcttaa gactccgggc accgccacgc gctgtcaagc aacactctgc ggacctgccg	2760
	gcgtagttgc agcgggggct tggggagggg ctgggggttg gacgggattg aggaagggtc	2820
65	gcacagcctg tctctgctca gttgcaataa acgtgacatc ttgg	2864

<210> 2
 <211> 838
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

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

	195		200		205
5	Val Thr Glu Thr Lys Thr	Val Glu Leu Val Ile	Val Ala Asp His Ser		
	210	215	220		
10	Glu Ala Gln Lys Tyr Arg Asp Phe Gln His	Leu Leu Asn Arg Thr	Leu		
	225	230	235	240	
15	Glu Val Ala Leu Leu Leu Asp Thr Phe Phe Arg Pro Leu Asn Val Arg				
		245	250	255	
20	Val Ala Leu Val Gly Leu Glu Ala Trp Thr Gln Arg Asp	Leu Val Glu			
		260	265	270	
25	Ile Ser Pro Asn Pro Ala Val Thr Leu Glu Asn Phe	Leu His Trp Arg			
		275	280	285	
30	Arg Ala His Leu Leu Pro Arg Leu Pro His Asp	Ser Ala Gln Leu Val			
		290	295	300	
35	Thr Gly Thr Ser Phe Ser Gly Pro Thr Val Gly Met Ala Ile Gln Asn				
		305	310	315	320
40	Ser Ile Cys Ser Pro Asp Phe Ser Gly Gly Val Asn Met Asp His Ser				
		325	330	335	
45	Thr Ser Ile Leu Gly Val Ala Ser Ser Ile Ala His Glu Leu Gly His				
		340	345	350	
50	Ser Leu Gly Leu Asp His Asp Leu Pro Gly Asn Ser Cys Pro Cys Pro				
		355	360	365	
55	Gly Pro Ala Pro Ala Lys Thr Cys Ile Met Glu Ala Ser Thr Asp Phe				
		370	375	380	
60	Leu Pro Gly Leu Asn Phe Ser Asn Cys Ser Arg Arg Ala Leu Glu Lys				
		385	390	395	400
65	Ala Leu Leu Asp Gly Met Gly Ser Cys Leu Phe Glu Arg Leu Pro Ser				
		405	410	415	
70	Leu Pro Pro Met Ala Ala Phe Cys Gly Asn Met Phe Val Glu Pro Gly				
		420	425	430	
75	Glu Gln Cys Asp Cys Gly Phe Leu Asp Asp Cys Val Asp Pro Cys Cys				
		435	440	445	
80	Asp Ser Leu Thr Cys Gln Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Ala Ser Asp				

	450		455		460	
5	Gly 465	Pro Cys Cys Gln Asn 470	Cys Gln Leu Arg Pro 475	Ser Gly Trp Gln Cys 480		
10	Arg Pro Thr Arg Gly 485	Asp Cys Asp Leu Pro 490	Glu Phe Cys Pro Gly 495	Asp		
15	Ser Ser Gln Cys 500	Pro Pro Asp Val Ser 505	Leu Gly Asp Gly Glu 510	Pro Cys		
20	Ala Gly Gly Gln Ala Val Cys Met 520	His Gly Arg Cys Ala 525	Ser Tyr Ala			
25	Gln Gln Cys Gln Ser Leu Trp 535	Gly Pro Gly Ala Gln 540	Pro Ala Ala Pro			
30	Leu Cys Leu Gln Thr Ala 550	Asn Thr Arg Gly Asn 555	Ala Phe Gly Ser Cys 560			
35	Gly Arg Asn Pro Ser 565	Gly Ser Tyr Val Ser 570	Cys Thr Pro Arg Asp 575	Ala		
40	Ile Cys Gly Gln 580	Leu Gln Cys Gln Thr 585	Gly Arg Thr Gln Pro 590	Leu Leu		
45	Gly Ser Ile Arg Asp Leu Leu Trp 600	Glu Thr Ile Asp Val 605	Asn Gly Thr			
50	Glu Leu Asn Cys Ser Trp Val 615	His Leu Asp Leu Gly 620	Ser Asp Val Ala			
55	Gln Pro Leu Leu Thr Leu 630	Pro Gly Thr Ala Cys 635	Gly Pro Gly Leu Val 640			
60	Cys Ile Asp His Arg 645	Cys Gln Arg Val Asp 650	Leu Leu Gly Ala Gln 655	Glu		
65	Cys Arg Ser Lys 660	Cys His Gly His Gly 665	Val Cys Asp Ser Asn 670	Arg His		
70	Cys Tyr Cys Glu Glu Gly Trp Ala 680	Pro Pro Asp Cys Thr 685	Thr Gln Leu			
75	Lys Ala Thr Ser Ser Leu Thr 695	Thr Gly Leu Leu Leu 700	Ser Leu Leu Val			
80	Leu Leu Val Leu Val Met Leu Gly Ala Ser Tyr Trp Tyr Arg Ala Arg					

	705				710					715					720
5	Leu	His	Gln	Arg	Leu ₇₂₅	Cys	Gln	Leu	Lys	Gly ₇₃₀	Pro	Thr	Cys	Gln	Tyr ₇₃₅ Arg
10	Ala	Ala	Gln	Ser ₇₄₀	Gly	Pro	Ser	Glu	Arg ₇₄₅	Pro	Gly	Pro	Pro	Gln ₇₅₀	Arg Ala
15	Leu	Leu	Ala ₇₅₅	Arg	Gly	Thr	Lys	Ala ₇₆₀	Ser	Ala	Leu	Ser	Phe ₇₆₅	Pro	Ala Pro
20	Pro	Ser ₇₇₀	Arg	Pro	Leu	Pro	Pro ₇₇₅	Asp	Pro	Val	Ser	Lys ₇₈₀	Arg	Leu	Gln Ser
25	Gln ₇₈₅	Gly	Pro	Ala	Lys	Pro ₇₉₀	Pro	Pro	Pro	Arg	Lys ₇₉₅	Pro	Leu	Pro	Ala Asp ₈₀₀
30	Pro	Gln	Gly	Arg	Cys ₈₀₅	Pro	Ser	Gly	Asp	Leu ₈₁₀	Pro	Gly	Pro	Gly	Ala ₈₁₅ Gly
35	Ile	Pro	Pro	Leu ₈₂₀	Val	Val	Pro	Ser	Arg ₈₂₅	Pro	Ala	Pro	Pro	Pro ₈₃₀	Pro Thr
40	Val	Ser	Ser ₈₃₅	Leu	Tyr	Leu									
45	<210> 3														
50	<211> 2936														
55	<212> ADN														
60	<213> Homo sapiens														
65	<400> 3														
	ccgaggcgac	ctggccgccg	gccgctcctc	cgcgcgctgt	tccgcacttg	ctgccctcgc									60
	ccggcccgga	gcgccgctgc	catgcggctg	gcgctgctct	gggccctggg	gctcctgggc									120
	gcgggagcc	ctctgccttc	ctggccgctc	ccaaatatag	gtggcactga	ggagcagcag									180
	gcagagtcag	agaaggcccc	gaggagagccc	ttggagcccc	aggtccttca	ggacgatctc									240
	ccaattagcc	tcaaaaaggt	gcttcagacc	agtctgcctg	agcccctgag	gatcaagttg									300
	gagctggacg	gtgacagtca	tatcctggag	ctgctacaga	atagggagtt	ggtcccaggc									360
	cgcccaaccc	tggtgtggta	ccagcccgat	ggcactcggg	tggtcagtga	gggacacact									420
	ttggagaact	gctgctacca	gggaagagtg	cggggatatg	caggctcctg	ggtgtccatc									480
	tgcacctgct	ctgggctcag	aggcttggtg	gtcctgacct	cagagagaag	ctataccctg									540
	gagcaggggc	ctggggacct	tcagggtcct	cccattattt	cgcgaaatcca	agatctccac									600
	ctgccaggcc	acacctgtgc	cctgagctgg	cgggaatctg	tacacactca	gacgccacca									660
	gagcaccccc	tgggacagcg	ccacattcgc	cggaggcggg	atgtggtaac	agagaccaag									720

	actgtggagt	tggtgattgt	ggctgatcac	tcggaggccc	agaaataaccg	ggacttccag	780
	cacctgctaa	accgcacact	ggaagtggcc	ctcttgctgg	acacattctt	ccggcccctg	840
5	aatgtacgag	tggcactagt	gggcctggag	gcctggaccc	agcgtgacct	ggtggagatc	900
	agcccaaacc	cagctgtcac	cctcgaaaac	ttcctccact	ggcgcagggc	acatttgctg	960
10	cctcgattgc	cccatgacag	tgcccagctg	gtgactggta	cttcattctc	tgggcctacg	1020
	gtgggcatgg	ccattcagaa	ctccatctgt	tctcctgact	tctcaggagg	tgtgaacatg	1080
	gaccactcca	ccagcatcct	gggagtcgcc	tcctccatag	cccatgagtt	gggccacagc	1140
15	ctgggcctgg	accatgattt	gcctgggaat	agctgcccct	gtccagggtcc	agccccagcc	1200
	aagacctgca	tcatggaggc	ctccacagac	ttcctaccag	gcctgaactt	cagcaactgc	1260
20	agccgacggg	ccctggagaa	agccctcctg	gatggaatgg	gcagctgcct	cttcgaacgg	1320
	ctgcctagcc	tacccctat	ggctgctttc	tgcggaata	tgtttgtgga	gccgggag	1380
	cagtgtgact	gtggcttcct	ggatgactgc	gtcgatccct	gctgtgattc	tttgacctgc	1440
25	cagctgaggc	caggtgcaca	gtgtgcatct	gacggaccct	gttgtcaaaa	ttgccagctg	1500
	cgcccgtctg	gctggcagtg	tcgtcctacc	agaggggatt	gtgacttgcc	tgaattctgc	1560
30	ccaggagaca	gctcccagtg	tccccctgat	gtcagcctag	gggatggcga	gccctgcgct	1620
	ggcgggcaag	ctgtgtgcat	gcacgggcgt	tgtgcctcct	atgcccagca	gtgccagtca	1680
	ctttggggac	ctggagccca	gcccgtgcg	ccactttgcc	tccagacagc	taataactcg	1740
35	ggaaatgctt	ttgggagctg	tgggcgcaac	cccagtggca	gttatgtgtc	ctgcaccctt	1800
	agagatgcca	tttgtgggca	gctccagtg	cagacaggta	ggaccagcc	tctgctgggc	1860
40	tccatccggg	atctactctg	ggagacaata	gatgtgaatg	ggactgagct	gaactgcagc	1920
	tgggtgcacc	tggacctggg	cagtgatgtg	gcccagcccc	tcctgactct	gcctggcaca	1980
	gcctgtggcc	ctggcctggt	gtgtatagac	catcgatgcc	agcgtgtgga	tctcctgggg	2040
45	gcacaggaat	gtcgaagcaa	atgccatgga	catgggggtct	gtgacagcaa	caggcactgc	2100
	tactgtgagg	agggtgggc	accccctgac	tgcaccactc	agctcaaagc	aaccagctcc	2160
50	ctgaccacag	ggctgctcct	cagcctcctg	gtcttattgg	tcctgggtgat	gcttgggtgcc	2220
	agctactggt	accgtgcccc	cctgcaccag	cgactctgcc	agctcaaggg	accacactgc	2280
	cagtacaggg	cagcccaatc	tggtccctct	gaacggccag	gacctccgca	gagggccctg	2340
55	ctggcacgag	gcactaaggc	tagtgctctc	agcttcccgg	cccccccttc	caggccgctg	2400
	ccgcctgacc	ctgtgtccaa	gagactccag	gctgagctgg	ctgaccgacc	caatccccct	2460
60	acccgcccctc	tgcccgtgta	cccgggtggtg	agaagcccga	agtctcaggg	gccagccaag	2520
	ccccacccc	caaggaagcc	actgcctgcc	gacccccagg	gccgggtgcc	atcgggtgac	2580
65	ctgcccggcc	caggggctgg	aatcccggcc	ctagtgggtac	cctccagacc	agcggccaccg	2640

cctccgacag tgtcctcgct ctacctctga cctctccgga gggtccgctg cctccaagcc 27
 ggacttaggg cttcaagagg cgggcgtgcc ctctggagtc ccctaccatg actgaaggcg 27
 5 ccagagactg gcggtgtctt aagactccgg gcaccgccac gcgctgtcaa gcaacactct 28
 gcggacctgc cggcgtagtt gcagcggggg cttggggagg ggctgggggt tggacgggat 28
 10 tgaggaaggt ccgcacagcc tgtctctgct cagttgcaat aaacgtgaca tcttgg 29

<210> 4

<211> 862

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Arg Leu Ala Leu Leu Trp Ala Leu Gly Leu Leu Gly Ala Gly Ser
 1 5 10 15
 Pro Leu Pro Ser Trp Pro Leu Pro Asn Ile Gly Gly Thr Glu Glu Gln
 20 25 30
 Gln Ala Glu Ser Glu Lys Ala Pro Arg Glu Pro Leu Glu Pro Gln Val
 35 40 45
 Leu Gln Asp Asp Leu Pro Ile Ser Leu Lys Lys Val Leu Gln Thr Ser
 50 55 60
 Leu Pro Glu Pro Leu Arg Ile Lys Leu Glu Leu Asp Gly Asp Ser His
 65 70 75 80
 Ile Leu Glu Leu Leu Gln Asn Arg Glu Leu Val Pro Gly Arg Pro Thr
 85 90 95
 Leu Val Trp Tyr Gln Pro Asp Gly Thr Arg Val Val Ser Glu Gly His
 100 105 110
 Thr Leu Glu Asn Cys Cys Tyr Gln Gly Arg Val Arg Gly Tyr Ala Gly
 115 120 125
 Ser Trp Val Ser Ile Cys Thr Cys Ser Gly Leu Arg Gly Leu Val Val
 130 135 140
 Leu Thr Pro Glu Arg Ser Tyr Thr Leu Glu Gln Gly Pro Gly Asp Leu
 145 150 155 160
 Gln Gly Pro Pro Ile Ile Ser Arg Ile Gln Asp Leu His Leu Pro Gly
 165 170 175
 His Thr Cys Ala Leu Ser Trp Arg Glu Ser Val His Thr Gln Thr Pro

	180	185	190
5	Pro Glu His 195	Pro Leu Gly Gln Arg 200	His Ile Arg Arg Arg 205
10	Val Thr Glu Thr Lys Thr 210	Val Glu Leu Val Ile 215	Val Ala Asp His Ser 220
15	Glu Ala Gln Lys Tyr Arg 225	Asp Phe Gln His Leu 230	Leu Leu Asn Arg Thr Leu 235
20	Glu Val Ala Leu Leu 245	Leu Asp Thr Phe Phe 250	Arg Pro Leu Asn Val Arg 255
25	Val Ala Leu Val Gly Leu Glu 260	Ala Trp Thr Gln Arg Asp 265	Leu Val Glu 270
30	Ile Ser Pro Asn Pro Ala Val 275	Thr Leu Glu Asn Phe 280	Leu His Trp Arg 285
35	Arg Ala His Leu Leu Pro 290	Arg Leu Pro His Asp 295	Ser Ala Gln Leu Val 300
40	Thr Gly Thr Ser Phe Ser 305	Gly Pro Thr Val Gly 310	Met Ala Ile Gln Asn 315
45	Ser Ile Cys Ser Pro Asp Phe Ser 325	Gly Gly Val Asn Met Asp 330	His Ser 335
50	Thr Ser Ile Leu Gly Val Ala Ser 340	Ser Ile Ala His Glu 345	Leu Gly His 350
55	Ser Leu Gly Leu Asp His Asp 355	Leu Pro Gly Asn Ser 360	Cys Pro Cys Pro 365
60	Gly Pro Ala Pro Ala Lys Thr 370	Cys Ile Met Glu Ala 375	Ser Thr Asp Phe 380
65	Leu Pro Gly Leu Asn Phe Ser 385	Asn Cys Ser Arg Arg 390	Ala Leu Glu Lys 395
	Ala Leu Leu Asp Gly Met Gly Ser Cys 405	Leu Phe Glu Arg Leu 410	Pro Ser 415
	Leu Pro Pro Met Ala Ala Phe Cys 420	Gly Asn Met Phe Val 425	Glu Pro Gly 430
	Glu Gln Cys Asp Cys Gly Phe Leu Asp 435	Asp Cys Val Asp Pro Cys Cys 440	

	435		440		445
5	Asp Ser Leu Thr Cys Gln Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Ala Ser Asp	450	455	460	
10	Gly Pro Cys Cys Gln Asn Cys Gln Leu Arg Pro Ser Gly Trp Gln Cys	465	470	475	480
15	Arg Pro Thr Arg Gly Asp Cys Asp Leu Pro Glu Phe Cys Pro Gly Asp	485	490	495	
20	Ser Ser Gln Cys Pro Pro Asp Val Ser Leu Gly Asp Gly Glu Pro Cys	500	505	510	
25	Ala Gly Gly Gln Ala Val Cys Met His Gly Arg Cys Ala Ser Tyr Ala	515	520	525	
30	Gln Gln Cys Gln Ser Leu Trp Gly Pro Gly Ala Gln Pro Ala Ala Pro	530	535	540	
35	Leu Cys Leu Gln Thr Ala Asn Thr Arg Gly Asn Ala Phe Gly Ser Cys	545	550	555	560
40	Gly Arg Asn Pro Ser Gly Ser Tyr Val Ser Cys Thr Pro Arg Asp Ala	565	570	575	
45	Ile Cys Gly Gln Leu Gln Cys Gln Thr Gly Arg Thr Gln Pro Leu Leu	580	585	590	
50	Gly Ser Ile Arg Asp Leu Leu Trp Glu Thr Ile Asp Val Asn Gly Thr	595	600	605	
55	Glu Leu Asn Cys Ser Trp Val His Leu Asp Leu Gly Ser Asp Val Ala	610	615	620	
60	Gln Pro Leu Leu Thr Leu Pro Gly Thr Ala Cys Gly Pro Gly Leu Val	625	630	635	640
65	Cys Ile Asp His Arg Cys Gln Arg Val Asp Leu Leu Gly Ala Gln Glu	645	650	655	
	Cys Arg Ser Lys Cys His Gly His Gly Val Cys Asp Ser Asn Arg His	660	665	670	
	Cys Tyr Cys Glu Glu Gly Trp Ala Pro Pro Asp Cys Thr Thr Gln Leu	675	680	685	
	Lys Ala Thr Ser Ser Leu Thr Thr Gly Leu Leu Leu Ser Leu Leu Val				

690 695 700
 5 Leu Leu Val Leu Val Met Leu Gly Ala Ser Tyr Trp Tyr Arg Ala Arg
 705 710 715 720
 10 Leu His Gln Arg Leu Cys Gln Leu Lys Gly Pro Thr Cys Gln Tyr Arg
 725 730 735
 15 Ala Ala Gln Ser Gly Pro Ser Glu Arg Pro Gly Pro Pro Gln Arg Ala
 740 745 750
 20 Leu Leu Ala Arg Gly Thr Lys Ala Ser Ala Leu Ser Phe Pro Ala Pro
 755 760 765
 25 Pro Ser Arg Pro Leu Pro Pro Asp Pro Val Ser Lys Arg Leu Gln Ala
 770 775 780
 30 Glu Leu Ala Asp Arg Pro Asn Pro Pro Thr Arg Pro Leu Pro Ala Asp
 785 790 795 800
 35 Pro Val Val Arg Ser Pro Lys Ser Gln Gly Pro Ala Lys Pro Pro Pro
 805 810 815
 40 Pro Arg Lys Pro Leu Pro Ala Asp Pro Gln Gly Arg Cys Pro Ser Gly
 820 825 830
 45 Asp Leu Pro Gly Pro Gly Ala Gly Ile Pro Pro Leu Val Val Pro Ser
 835 840 845
 50 Arg Pro Ala Pro Pro Pro Pro Thr Val Ser Ser Leu Tyr Leu
 850 855 860

<210> 5

<211> 3360

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 5

55 gcggcggcag gcctagcagc acgggaaccg tccccgcgc gcatgcgcgc gccctgaag 60
 cgccctggggg acgggtaggg gcgggaggta ggggcgcggc tccgcgtgcc agttgggtgc 120
 ccgcgcgtca cgtggtgagg aaggaggcgg aggtctgagt ttcgaaggag ggggggagag 180
 aagaggggaac gagcaaggga aggaaagcgg ggaaaggagg aaggaaacga acgaggggga 240
 60 gggagggtccc tgttttggag gagctaggag cgttgccggc ccctgaagtg gagcgagagg 300
 gaggtgcttc gccgtttctc ctgccagggg aggtcccggc ttcccgtgga ggctccggac 360
 caagccccctt cagcttctcc ctccggatcg atgtgctgct gttaaccctg gaggaggcgg 420
 65 cggcggcggc agcggcagcg gaagatggtg ttgctgagag tgtaattct gctcctctcc 480

	tgggcgggcgg	ggatgggagg	tcagtatggg	aatcctttta	ataaatatat	cagacattat	540
	gaaggattat	cttacaatgt	ggattcatta	caccaaaaac	accagcgtgc	caaaagagca	600
5	gtctcacatg	aagaccaatt	tttacgtcta	gatttccatg	cccatggaag	acatttcaac	660
	ctacgaatga	agagggacac	ttcccttttc	agtgatgaat	ttaaagtaga	aacatcaaat	720
10	aaagtacttg	attatgatac	ctctcatatt	tacactggac	atatttatgg	tgaagaagga	780
	agtttttagcc	atgggtctgt	tattgatgga	agatttgaag	gattcatcca	gactcgtggt	840
	ggcacatttt	atgttgagcc	agcagagaga	tatattaaag	accgaactct	gccatttcac	900
15	tctgtcattt	atcatgaaga	tgatattaac	tatccccata	aatacgggtcc	tcaggggggc	960
	tgtgcagatc	attcagtatt	tgaaagaatg	aggaaatacc	agatgactgg	tgtagaggaa	1020
20	gtaacacaga	tacctcaaga	agaacatgct	gctaattggtc	cagaacttct	gaggaaaaaa	1080
	cgtacaactt	cagctgaaaa	aaataacttg	cagctttata	ttcagactga	tcatttggtc	1140
	tttaaataatt	acggaacacg	agaagctgtg	attgcccaga	tatccagtca	tgtaaagcg	1200
25	attgatacaa	tttaccagac	cacagacttc	tccggaatcc	gtaacatcag	tttcatgggtg	1260
	aaacgcataa	gaatcaatac	aactgctgat	gagaaggacc	ctacaaatcc	tttccgtttc	1320
30	ccaaatattg	gtgtggagaa	gtttctggaa	ttgaattctg	agcagaatca	tgatgactac	1380
	tgtttggcct	atgtcttcac	agaccgagat	tttgatgatg	gcgtacttgg	tctggcttgg	1440
	gttggagcac	cttcaggaag	ctctggagga	atatgtgaaa	aaagtaaact	ctattcagat	1500
35	ggtaagaaga	agtccttaaa	cactggaatt	attactgttc	agaactatgg	gtctcatgta	1560
	cctcccaaag	tctctcacat	tacttttgct	cacgaagttg	gacataactt	tgatcccca	1620
40	catgattctg	gaacagagtg	cacaccagga	gaatctaaga	atttgggtca	aaaagaaaat	1680
	ggcaattaca	tcattgtatg	aagagcaaca	tctggggaca	aacttaacaa	caataaattc	1740
	tcactctgta	gtattagaaa	tataagccaa	gttcttgaga	agaagagaaa	caactgtttt	1800
45	gttgaatctg	gccaacctat	ttgtggaaat	ggaatggtag	aacaagggtga	agaatgtgat	1860
	tggtggctata	gtgaccagt	taaagatgaa	tgctgcttcg	atgcaaatca	accagagggga	1920
	agaaaatgca	aactgaaacc	tgggaaacag	tgagtcctca	gtcaagggtcc	ttgttgatca	1980
50	gcacagtgtg	cattcaagtc	aaagtctgag	aagtgtcggg	atgattcaga	ctgtgcaagg	2040
	gaaggaatat	gtaatggctt	cacagctctc	tgcccagcat	ctgaccctaa	accaaacttc	2100
55	acagactgta	ataggcatac	acaagtgtgc	attaatgggc	aatgtgcagg	ttctatctgt	2160
	gagaaatatg	gcttagagga	gtgtacgtgt	gccagttctg	atggcaaaga	tgataaagaa	2220
	ttatgccatg	tatgctgtat	gaagaaaatg	gacccatcaa	cttgtgccag	tacaggggtct	2280
60	gtgcagtgga	gtaggcactt	cagtggtcga	accatcacc	tgcaacctgg	atccccttgc	2340
	aacgatttta	gaggttactg	tgatgttttc	atgcggtgca	gattagtaga	tgctgatggt	2400

65

cctctagcta ggcttaaaaa agcaatTTTT agtccagagc tctatgaaaa cattgctgaa 2460
 tggattgtgg ctcatgtgtg ggcagtatta cttatgggaa ttgctctgat catgctaattg 2520
 5 gctggattta ttaagatatg cagtgttcat actccaagta gtaatccaaa gttgcctcct 2580
 cctaaaccac ttccaggcac tttaaagagg aggagacctc cacagcccat tcagcaaccc 2640
 cagcgtcagc ggccccgaga gaggatcaaa atgggacaca tgagacgcta actgcagctt 2700
 10 ttgccttggt tcttctagt gcctacaatg ggaaaacttc actccaaaga gaaacctatt 2760
 aagtcattcat ctccaaacta aaccctcaca agtaacagtt gaagaaaaaa tggcaagaga 2820
 tcatatcctc agaccagggtg gaattactta aatttttaaag cctgaaaatt ccaatttggg 2880
 15 ggtgggaggt ggaaaaggaa ccaatttttc ttatgaacag atatttttaa cttaatggca 2940
 caaagtctta gaatattatt atgtgccccg tgttcctgt tcttcgttgc tgcattttct 3000
 tcacttgagc gcaaacttgg ctctcaataa acttttacca caaattgaaa taaatatatt 3060
 20 tttttcaact gccaatcaag gctaggaggc tcgaccacct caacattgga gacatcactt 3120
 gccaatgtac atacctgtt atatgcagac atgtatttct tacgtacact gtacttctgt 3180
 25 gtgcaattgt aaacagaaat tgcaatatgg atgtttcttt gtattataaa atttttccgc 3240
 tcttaattaa aaattactgt ttaattgaca tactcaggat aacagagaat ggtggtattc 3300
 agtgggccag gattctgtaa tgctttacac aggagtttt gaaatgaaaa tcaatttacc 3360

30 <210> 6
 <211> 748
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 6

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

60

65

Tyr Asp Thr Ser His Ile Tyr Thr Gly His Ile Tyr Gly Glu Glu Gly
 100 105 110
 5 Ser Phe Ser His Gly Ser Val Ile Asp Gly Arg Phe Glu Gly Phe Ile
 115 120 125
 10 Gln Thr Arg Gly Gly Thr Phe Tyr Val Glu Pro Ala Glu Arg Tyr Ile
 130 135 140
 15 Lys Asp Arg Thr Leu Pro Phe His Ser Val Ile Tyr His Glu Asp Asp
 145 150 155 160
 20 Ile Asn Tyr Pro His Lys Tyr Gly Pro Gln Gly Gly Cys Ala Asp His
 165 170 175
 25 Ser Val Phe Glu Arg Met Arg Lys Tyr Gln Met Thr Gly Val Glu Glu
 180 185 190
 30 Val Thr Gln Ile Pro Gln Glu Glu His Ala Ala Asn Gly Pro Glu Leu
 195 200 205
 35 Leu Arg Lys Lys Arg Thr Thr Ser Ala Glu Lys Asn Thr Cys Gln Leu
 210 215 220
 40 Tyr Ile Gln Thr Asp His Leu Phe Phe Lys Tyr Tyr Gly Thr Arg Glu
 225 230 235 240
 45 Ala Val Ile Ala Gln Ile Ser Ser His Val Lys Ala Ile Asp Thr Ile
 245 250 255
 50 Tyr Gln Thr Thr Asp Phe Ser Gly Ile Arg Asn Ile Ser Phe Met Val
 260 265 270
 55 Lys Arg Ile Arg Ile Asn Thr Thr Ala Asp Glu Lys Asp Pro Thr Asn
 275 280 285
 60 Pro Phe Arg Phe Pro Asn Ile Gly Val Glu Lys Phe Leu Glu Leu Asn
 290 295 300
 65 Ser Glu Gln Asn His Asp Asp Tyr Cys Leu Ala Tyr Val Phe Thr Asp
 305 310 315 320
 Arg Asp Phe Asp Asp Gly Val Leu Gly Leu Ala Trp Val Gly Ala Pro
 325 330 335
 Ser Gly Ser Ser Gly Gly Ile Cys Glu Lys Ser Lys Leu Tyr Ser Asp
 340 345 350

Gly Lys Lys Lys Ser Leu Asn Thr Gly Ile Ile Thr Val Gln Asn Tyr
 355 360 365
 5
 Gly Ser His Val Pro Pro Lys Val Ser His Ile Thr Phe Ala His Glu
 370 375 380
 10
 Val Gly His Asn Phe Gly Ser Pro His Asp Ser Gly Thr Glu Cys Thr
 385 390 395 400
 15
 Pro Gly Glu Ser Lys Asn Leu Gly Gln Lys Glu Asn Gly Asn Tyr Ile
 405 410 415
 20
 Met Tyr Ala Arg Ala Thr Ser Gly Asp Lys Leu Asn Asn Asn Lys Phe
 420 425 430
 25
 Ser Leu Cys Ser Ile Arg Asn Ile Ser Gln Val Leu Glu Lys Lys Arg
 435 440 445
 30
 Asn Asn Cys Phe Val Glu Ser Gly Gln Pro Ile Cys Gly Asn Gly Met
 450 455 460
 35
 Val Glu Gln Gly Glu Glu Cys Asp Cys Gly Tyr Ser Asp Gln Cys Lys
 465 470 475 480
 40
 Asp Glu Cys Cys Phe Asp Ala Asn Gln Pro Glu Gly Arg Lys Cys Lys
 485 490 495
 45
 Leu Lys Pro Gly Lys Gln Cys Ser Pro Ser Gln Gly Pro Cys Cys Thr
 500 505 510
 50
 Ala Gln Cys Ala Phe Lys Ser Lys Ser Glu Lys Cys Arg Asp Asp Ser
 515 520 525
 55
 Asp Cys Ala Arg Glu Gly Ile Cys Asn Gly Phe Thr Ala Leu Cys Pro
 530 535 540
 60
 Ala Ser Asp Pro Lys Pro Asn Phe Thr Asp Cys Asn Arg His Thr Gln
 545 550 555 560
 65
 Val Cys Ile Asn Gly Gln Cys Ala Gly Ser Ile Cys Glu Lys Tyr Gly
 565 570 575
 70
 Leu Glu Glu Cys Thr Cys Ala Ser Ser Asp Gly Lys Asp Asp Lys Glu
 580 585 590
 75
 Leu Cys His Val Cys Cys Met Lys Lys Met Asp Pro Ser Thr Cys Ala
 595 600 605

Ser Thr Gly Ser Val Gln Trp Ser Arg His Phe Ser Gly Arg Thr Ile
 610 615 620
 5 Thr Leu Gln Pro Gly Ser Pro Cys Asn Asp Phe Arg Gly Tyr Cys Asp
 625 630 635 640
 10 Val Phe Met Arg Cys Arg Leu Val Asp Ala Asp Gly Pro Leu Ala Arg
 645 650 655
 15 Leu Lys Lys Ala Ile Phe Ser Pro Glu Leu Tyr Glu Asn Ile Ala Glu
 660 665 670
 20 Trp Ile Val Ala His Trp Trp Ala Val Leu Leu Met Gly Ile Ala Leu
 675 680 685
 25 Ile Met Leu Met Ala Gly Phe Ile Lys Ile Cys Ser Val His Thr Pro
 690 695 700
 30 Ser Ser Asn Pro Lys Leu Pro Pro Pro Lys Pro Leu Pro Gly Thr Leu
 705 710 715 720
 35 Lys Arg Arg Arg Pro Pro Gln Pro Ile Gln Gln Pro Gln Arg Gln Arg
 725 730 735
 40 Pro Arg Glu Ser Tyr Gln Met Gly His Met Arg Arg
 740 745

40 <210> 7
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>
 <223> secuencia oligonucleotida corr.a (1272-1300) de ADAM10

<400> 7
 ggacaaactt aacaacaat 19

50 <210> 8
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> secuencia oligonucleotida corr.a (281-199) de ADAM15

<400> 8
 60 gcccaaccct ggtgtgta 19

<210> 9
 <211> 19
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> secuencia cebador directo

 <400> 9
 5 tgctcctccg gtcactgtg 19

 <210> 10
 <211> 23
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> secuencia cebador directo

 15 <400> 10
 tgtcaagtca tcttggctc aaa 23

 <210> 11
 <211> 22
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> secuencia cebador directo
 25
 <400> 11
 tccaaagttg cctcctccta aa 22

 <210> 12
 30 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 35 <223> secuencia cebador directo

 <400> 12
 atgaggaagc cgccagatt 19

 40 <210> 13
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 45 <220>
 <223> secuencia cebador directo

 <400> 13
 acaggcactg ctactgtgag ga 22
 50
 <210> 14
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> secuencia cebador directo

 <400> 14
 60 gcatggattc tgcacggt 19

 65

<210> 15
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <223> secuencia cebador directo
 <400> 15
 10 tctcaaatag agaggacgga gtcgtcc 27
 <210> 16
 <211> 21
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia cebador directo
 20 <400> 16
 tgcaaggaca aaggctatgg a 21
 <210> 17
 <211> 25
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia cebador directo
 30 <400> 17
 aagtgaagaga tggactgtg tgtgg 25
 <210> 18
 <211> 23
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> secuencia cebador directo
 <400> 18
 gatgactcct cagtgtctt cca 23
 45 <210> 19
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>
 <223> secuencia cebador directo
 <400> 19
 ccatttgtgg cccaagaga 19
 55 <210> 20
 60
 65

<211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> secuencia cebador directo
 <400> 20
 ctgcacccgc acatggt 17
 10 <210> 21
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> secuencia cebador directo
 <400> 21
 20 ttggcttgat gacctgcttt g 21
 <210> 22
 <211> 28
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia cebador directo
 30 <400> 22
 aaatctgtca cctttagaat tcacttca 28
 <210> 23
 <211> 15
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia cebador directo
 40 <400> 23
 gggccgctga cgctg 15
 <210> 24
 45 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 50 <223> secuencia cebador directo
 <400> 24
 caacattctg aactgcagc aa 22
 55 <210> 25
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 60
 65

<220>
 <223> secuencia cebador directo

 <400> 25
 5 ccaagcatca ccaggacca 19

 <210> 26
 <211> 14
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> secuencia cebador directo

 15 <400> 26
 tgcaggcggc ctgg 14

 <210> 27
 <211> 20
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> secuencia cebador directo
 25
 <400> 27
 gggaaacgat gcaatttgg 20

 <210> 28
 30 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 35 <223> secuencia cebador directo

 <400> 28
 tttcccatca catttaatcc ttcc 24

 40 <210> 29
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 45 <220>
 <223> secuencia cebador directo

 <400> 29
 50 caggtctcag gaaggcagac at 22

 <210> 30
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 55
 <220>
 <223> secuencia cebador directo

 60

 65

<400> 30
 ggtgccggat taccatagca 20
 5 <210> 31
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> secuencia cebador directo
 <400> 31
 gcagttcccc atgttctgtg a 21
 15 <210> 32
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> secuencia cebador directo
 <400> 32
 25 gctccccgac aagtcacttc 20
 <210> 33
 <211> 27
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia prueba
 35 <400> 33
 cccacccttc ccagttcctg tctacac 27
 <210> 34
 <211> 25
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> secuencia prueba
 45 <400> 34
 caaggctgcc ccaaagatt gtttc 25
 <210> 35
 <211> 26
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 55 <223> secuencia prueba
 <400> 35
 agacctccac agccattca gcaacc 26
 60
 65

<210> 36
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Secuencia prueba
 <400> 36
 10 ctaccacccg aaggacaatc ccagg 25
 <210> 37
 <211> 25
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia prueba
 20 <400> 37
 tcaaagcaac cagctccctg accac 25
 <210> 38
 <211> 22
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia prueba
 30 <400> 38
 aaacccttct ctgcgcccc ga 22
 <210> 39
 <211> 20
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Secuencia prueba
 <400> 39
 tccaagccgg ccaattcccc 20
 45 <210> 40
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Secuencia prueba
 <400> 40
 tagtgctgat agtggccac ctctaagaa ca 32
 55 <210> 41
 <211> 34
 <212> ADN
 60
 65

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Secuencia prueba
 5 <400> 41
 caggaaagat ctgcatccat aagaagtggtg tcag 34
 <210> 42
 10 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 15 <223> Secuencia prueba
 <400> 42
 ctgttcccaa tggcgggtcat ttttgt 26
 20 <210> 43
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Secuencia prueba
 <400> 43
 ctgttgcccg gacatctgcg c 21
 30 <210> 44
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Secuencia prueba
 <400> 44
 40 actctaccgt tcacctagat ggcca 25
 <210> 45
 <211> 12
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> lugar de metalloproteinasas activa para familia ADAM
 50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa es cualquier aminoácido.
 55 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(7)
 <223> Xaa es cualquier aminoácido.
 60 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (9)..(10)
 <223> Xaa es cualquier aminoácido.
 65 <400> 45

His Glu Xaa Gly His Xaa Xaa Gly Xaa Xaa His Asp
1 5 10

5
 <210> 46
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Péptido sintetizado químicamente

15
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> (7-metoxicoumarina-4-il) acetil-Prolina

20
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> (3-[2,4-dinitrofenil]-L-2,3-diaminopropionil)-Alanina

25
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural.

30
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> AMIDATION
 <400> 46

Xaa Leu Gly Leu Xaa Arg
1 5

35

40
 <210> 47
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45
 <220>
 <223> Péptido sintetizado químicamente

50
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> (7-metoxycoumarina-4-il) acetil-Arginina

55
 <220>
 <221> misc_feature

60

65

<222> (1)..(1)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural.

5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Nva

```

10  <220>
    <221> misc_feature
    <222> (7)..(7)
    <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural.

```

```

15  <220>
    <221> MOD_RES
    <222> (10)..(10)
    <223> (2,4)-dinitrofenil Lisina-amida

```

```

20  <220>
    <221> misc_feature
    <222> (10)..(10)
    <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural.

```

25 <400> 47

Xaa Pro Lys Pro Val Glu Xaa Trp Arg Xaa
1 5 10

30

<210> 48
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintetizado químicamente

```

40  <220>
    <221> MOD_RES
    <222> (1)..(1)
    <223> (7-metoxicoumarina-4-il)-acetil Prolina

```

```

45  <220>
    <221> misc_feature
    <222> (1)..(1)
    <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural.

```

```

50  <220>
    <221> MOD_RES
    <222> (7)..(7)
    <223> (3-[2,4-dinitrofenil]-L-2,3-diaminopropionil-Arginina

```

55 <220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural.

60 $\langle 220 \rangle$

65

<221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> AMIDATION

5

<400> 48

10

Xaa Leu Ala Gln Ala Val Xaa Ser Ser Ser Arg

15

1

5

10

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

1. Un compuesto que es un inhibidor de ADAM o un anticuerpo anti-Her2 para su uso en un método para tratar cáncer, en el que dicho cáncer expresa en exceso Her-2, y en el que el tratamiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-Her2 y el inhibidor de ADAM, en el que el inhibidor de ADAM es un inhibidor de metaloproteinasa que inhibe la escisión de Her-2 *in vivo*.
2. El compuesto de la reivindicación 1, en el que dicho inhibidor de ADAM es (6S,7S)-7-[(hidroxiamino)carbonil]-6-[(4-fenilpiperazin-1-il)carbonil]-5-azaespiro[2.5]octano-5-carboxilato de metilo.
3. El compuesto de la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho anticuerpo anti-Her2 es trastuzumab.
4. El compuesto de la reivindicación 1, 2 ó 3, en el que dicho cáncer es cáncer de mama.
5. El compuesto de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo anti-Her2 se administra simultáneamente con dicho inhibidor de ADAM.
6. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el tratamiento comprende además administrar una citotoxina.
7. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el tratamiento comprende además administrar un inhibidor de tirosina cinasa de EGFR.
8. Uso de un compuesto en la fabricación de un medicamento para tratar cáncer, en el que dicho cáncer expresa en exceso Her-2, en el que el tratamiento comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de ADAM que es un inhibidor de metaloproteinasa que inhibe la escisión de Her-2 *in vivo* y un anticuerpo anti-Her2, en el que dicho compuesto es el inhibidor de ADAM o el anticuerpo anti-Her2.
9. El uso de la reivindicación 8, en el que dicho inhibidor de ADAM es (6S,7S)-7-[(hidroxiamino)carbonil]-6-[(4-fenilpiperazin-1-il)carbonil]-5-azaespiro[2.5]octano-5-carboxilato de metilo.
10. El uso de la reivindicación 8 ó 9, en el que dicho anticuerpo anti-Her2 es trastuzumab.
11. El uso de la reivindicación 8, 9 ó 10 en el que dicho cáncer es cáncer de mama.
12. El uso de la reivindicación 8, en el que dicho anticuerpo anti-Her2 se administra simultáneamente con dicho inhibidor de ADAM.
13. El uso de la reivindicación 8 en el que el tratamiento comprende además administrar una citotoxina.
14. El uso de la reivindicación 8, en el que el tratamiento comprende además administrar un inhibidor de tirosina cinasa de EGFR.
15. Una composición que comprende una cantidad inhibidora de la escisión sinérgica de Her-2 de un inhibidor de metaloproteinasa, en el que dicho inhibidor de metaloproteinasa inhibe la actividad de una ADAM, comprendiendo dicha composición además una cantidad inhibidora de la escisión sinérgica de Her-2 de un anticuerpo antagonista de Her-2, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
16. La composición de la reivindicación 15, en el que dicho MPI es (6S,7S)-7-[(hidroxiamino)carbonil]-6-[(4-fenilpiperazin-1-il)carbonil]-5-azaespiro[2.5]octano-5-carboxilato de metilo.
17. La composición de la reivindicación 15 ó 16, en el que dicho anticuerpo es trastuzumab.
18. La composición de la reivindicación 15, comprendiendo dicha composición además una cantidad eficaz de un agente citotóxico.
19. La composición de la reivindicación 18, en el que dicho agente citotóxico está seleccionado del grupo que consiste en paclitaxel y cisplatino.
20. Un kit para inhibir la escisión de Her-2, comprendiendo dicho kit una cantidad inhibidora de la escisión sinérgica de Her-2 de un inhibidor de metaloproteinasa, en el que dicho inhibidor de metaloproteinasa inhibe la actividad de una ADAM, comprendiendo dicho kit además una cantidad inhibidora de la escisión sinérgica de Her-2 de un anticuerpo antagonista de Her-2, y un aplicador y un material de instrucciones para el uso del mismo.
21. El kit de la reivindicación 20 en el que dicho MPI es (6S,7S)-7-[(hidroxiamino)carbonil]-6-[(4-fenilpiperazin-1-il)carbonil]-5-azaespiro[2.5]octano-5-carboxilato de metilo.

22. El kit de la reivindicación 20 ó 21, en el que dicho anticuerpo es trastuzumab.

23. The.kit de la reivindicación 22, comprendiendo dicho kit además una cantidad eficaz de un agente citotóxico.

FIGURA 1

Miembro humano familia ADAM	Codificación funcional ADAM	C Consennse secuencias para metaloproteinasa activa	Expresado en líneas de derramamiento celular HER2	Candidatos derrame HER2
ADAM1	-			
ADAM2	+			
ADAM3	-			
ADAM6	+			
ADAM7	+			
ADAM8	+	+	+	+
ADAM9	+	+	+	+
ADAM10	+	+	+	+
ADAM11	+			
ADAM12	+	+	-	+
ADAM15	+	+	+	+
ADAM17	+	+	+	-
ADAM18	+			
ADAM19	+	+	-	-
ADAM20	+/-	+	+	+/-
ADAM21	+	+	+	+
ADAM22	+			
ADAM23	+			
ADAM28	+	+	-	-
ADAM29	+			
ADAM30	+	+	-	-
ADAM32	+			
ADAM33	+	+	+	+

FIGURA 2

Geno	Secuencia cebador directo (5'-3')	Secuencia cebador reverso (5'-3')	Secuencia prueba (5'-3')
ADAM8	TGCTCCTCCGGTCACTGTG SEQ ID NO:9	TTGGCTTGATGACCTGCTTTG SEQ ID NO:21	CCGACCOCTTCCAGTTCTGTCTACAG SEQ ID NO:33
ADAM9	TGTCAAGTCATCTTTGGCTCAAA SEQ ID NO:10	AAATCTGTCACTTTAGAATTCACCTCA SEQ ID NO:22	CAAGGCTGCCCCAAAGATTGTTTC SEQ ID NO:34
ADAM10	TCCAAAGTTGCCTCCTCCTAAA SEQ ID NO:11	GGGCCGCTGACGCTG SEQ ID NO:23	AGACCTCCACAGCCGATTGAGCAACG SEQ ID NO:35
ADAM12	ATGAGGAAGCCGCCAGATT SEQ ID NO:12	CAACATTCTGACACTGCAGCAA SEQ ID NO:24	CTACCCACCGAAGGACAATCCCAGG SEQ ID NO:36
ADAM15	ACAGGCACTGCTACTGTGAGGA SEQ ID NO:13	CCAAGCATCACCAGGACCA SEQ ID NO:25	TCAAAGCAACCAGCTCCTGACCAC SEQ ID NO:37
ADAM17	GCATGGATTCTGCATCGGT SEQ ID NO:14	TGCAGGGGGCCTGG SEQ ID NO:26	AAACCOCTTCTCTGCGCCCCAGA SEQ ID NO:38
ADAM19	TCTCAAATAGAGAGGACGGAGTCGTCC SEQ ID NO:15	GGGAAACGATGCAATTTGGT SEQ ID NO:27	TCCAAGCCGGCCAATCCCC SEQ ID NO:39
ADAM20	TGCAAGGAGAAAGGCTATGGA SEQ ID NO:16	TTTCOCATCAGATTTAATCCTTCC SEQ ID NO:28	TAGTGCTGATAGTGGCCACCTCCTAAGAACA SEQ ID NO:40
ADAM21	AAGTGAAAGATGGTACTGTGTGTGG SEQ ID NO:17	CAGGTCTCAGGAAGGCAGACAT SEQ ID NO:29	CAGGAAAGATCTGCATCCATAAGAAGTGTGTCAG SEQ ID NO:41
ADAM28	GATGACTCCTCAGTGGTCTTCCA SEQ ID NO:18	GGTGCCGATTACCATAGCA SEQ ID NO:30	CTGTTCCCAATGGCGGTCAATTTTGT SEQ ID NO:42
ADAM30	CCATTTGTGGCCCAAGAGA SEQ ID NO:19	GCAGTTCCCATGTTCTGTGA SEQ ID NO:31	CTGTTGCCCGACATCTGCGC SEQ ID NO:43
ADAM33	CTCGCACCGCACATGGT SEQ ID NO:20	GCTCCCCGACAAGTCACTTC SEQ ID NO:32	ACTCTACCGTTACCTAGATGGCCA SEQ ID NO:44

FIGURA 3

Derramamiento	++++	+	++++	++	++
Anotación	BT474	SKOV3	SKBR3	MDA	T47D
ADAM8	+	+	+	+	+
ADAM9	+	+	+	+	+
ADAM10	+	+	+	+	+
ADAM12	+	+	+	-	-
ADAM15	+	+	+	+	+
ADAM17	+	+	+	+	+
ADAM19	+	+	+	-	+
ADAM20	+	+	+	+	+
ADAM21	+	+	+	+	+
ADAM28	-	+	-	+	-
ADAM30	-	-	-	-	-
ADAM33	+	+	+	+	+

FIGURA 4

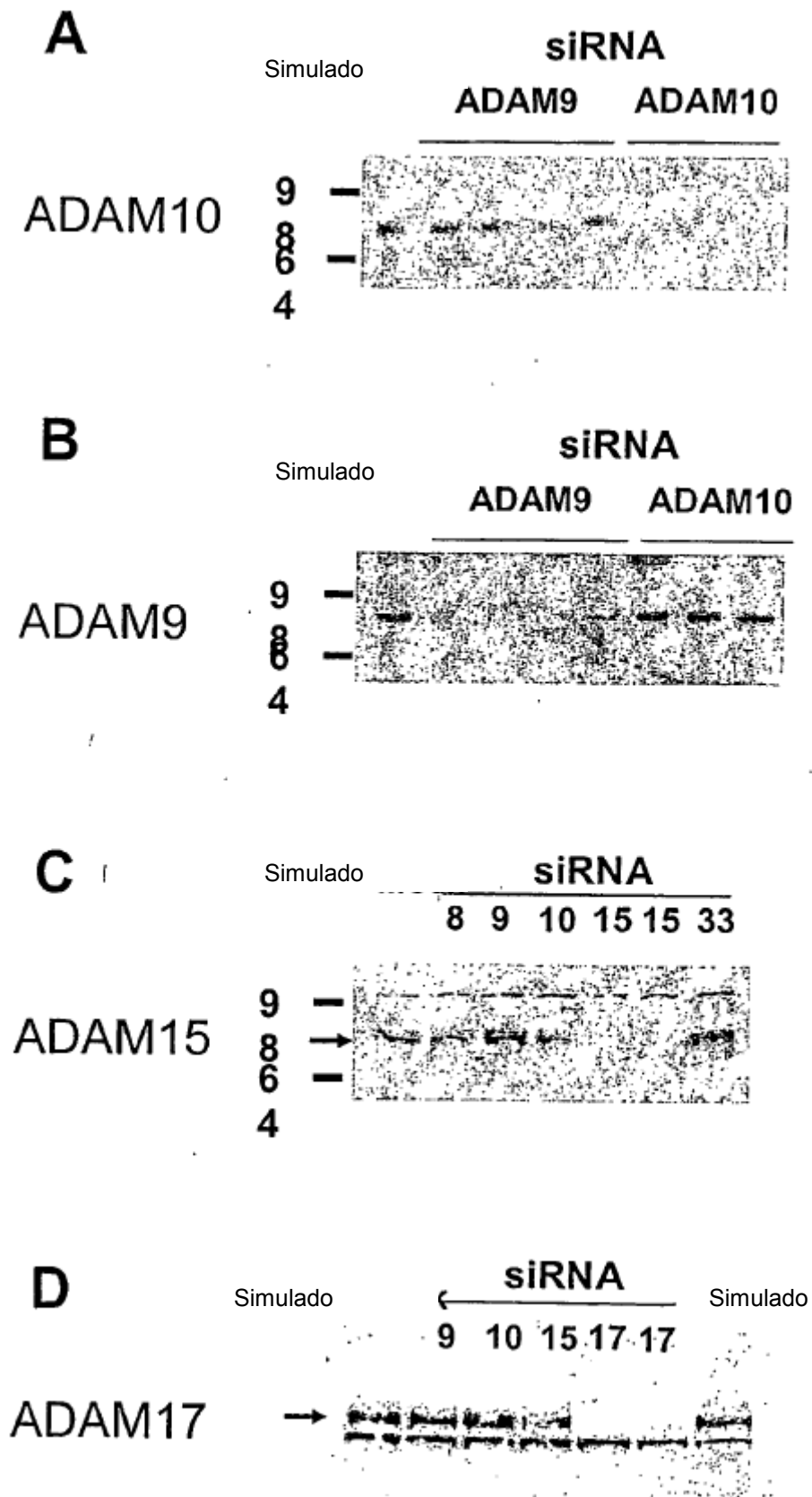
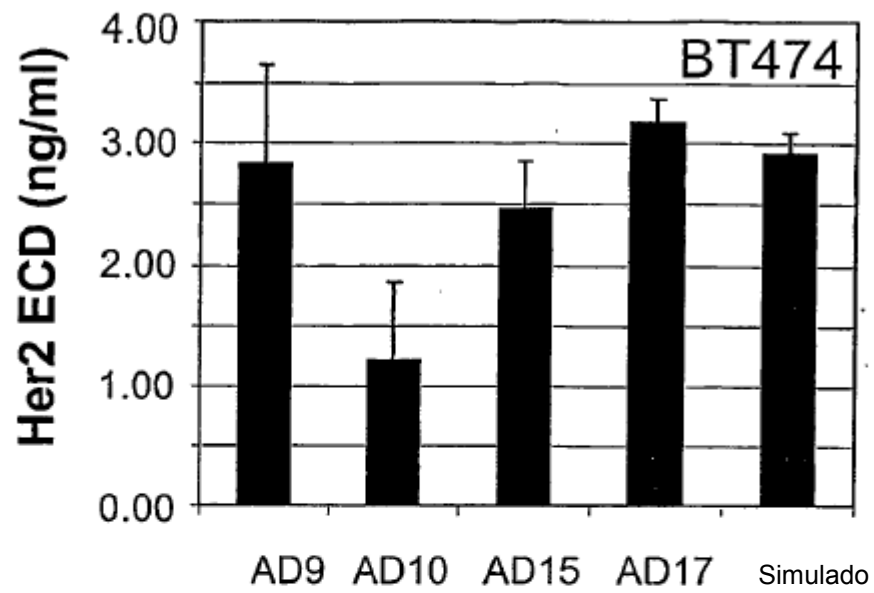


FIGURA 5

A



B

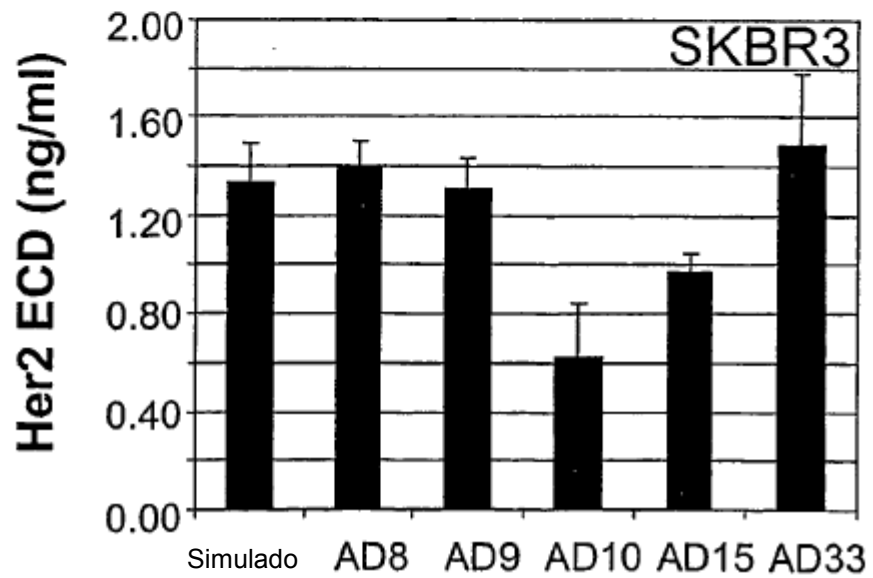


FIGURA 6

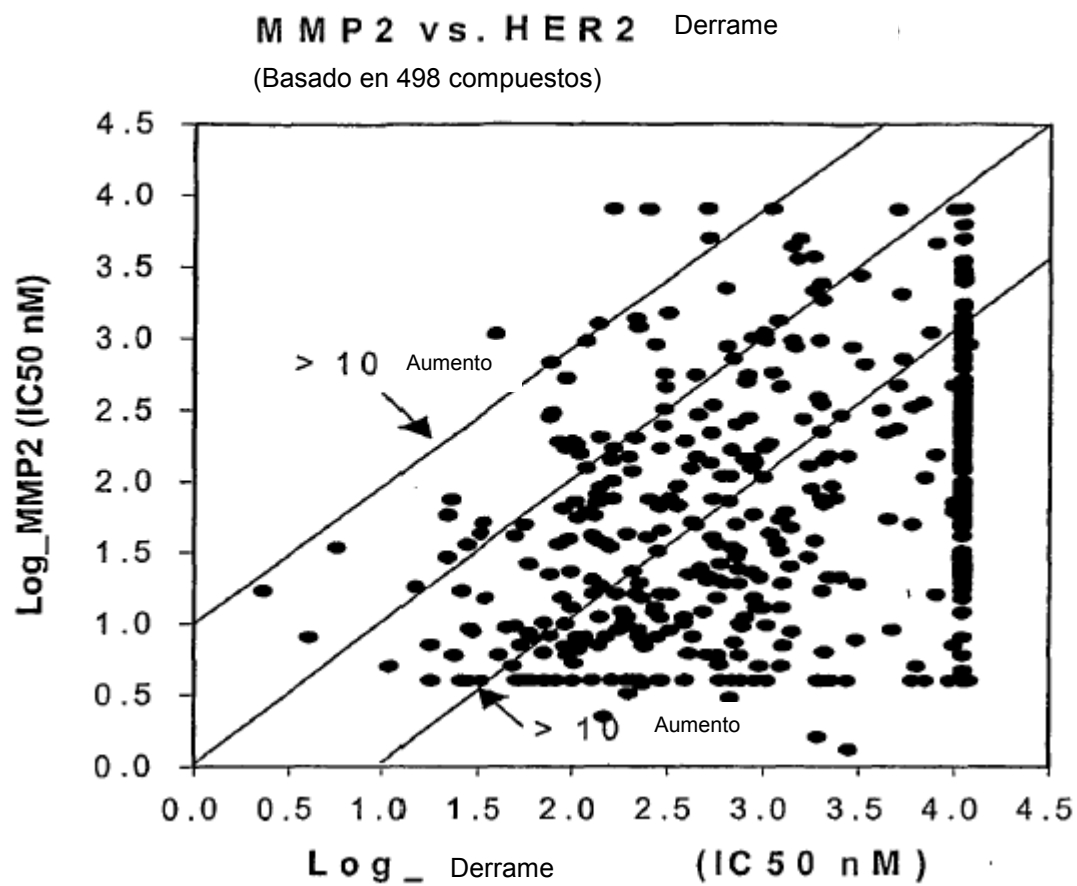


FIGURA 7

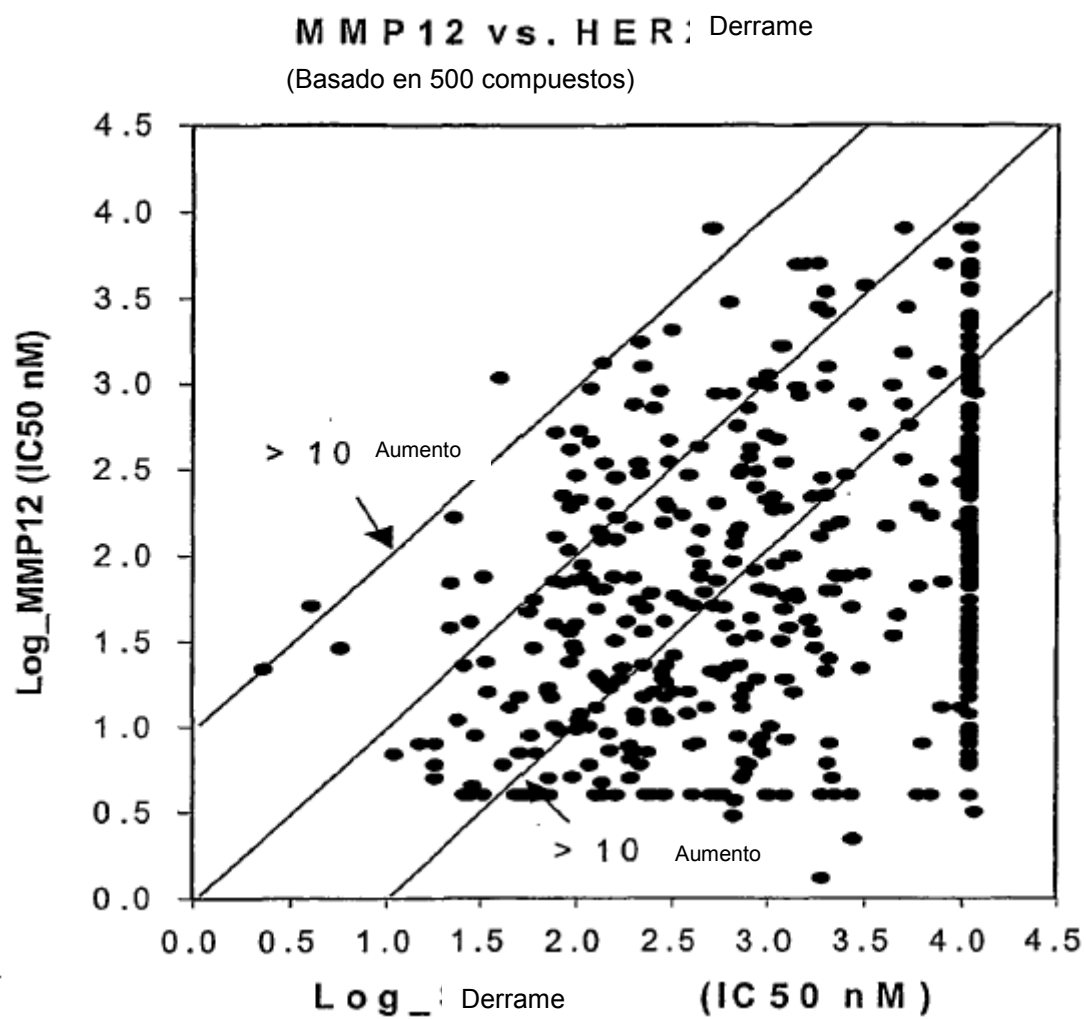


FIGURA 8

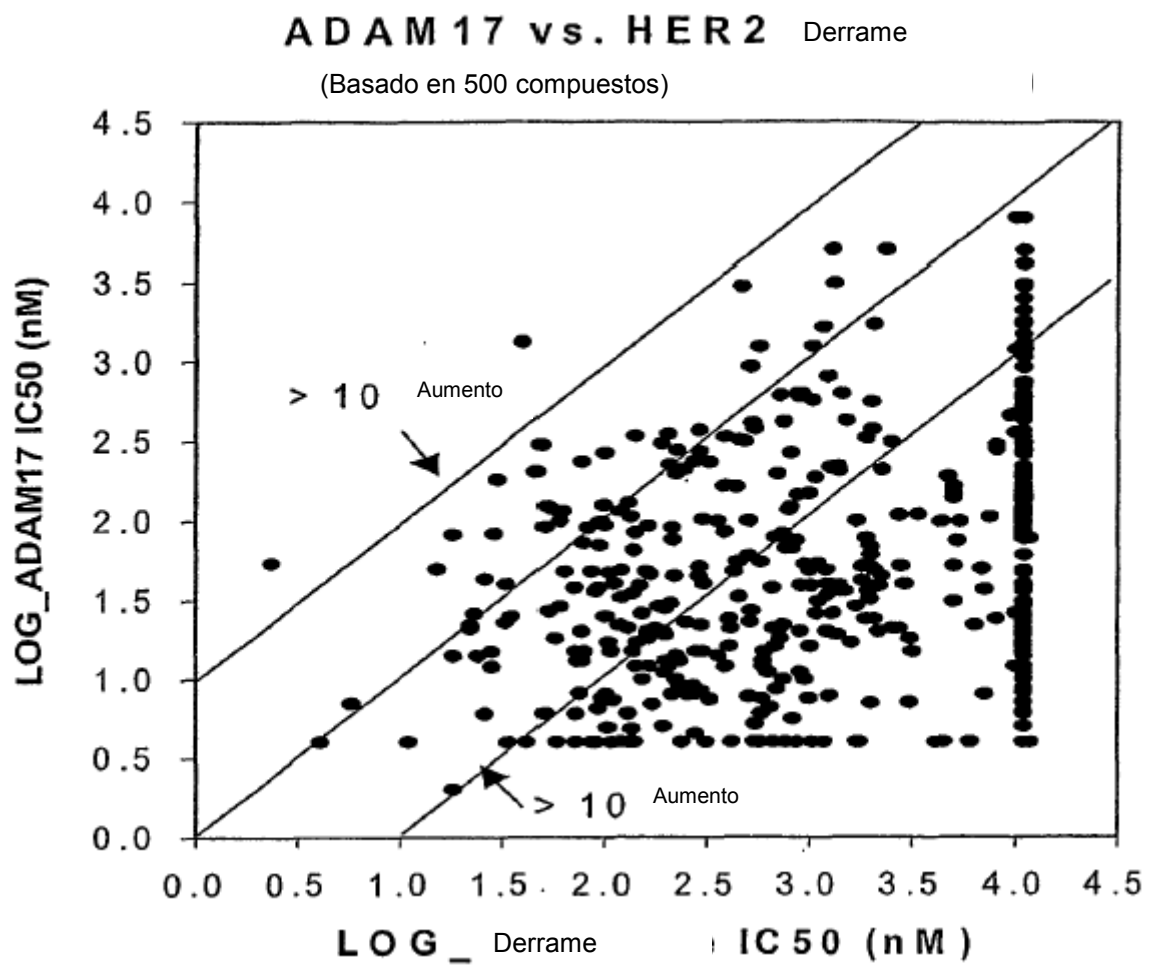


FIGURA 9

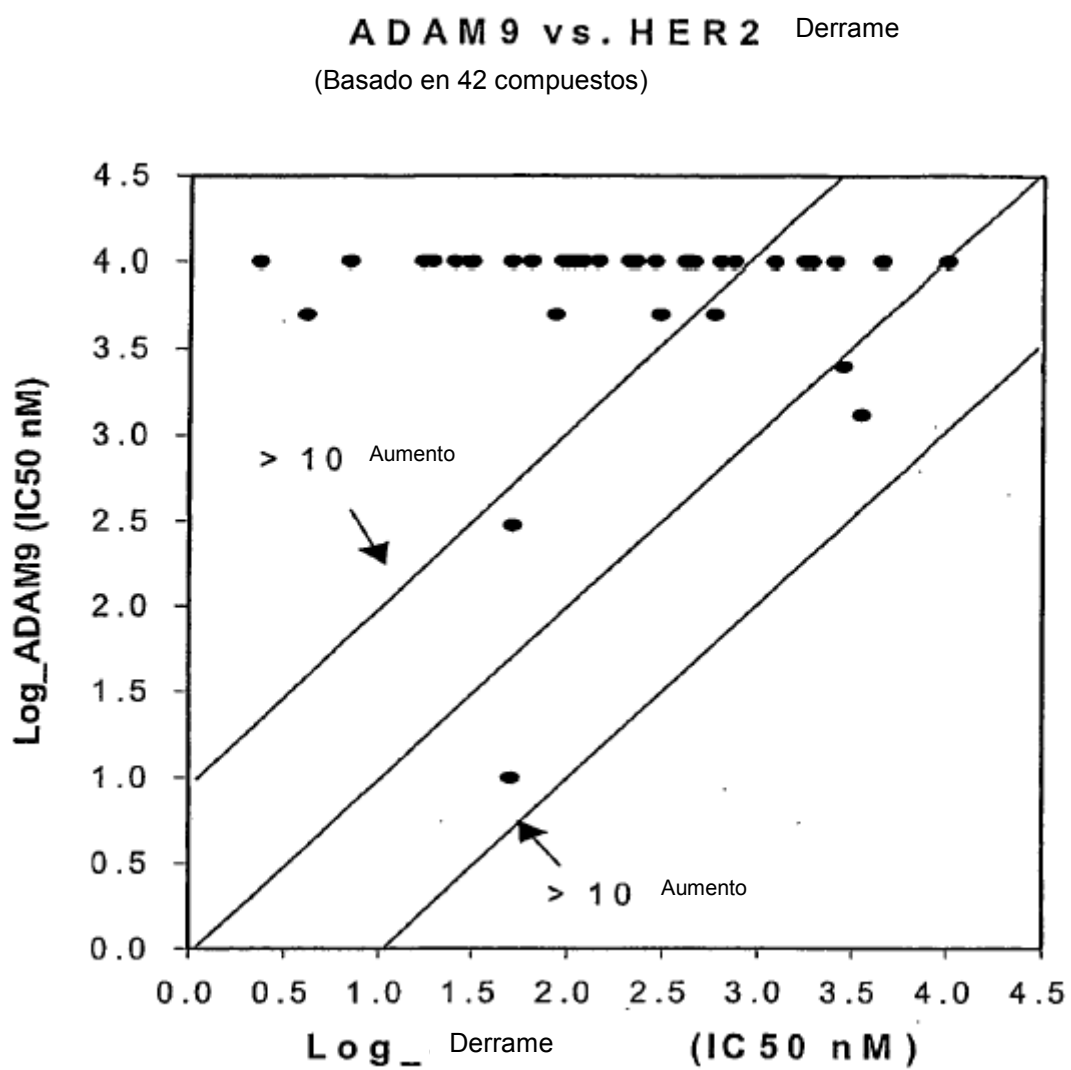


FIGURA 10

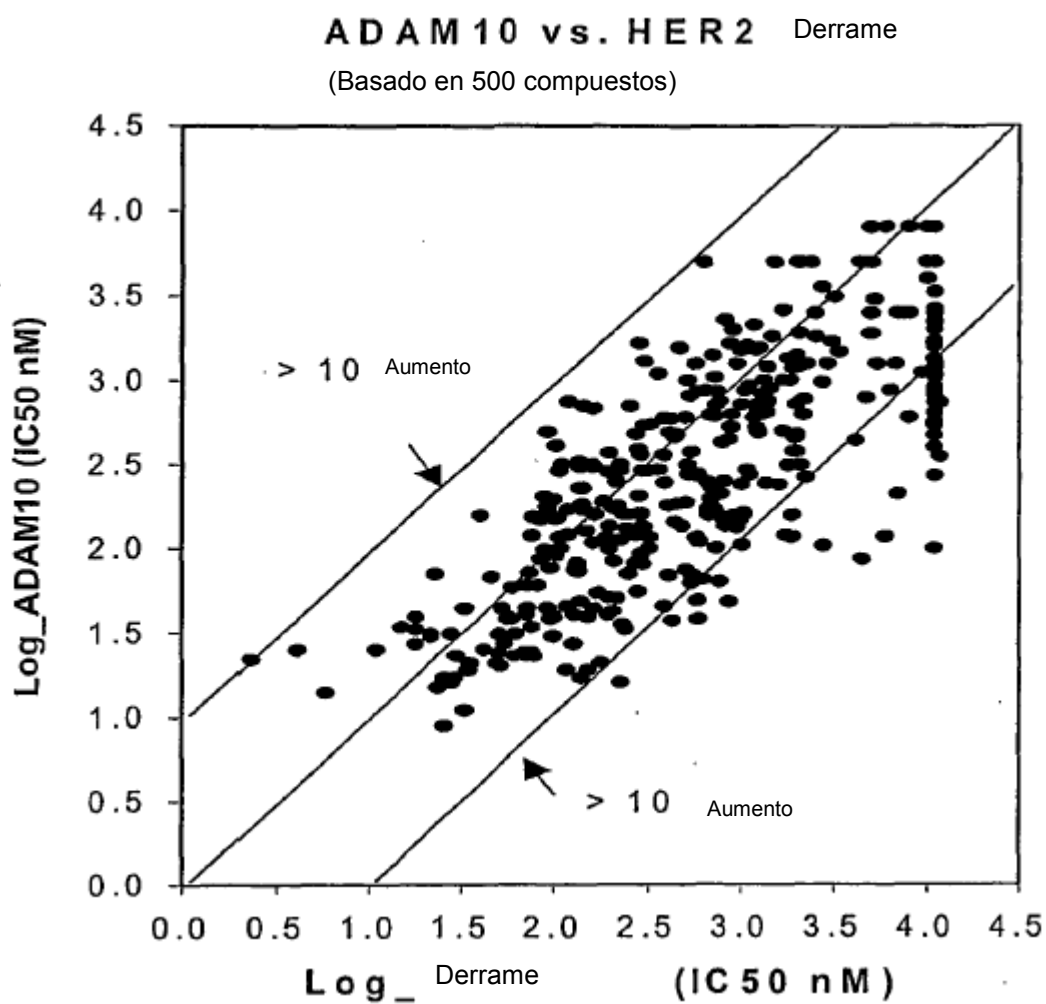


FIGURA 11

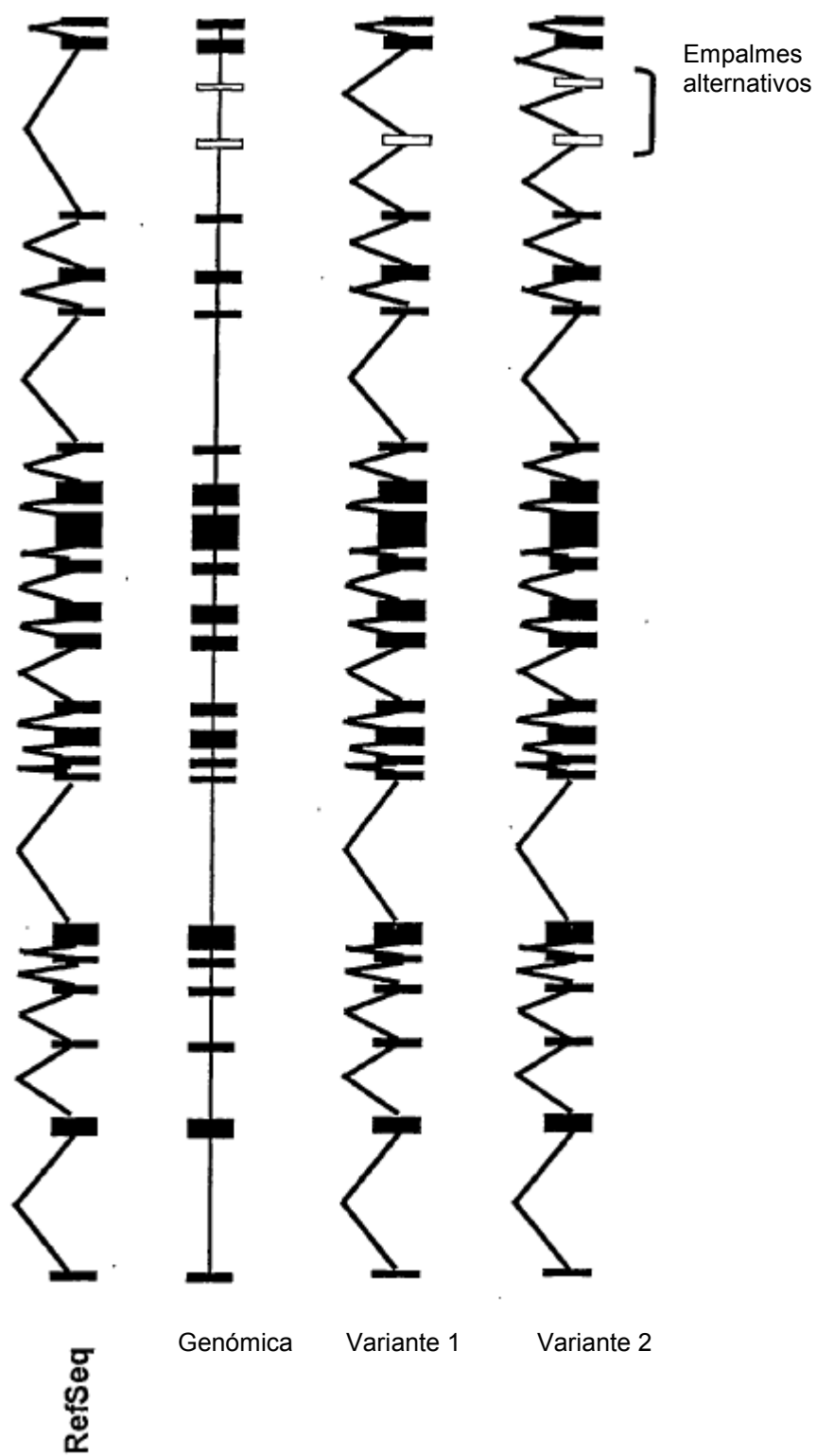


FIGURA 12A-1

ADAM10 Humano (SEQ ID NO:5)

GCGGCGGCAGGCCTAGCAGCACGGGAACCGTCCCCCG CGCGCATGCGCGCGCCCCCTGAAGCG
 CCTGGGGGACGGGTAGGGGCGGGAGGTAGGGGCGCGGCTCCGCGTGCCAGTTGGGTGCCCCG
 GCGTCACGTGGTGAGGAAGGAGGCGGAGGTCTGAGTTTCTGAAGGAGGGGGGGAGAGAAGAGG
 GAACGAGCAAGGGAAGGAAGCGGGGAAAGGAGGAAGGAAACGAACGAGGGGGAGGGAGGTC
 CCTGTTTTGGAGGAGCTAGGAGCGTTGCCGGCCCCCTGAAGTGGAG CGAGAGGGAGGTGCTTC
 GCCGTTTCTCCTGCCAGGGGAGGTCCCGGCTTCCCGTGGAGGCTCCGGACCAAGCCCCCTTCA
 GCTTCTCCCTCCGGATCGATGTGCTGCTGTTAACCCGTGAGGAGGCGGCGGCGGCGGCAGCG
 GCAGCGGAAGATGGTGT'TGCTGAGAGTGTTAATTC'TGCTCCTCTCCTGGGCGGCGGGGATGG
 GAGGTCAGTATGGGAATCCTTTAAATAAATATATCAGACATTATGAAAGGATTA TCTTACAAT
 GTGGATTCAATACACCAAAAACACCAGCGTGCCAAAAGAGCAGTCTCACATGAAGACCAATT
 TTTACGTCTAGATTTCCATGCCCATGGAAGACATTTCAACCTACGAATGAAGAGGGACACTT
 CCCTTTTCAGTGATGAATTTAAAGTAGAAAACATCAAATAAAGTACTTGATTATGATACCTCT
 CATATTTACACTGGACATATTTATGGTGAAGAAGGAAGTTTTAGCCATGGGTCTGTTATTG A
 TGGAAGATTTGAAGGATTCATCCAGACTCGTGGTGGCACATTTTATGTTGAGCCAGCAGAGA
 GATATATTAAGACCGAACTCTGCCATTTCACTCTGTCAATTTATCATGAAGATGATATTAAC
 TATCCCATAAATACGGTCCTCAGGGGGGCTGTGCAGATCATTCAGTATTTGAAAGAATGAG
 GAAATACCAGATGACTGGTGTAGAGGAAGTAACACAGATACCTCAAGAAGAACATGCTGCTA
 ATGGTCCAGAACTTCTGAGGAAAAAACGTACAACCTCAGCTGAAAAAATACTTGTGAGCTT
 TATATTCAGACTGATCATTTGTTCTTTAAATATTACGGAACACGAGAAGCTGTGATTGCCCA
 GATATCCAGTCATGTTAAAGCGATTGATACAATTTACCAGACCACAGACTTCTCCGGAATCC
 GTAACATCAGTTTCATGGTGAAACGCATAAGAATCAATACAACCTGCTGATGAGAAGGACCTT
 ACAAATCCTTTCCGTTTCCCAAATATTGGTGTGGAGAAGTTTCTGGAATTGAATTCTGAGCA
 GAATCATGATGACTACTGTTTGGCCTATGTCTT'CACAGACCGAGATTTTGATGATGGCGTAC
 TTGGTCTGGCTTGGGTGGAGCACCTTCAGGAAGCTCTGGAGGAATATGTGAAAAAAGTAAA
 CTCTATT'CAATGGTAAGAAGAAGTCCTTAAACACTGGAATTATTACTGTT'CAAGACTATGG
 GTCTCATGTACCTCCCAAAGTCT CTACATTACTTTTGCTCACGAAGTTGGACATAACTTTG
 GATCCCCACATGATTCTGGAACAGAGTGACACACAGGAGAACTTAAGAATTTGGGTCAAAAA
 GAAAATGGCAATTACATCATGTATGCAAGAGCAACATCTGGGGACAACTTAACAACAATAA
 ATTCTCACTCTGTAGTATTAGAAATATAAGCCAAGTTCTTGAGAAGAAGAGAAACAACCTGTT
 TTGTTGAATCTGGCCAACCTATTTGTGGAATGGAATGGTAGAACAAAGGTGAAGAATGTGAT
 TGTGGCTATAGTGACCAAGTGTAAGATGAATGCTGCTTCGATGCAAAATCAACCAGAGGGAAG
 AAAATGCAAACTGAAACCTGGGAAACAGTGACAGTCCAAGTCAAGGTCCCTTGTGTACAGCAC
 AGTGTGCATTCAAGTCAAAGTCTGAGAAGTGTGCGGATGATT'CAAGTGTGCAAGGGAAGGA
 ATATGTAATGGCTTCACAGCTCTCTGCCAGCATCTGAC CCTAAACCAAACCTTC

FIGURA 12A-2

ACAGACTGTAATAGGCATACACAAGTGTGCATTAATGGGCAATGTGCAGGTTCTATCTGTGA
 GAAATATGGCTTAGAGGAGTGTACGTGTGCCAGTTCTGATGGCAAAGATGATAAAGAATTAT
 GCCATGTATGCTGTATGAAGAAAATGGACCCATCAACTTGTGCCAGTACAGGGTCTGTGCAG
 TGGAGTAGGCACCTTCAGTGGTCGAACCATCACCTT GCAACCTGGATCCCCCTTGCAACGATTT
 TAGAGGTTACTGTGATGTTTTTCATGCGGTGCAGATTAGTAGATGCTGATGGTCCTCTAGCTA
 GGCTTAAAAAAGCAATTTTTAGTCCAGAGCTCTATGAAAACATTGCTGAATGGATTGTGGCT
 CATTGGTGGGCAGTATTACTTATGGGAATTGCTCTGATCATGCTAATGGCTGGATTATTAA
 GATATGCAGTGTTCATACTCCAAGTAGTAATCCAAAGTTGCCT CCTCCTAAACCACTTCCAG
 GCACTTTAAAGAGGAGGAGACCTCCACAGCCCATTGAGCAACCCAGCGTCAGCGGCCCCGA
 GAGAGTTATCAAATGGGACACATGAGACGCTAACTGCAGCTTTTGCCTTGGTTCTTCCTAGT
 GCCTACAATGGGAAAACCTCACTCCAAGAGAAACCTATTAAGTCATCATCTCCAAACTAAA
 CCCTCACAAGTAACAGTTGAAGAAAAAATGGCAAGAGATCATATCCTCAGA CCAGGTGGAAT
 TACTTAAATTTTAAAGCCTGAAAATTCCAATTTGGGGGTGGGAGGTGGAAAAGGAACCCAAT
 TTTCTTATGAACAGATATTTTTAACTTAATGGCACAAAGTCTTAGAATATTATTATGTGCCC
 CGTGTTCCCTGTTCTTCGTTGCTGCATTTTCTTCACTTGCAGGCAAACCTTGGCTCTCAATAA
 ACTTTTACCACAAATTGAAATAAATATATTTTTTTCAACTGCCAATCAAGGCTAGGAGG CTC
 GACCACCTCAACATTGGAGACATCACTTGCCAATGTACATACCTTGTTATATGCAGACATGT
 ATTTCTTACGTACACTGTACTTCTGTGTGCAATTGTAAACAGAAATTGCAATATGGATGTTT
 CTTTGTATTATAAAATTTTTCCGCTCTTAATTAAAAATTACTGTTTAATTGACATACTCAGG
 ATAACAGAGAATGGTGGTATTTCAGTGGTCCAGGATTCTGTAATGCTTTACACAGGCAGTTTT
 GAAATGAAAATCAATTTACC

FIGURA 12B

ADAM10 Péptido

(SEQ ID NO:6)

MVLLRVLILLLSWAAGMGGQYGNPLNKYIRHYEGLSYNVDSLHQKHQRAKRAVSHEDQFLRL
DFHAHGRHFNLRMKRDTSLFSDEFKVVETSNKVLDDYDTSHIYTGHIYGEESFSGHGSVIDGRF
EGFIQTRGGTFYVEPAERYIKDRTLPPHFSVIYHEDDINYPHKYGPQGGCADHSVFERRMRKYQ
MTGVVEVTQIPQEEHAANGPELLRKKRTTSAEKNTCQLYIQTDLHFFKYYGTREAVIAQISS
HVKAIDTIYQTTDFSGIRNISFMVKRIRINTTADKDPNPFRRPNIGVEKFLELNSEQNHD
DYCLAYVFTDRDFDDGVLGLAWVGAPSGSSGGICEKSKLYSDGKKKSLNTGIIITVQNYGSHV
PPKVSHITFAHEVGHNFSGPHDSGTECTPGESKNLGQKENGNYIMYARATSGDKLNNNKFSL
CSIRNISQVLEKKRNCFVESGQPICGNGMVEQGEEDCGYSDQCKDECCFDANQPEGRKCK
LKPGKQCSPSQGPCCTAQCAFKSKSEKCRDDSDCAREGICNGFTALCPASDPKPNFTDCNRH
TQVCINGQCAGSICEKYGLEECTCASSDGKDDKELCHVCCMKKMDPSTCASTGSGVQWSRHFS
GRTITLQPGSPCNDFRGYCDVFMRCRLVDADGPLARLKKAIFSPELYENIAEWIVAHWWAVL
LMGIALIMLMAGFIKICSVHTPSSNPKLPPPKPLPGTLKRRRPPQPIQQPQRQRPRESYQMG
HMRR

FIGURA 13A-1

ADAM15 Humano Variante 1

(SEQ ID NO:1)

(la más abundante en las líneas celulares examinadas)

CCGAGGCGACCTGGCCGCGGCGCTCCTCCGCGCGCTGTTCCGCACTTGCTGCCCTCGCCC
GGCCCGGAGCGCCGCTGCCATGCGGCTGGCGCTGCTCTGGGCCCCTGGGGCTC CTGGGCGCGG
GCAGCCCTCTGCCCTTCTGGCCGCTCCCAAATATAGGTGGCACTGAGGAGCAGCAGGCAGAG
TCAGAGAAGGCCCGAGGGAGCCCTTGGAGCCCCAGGTCTTTCAGGACGATCTCCCAATTAG
CCTCAAAAAGGTGCTTCAGACCAGTCTGCCTGAGCCCCTGAGGATCAAGTTGGAGCTGGACG
GTGACAGTCATATCCTGGAGCTGCTACAGAATAGGGAGTTGGTCCCAGGCCGCCCAACCC TG
GTGTGGTACCAGCCCGATGGCACTCGGGTGGTCAGTGAGGGACACACTTTGGAGAACTGCTG
CTACCAGGGAAGAGTGCAGGGGATATGCAGGCTCCTGGGTGTCCATCTGCACCTGCTCTGGGC
TCAGAGGCTTGGTGGTCTTGACCCAGAGAGAAGCTATACCTTGAGCAGGGGGCTGGGGAC
CTTCAGGGTCTCCCATTTATTTTCGCGAATCCAAGATCTCCACCTGCCAGGCCACACCTGTGC
CCTGAGCTGGCGGGAATCTGTACACACTCAGACGCCACCAGAGCACCCCTGGGACAGCGCC
ACATTCGCCCGAGGGCGGGATGTGGTAACAGAGACCAAGACTGTGGAGTTGGTGATTGTGGCT
GATCACTCGGAGGCCCAGAAATACCGGGACTTCCAGCACCTGCTAAACCGCACACTGGAAGT
GGCCCTCTTGCTGGACACATTTCTTCGGCCCCCTGAATGTACGAGTGGCACTAGTGGGCCTGG
AGGCCTGGACCCAG CGTGACCTGGTGGAGATCAGCCCAAACCCAGCTGTCAACCTCGAAAAC
TTCTCCACTGGCGCAGGGCACATTTGCTGCCTCGATTGCCCCATGACAGTGCCAGCTGGT
GACTGGTACTTCATTTCTCTGGGCCTACGGTGGGCATGGCCATTGAGAACTCCATCTGTTCTC
CTGACTTCTCAGGAGGTGTGAACATGGACCACTCCACCAGCATCCTGGGAGTCGCCTCCTCC
ATAGCCCATGAGTTGGGCCACAGCCTGGGCCTGGACCATGATTTGCCTGGGAATAGCTGCCC
CTGTCCAGGTCCAGCCCCAGCCAAGACCTGCATCATGGAGGCCTCCACAGACTTCCTACCAG
GCCTGAACTTCAGCAACTGCAGCCGACGGGCCCTGGAGAAAGCCCTCCTGGATGGAATGGGC
AGCTGCCTCTTCGAACGGCTGCCTAGCCTACCCCTATGGCTGCTTTCTGCGGAAATATGTT
TGTGGAGCCGGGCGAGCAGTGTGACTGTGG CTTCTCTGGATGACTGCGTCGATCCCTGCTGTG
ATTCTTTGACCTGCCAGCTGAGGCCAGGTGCACAGTGTGCATCTGACGGACCCTGTTGTCAA
AATTGCCAGCTGCGCCCGTCTGGCTGGCAGTGTGCTCCTACCAGAGGGGATTGTGACTTGCC
TGAATTCTGCCAGGAGACAGCTCCAGTGTCCCCCTGATGTGAGCCTAGGGGATGGCGAGC
CCTGCGCTGGCGGGCAAGCTGTGTGCATGCACGGGCGT TGTGCCTCCTATGCCAGCAGTGC
CAGTCACTTTGGGGACCTGGAGCCCAGCCGCTGCGCCACTTTGCCTCCAGACAGCTAATAC
TCGGGGAAATGCTTTTGGGAGCTGTGGGCGCAACCCAGTGGCAGTTATGTGTCTGCACCC
CTAGAGATGCCATTTGTGGGCAGCTCCAGTGCCAGACAGGTAGGACCCAGCCTCTGCTGGGC

FIGURA 13A-2

TCCATCCGGGATCTACTCTGGGAGACAA TAGATGTGAATGGGACTGAGCTGAACTGCAGCTG
GGTGACCTGGACCTGGGCAGTGATGTGGCCCAGCCCCTCCTGACTCTGCCTGGCACAGCCT
GTGGCCCTGGCCTGGTGTGTATAGACCATCGATGCCAGCGTGTGGATCTCCTGGGGGCACAG
GAATGTCGAAGCAAATGCCATGGACATGGGGTCTGTGACAGCAACAGGCACTGCTACTGTGA
GGAGGGCTGGGCACCCCCTGACTGCACCACTCAGCT CAAAGCAACCAGCTCCCTGACCACAG
GGCTGCTCCTCAGCCTCCTGGTCTTATTGGTCCTGGTGATGCTTGGTGCCAGCTACTGGTAC
CGTGCCCGCCTGCACCAGCGACTCTGCCAGCTCAAGGGACCCACCTGCCAGTACAGGGCAGC
CCAATCTGGTCCCTCTGAACGGCCAGGACCTCCGCAGAGGGCCCTGCTGGCACGAGGCACTA
AGGCTAGTGCTCTCAGCTTCCCGGCCCCCCTTCCAGGCCGCTG CCGCCTGACCCTGTGTCC
AAGAGACTCCAGTCTCAGGGGCCAGCCAAGCCCCACCCCCAAGGAAGCCACTGCCTGCCGA
CCCCCAGGGCCGGTGCCCATCGGGTGACCTGCCCGGCCAGGGGCTGGAATCCCGCCCCTAG
TGGTACCCTCCAGACCAGCGCCACCGCCTCCGACAGTGTCTCGCTCTACCTCTGACCTCTC
CGGAGGTTCGCTGCCTCCAAGCCGACTTAGGGCTTCAAGAGGCGGGCGTG CCCTCTGGAG
TCCCCTACCATGACTGAAGGCGCCAGAGACTGGCGGTGTCTTAAGACTCCGGGCACCGCCAC
GCGCTGTCAAGCAACACTCTGCGGACCTGCCGGCGTAGTTGCAGCGGGGGCTTGGGGAGGGG
CTGGGGGTGGACGGGATTGAGGAAGGTCCGCACAGCCTGTCTCTGCTCAGTTGCAATAAAC
GTGACATCTTGG

FIGURA 13B

ADAM15 Humano Variante 1 péptido

(SEQ ID NO:2)

MRLALLWALGLLGAGSPLPSWPLPNIGGTEEQQAESKAPREPLEPQVLQDDLPISLKKVLQ
TSLPEPLRIKLELDGDHILELLQNRELVPGRPTLVWYQPDGTRVVSEGHTLENCYQGRVR
GYAGSWVSICTCSGLRGLVVLTPERSYTLQGPGLQGPPIISRIQDLHLPGHTCALSWRES
VHTQTPPEHPLGQRHIRRRRDVVTETKTVELVIVADHSEAQKYRDFQHLLNRTL EVALLLDT
FFRPLNVRVALVGLAWTQORDLVEISPNPAVTLENFLHWRRRAHLLPRLPHDSAQLVTGTSFS
GPTVGMAIQNSICSPDFSGGVNMDHSTSLGVASSIAHELGHSLGLDHDLPGNPCPCPGPAP
AKTCIMEASTDFLPGLNFSNCSRRRALEKALLDGMGSCLEFERLPSPMAAFCGNMFVEPGEQ
CDCGFLDDCVDPCDSLTCQLRPGAQCADGPGCCQNCQLRPSGWQCRPTRGDCDLPEFCPGD
SSQCPDVS LGDGEPCAGGQAVCMHGRCASYAQCCQSLWGPGAQPAAPLCLQTANTRGNAFG
SCGRNPSGSYVSCTPRDAICGQLQCQTGRTOPLLGSIRDLLWETIDVNGTELNCSWVHLLDLG
SDVAQPLLTLPGTACGPGLVCIDHRCQRVDLLGAQECSRKCHGHGVCDNHRHCYCEEGWAPP
DCTTQLKATSSLTGLLLSLLVLLVLMVGASYWYRARLHQRLCQLKGPTCQYRAAQSGPSE
RPGPPQRALLARGTKASALSFPAPPSRPLPPDPVSKRLQSQGPAPPPPRKPLPADPQGRCP
SGDLPGPGAGIPPLVVPSRPAPPPPTVSSLYL

FIGURA 14A-1

ADAM15 Humano Variante 2 (forma más larga)

(SEQ ID NO:3)

CCGAGGCGACCTGGCCGCGCGCGCTCCTCCGCGCGCTGTTCCGCACTTGCTGCCCTCGCCC
GGCCCGGAGCGCCGCTGCCATGCGGCTGGCGCTGCTCTG GGCCCTGGGGCTCCTGGGCGCGG
GCAGCCCTCTGCCTTCCTGGCCGCTCCCAAATATAGGTGGCACTGAGGAGCAGCAGGCAGAG
TCAGAGAAGGCCCCGAGGGAGCCCTTGGAGCCCAGGTCCCTCAGGACGATCTCCAATTAG
CCTCAAAAAGGTGCTTCAGACCAGTCTGCCTGAGCCCTGAGGATCAAGTTGGAGCTGGACG
GTGACAGTCATATCCTGGAGCTGCTACAGAATAGGGAGTTGGTCCCA GGCCGCCCAACCCTG
GTGTGGTACCAGCCCGATGGCACTCGGGTGGTCAGTGAGGGACACACTTTGGAGAACTGCTG
CTACCAGGGAAGAGTGCGGGGATATG CAGGCTCCTGGGTGTCCATCTGCACCTGCTCTGGGC
TCAGAGGCTTGGTGGTCTTGACCCAGAGAGAAGCTATACCCTGGAGCAGGGGCTGGGGAC
CTTCAGGGTCTCCCATTTATTTTCGCGAATCCAAGATCTCCACCTGCCAGGCCACA CCTGTGC
CCTGAGCTGGCGGGAATCTGTACACACTCAGACGCCACCAGAGCACCCCCTGGGACAGCGCC
ACATTGCGCCGAGGCGGGATGTGGTAACAGAGACCAAGACTGTGGAGTTGGTGATTGTGGCT
GATCACTCGGAGGCCAGAAATACCGGGACTTCAGCACCTGCTAAACCGCACACTGGAAGT
GGCCCTCTTGCTGGACACATTCTTCGCGCCCTGAATGTACGAGTGGCACTAGTGGGCCTGG
AGGCCTGGACCCAGCGTGACCTGGTGGAGATCAGCCCAAACCCAGCTGTACCCCTCGAAAAC
TTCCTCCACTGGCGCAGGGCACATTTGCTGCCTCGATTGCCCCATGACAGTGCCAGCTGGT
GACTGGTACTTCATTCTCTGGGCCTACGGTGGGCATGGCCATTCAGAACTCCATCTGTTCTC
CTGACTTCTCAGGAGGTGTGAACATGGACCACTCCACCAGCATCCTGGGAGTCGCCTCCTCC
ATAGCCCATGAGTTGGGCCACAGCCTGGGCCTGGACCATGATTTCCTGGGAATAGCTGCCC
CTGTCCAGGTCCAGCCCCAGCCAAGACCTGCATCATGGAGGCCTCCACAGACTTCCTACCAG
GCCTGAACTTCAGCAACTGCAGCCGACGGGCCCTGGAGAAAGCCCTCCTGGATGGAATGGGC
AGCTGCCTCTTCGAACGGCTGCCTAGCCTACCCCTATGGCTGCTTTCTGCGGAAATATGTT
TGTGGAGCCGGGCGAGCAGTGTGACTGTGGCTTCCTGGATGACTGCGTCGATCCCTGCTGTG
ATTCTTTGACCTGCCAGCTGAGGCCAGGTGCACAGTGTGCATCTGACGGACCCTGTTGTCAA
AATTGCCAGCTGCGCCCGTCTGGCTGGCAGTGTGTCCTACCAGAGGGGATTGTGACTTGCC
TGAATTCTGCCCAGGAGACAGCTCCCAGTGTCCCCCTGATGTCAGCCTAGGGGATGGCGAGC
CCTGCGCTGGCGGGCAAGCTGTGTG CATGCACGGGCGTTGTGCCTCCTATGCCAGCAGTGC
CAGTCACTTTGGGGACCTGGAGCCCAGCCGCTGCGCCACTTTGCCTCCAGACAGCTAATAC
TCGGGGAAATGCTTTTGGGAGCTGTGGGCGCAACCCAGTGGCAGTTATGTGTCCTGCACCC
CT

FIGURA 14A-2

AGAGATGCCATTTGTGGGCAGCTCCAGTGCCAGACAGGTAGGACCCAGCCTCTGCTGGGCTC
 CATCCGGGATCTACTCTGGGAGACAATAGATGTGAATGGGACTGAGCTGAACTGCAGCTGGG
 TGCACCTGGACCTGGGCAGTGATGTGGCCCAGCCCCCTCCTGACTCTGCCTGGCACAGCCTGT
 GGCCCTGGCCTGGTGTGTATAGACCATCGATGCCAGCGTGTGGATCTCCTGGGGGCACAGGA
 ATGTCTGAAGCAAATGCCATGGACATGGGGTCTGTGACAGCAACAGGCACTGCTACTGTGAGG
 AGGGCTGGGCACCCCCCTGACTGCACCACTCAGCTCAAAGCAACCAGCTCCCTGACCACAGGG
 CTGCTCCTCAGCCTCCTGGTCTTATTGGTCCTGGTGATGCTTGGTGCCAGCTACTGGTACCG
 TGCCCGCCTGCACCAGCGACTCTGCCAGCTCAAGGGACCCACCTGCCAGTACAGGGCAGCCC
 AATCTGGTCCCTCTGAACGGCCAGGACCTCCGCAGAGGGCCCTGCTGGCACGAGGCACTAAG
 GCTAGTGCTCTCAGCTTCCCGGCCCCCCCC TTCCAGGCCGCTGCCGCCTGACCCTGTGTCCAA
 GAGACTCCAGGCTGAGCTGGCTGACCGACCCAATCCCCCTACCCGCCCTCTGCCCGCTGACC
 CGGTGGTGAGAAGCCCCGAAGTCTCAGGGGCCAGCCAAGCCCCCACCCTCAAGGAAGCCACTG
 CCTGCCGACCCCCAGGGCCGGTGCCCATCGGGTGACCTGCCCGGCCAGGGGCTGGAATCCC
 GCCCCTAGTGGTACCCTCCAGACCAGCGCCACCGCCT CCGACAGTGTCTCTCGCTCTACCTCT
 GACCTCTCCGGAGGTTCGCTGCCTCCAAGCCGGACTTAGGGCTTCAAGAGGCGGGCGTGCC
 CTCTGGAGTCCCCCTACCATGACTGAAGGCGCCAGAGACTGGCGGTGTCTTAAGACTCCGGGC
 ACCGCCACGCGCTGTCAAGCAACACTCTGCGGACCTGCCGGCGTAGTTGCAGCGGGGGCTTG
 GGGAGGGGCTGGGGGTTGGACGGGATTGAGGAAGGTCCGCACAGC CTGTCTCTGCTCAGTTG
 CAATAAACGTGACATCTTGG

FIGURA 14B

ADAM15 Humano Variante 2 péptido

(SEQ ID NO:4)

MRLALLWALGLLGAGSPLPSWPLPNIGGTEEQQAESKAPREPLEPQVLQDDLPISLKKVLQ
TSLPEPLRIKLELDGDSHILELLQNRELVPGRPTLVWYQPDGTRVVSEGHTLENCYQGRVR
GYAGSWVSICTCSGLRGLVLTPEPSTLEQ GPGDLQGPPIISRIQDLHLPGHTCALSWRES
VHTQTPPEHPLGQRHIRRRRDVVTETKTVELVIVADHSEAQKYRDFQHLLNRTLEVALLLDT
FFRPLNVRVALVGLAWTQRDLEISPNPAVTLENFLHWRRAHLLPRLPHDSAQLVTGTSFS
GPTVGMAIQNSICSPDFSGGVNMDHSTSLGVASSIAHELGHSLGLDHLPGNSCPCPGPAP
AKTCIMEASTDFLPGLNFSNCSRRRALEKALLDGMGSCLE ERLPSLPPMAAFCGNMFVEPGEQ
CDCGFLDDCVDPCDSTLCQLRPGAQCASDGPCQNCQLRPSGWQCRPTRGDCDLPEFCPGD
SSQCPPDVSLGDGEPACAGGQAVCMHGRCA SYAQQCQSLWGPGAQPAAPLCLQTANTRGNAGF
SCGRNPSGSYVSCTPRDAICGQLQCQTGRTQPLLGSIRDLLWETIDVNGTELNCSWVHLDLG
SDVAQPLLTLPGTACGPGLVLCIDHRCQRVDLLGAQECSRKCHGHGVC DSNRHCYCEEGWAPP
DCTTQLKATSSLTTGLLLSLLVLLVLMGASYWYRARLHQRLCQLKGPTCQYRAAQSGPSE
RPGPPQRALLARGTKASALSFPAPPSRPLPPDPVSKRLQAEADRPNPPTPLPADPVVRSP
KSQGPAPPPPRKPLPADPQGRCPSGDLPGPGAGIPPLVVPSRPAPPPPTVSSLYL

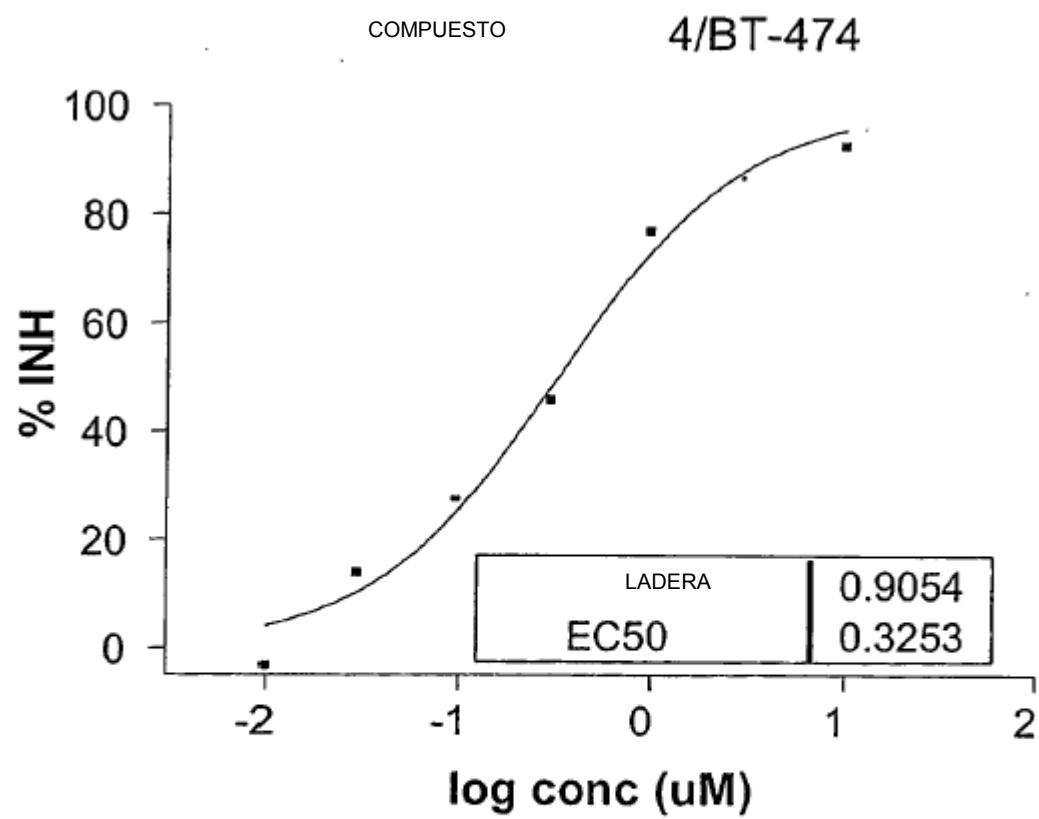


FIG. 15

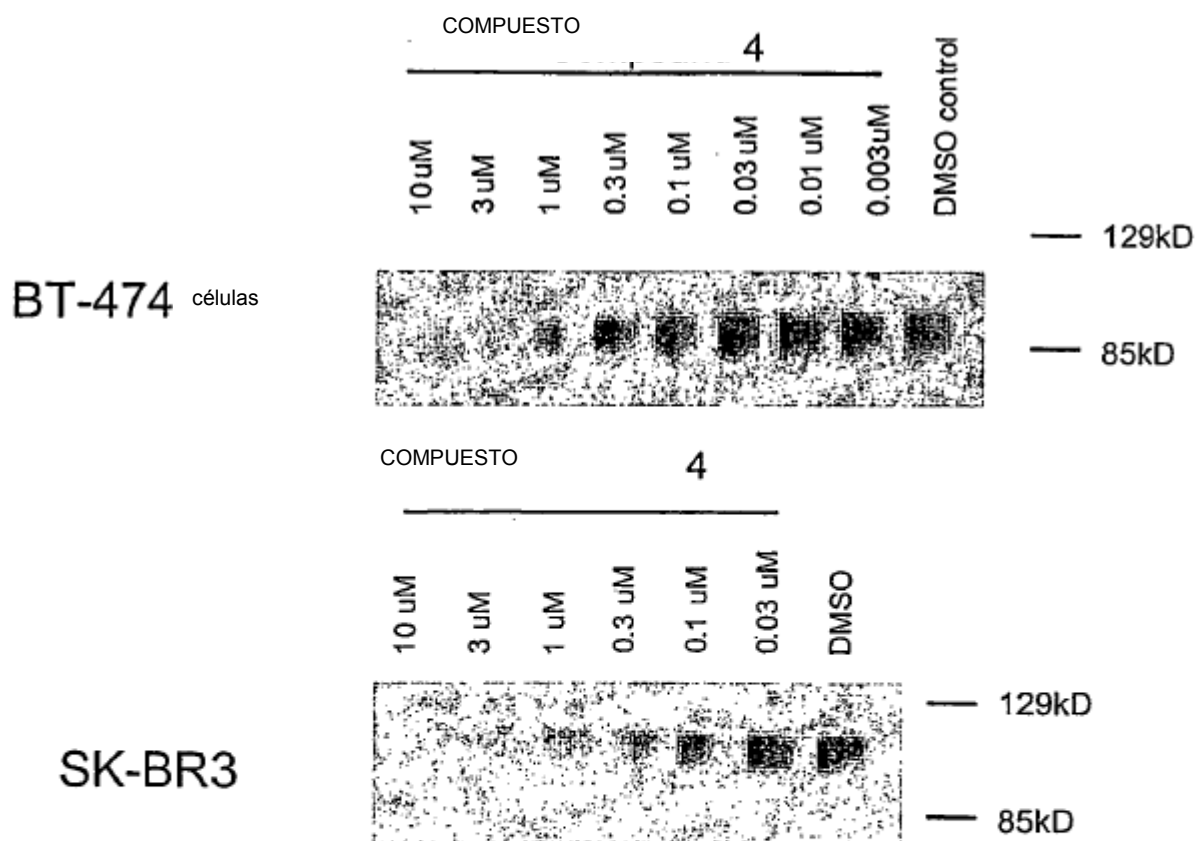


FIG. 16

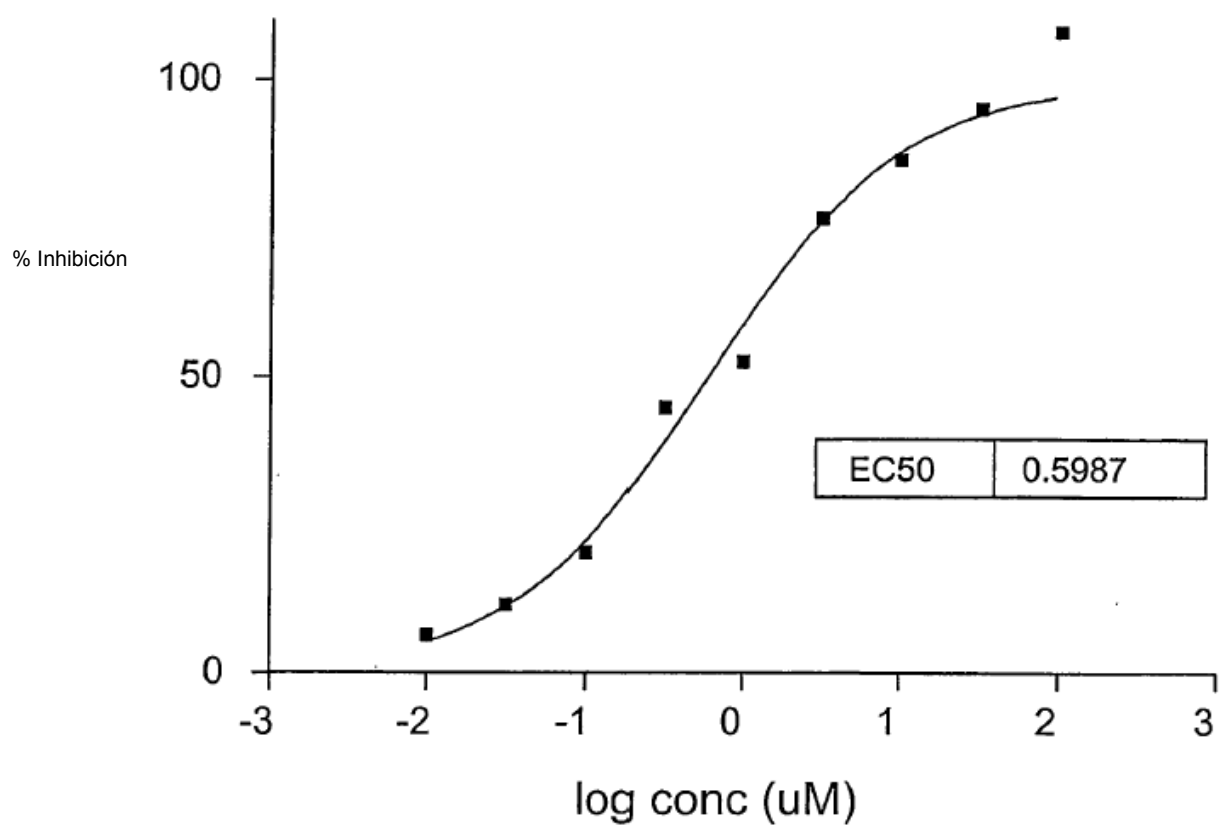
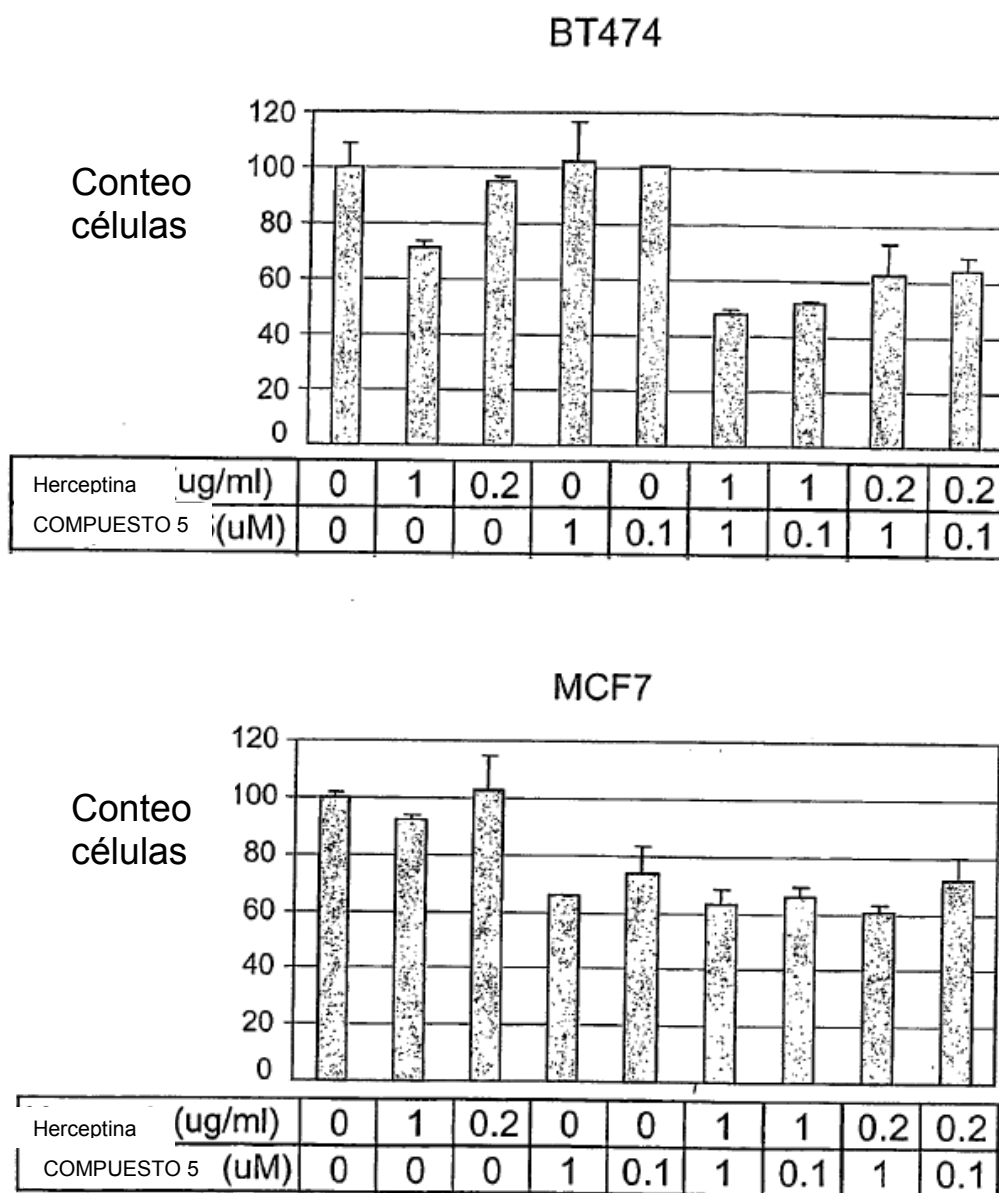


FIG. 17

**FIG. 18**

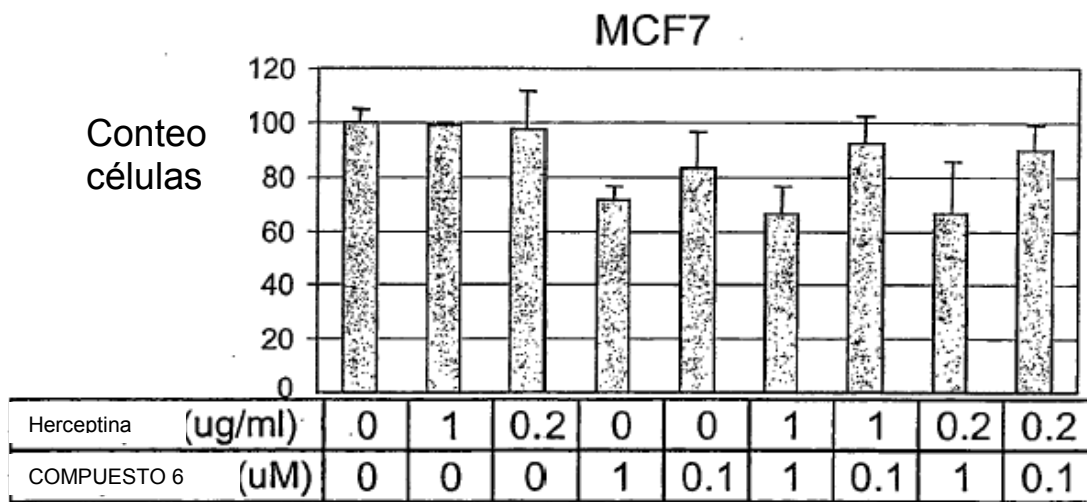
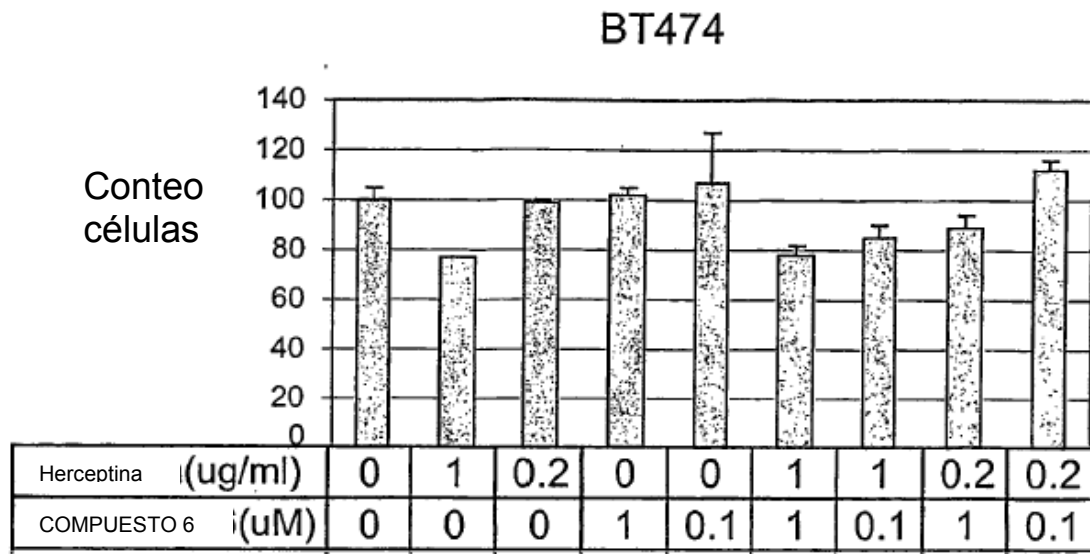


FIG. 19

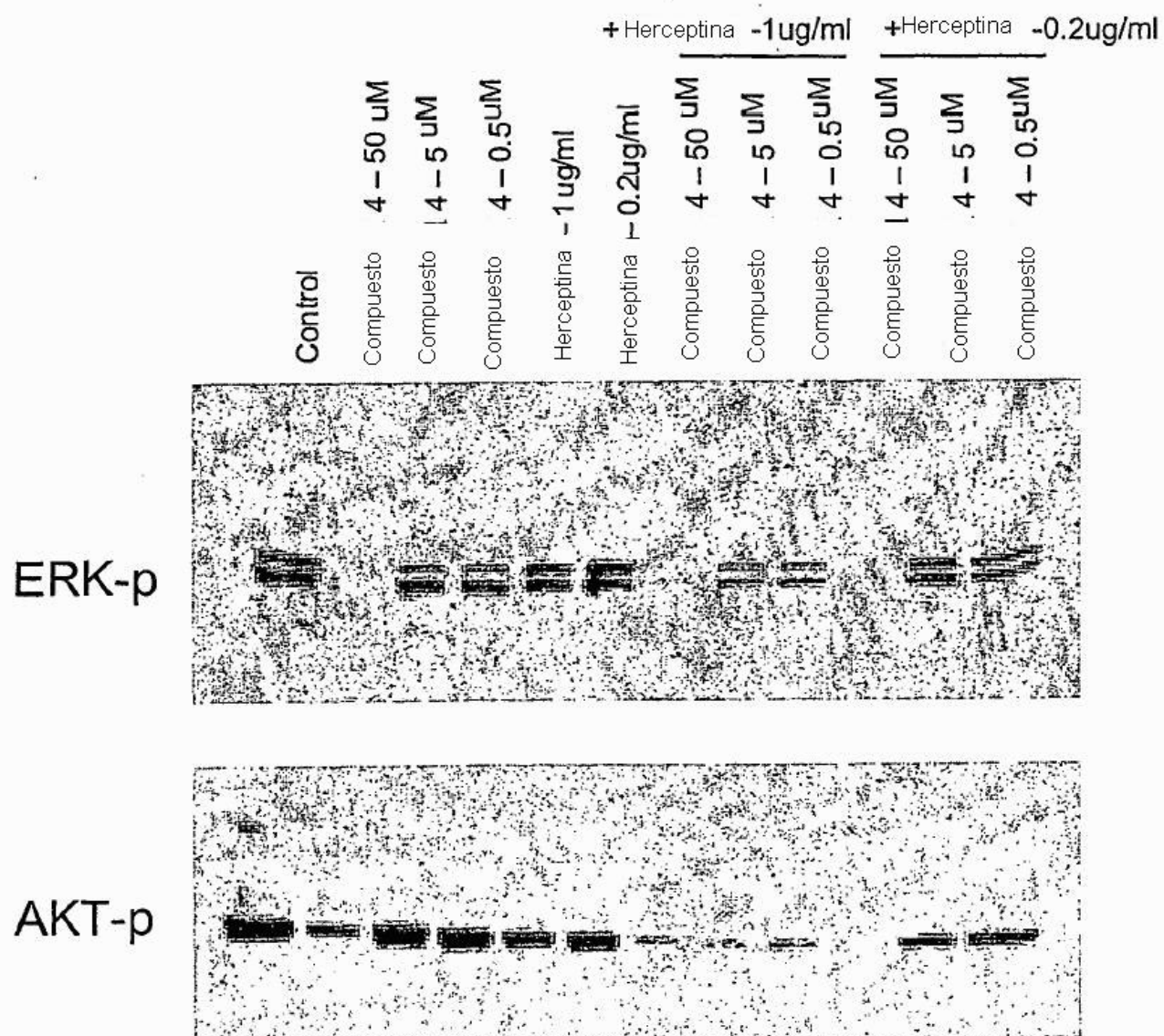
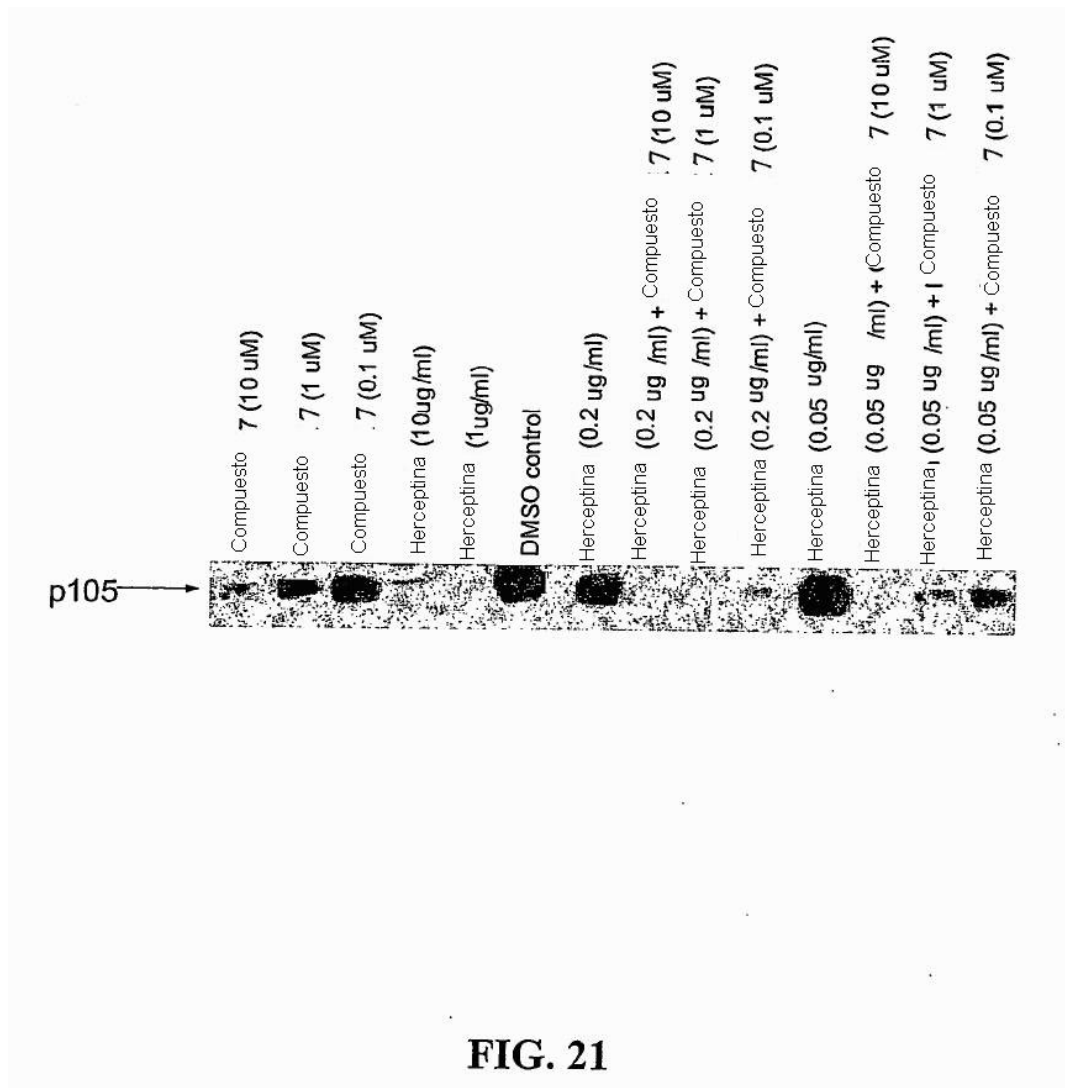


FIG. 20



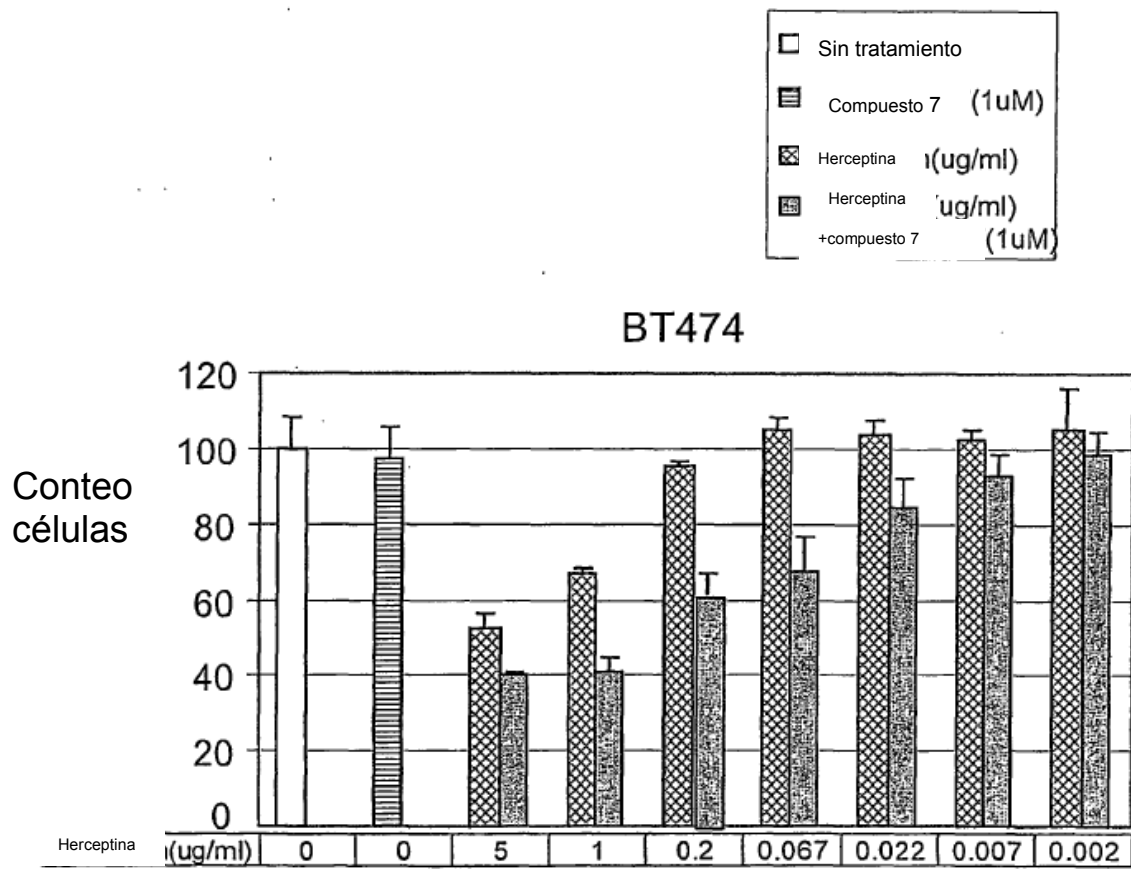
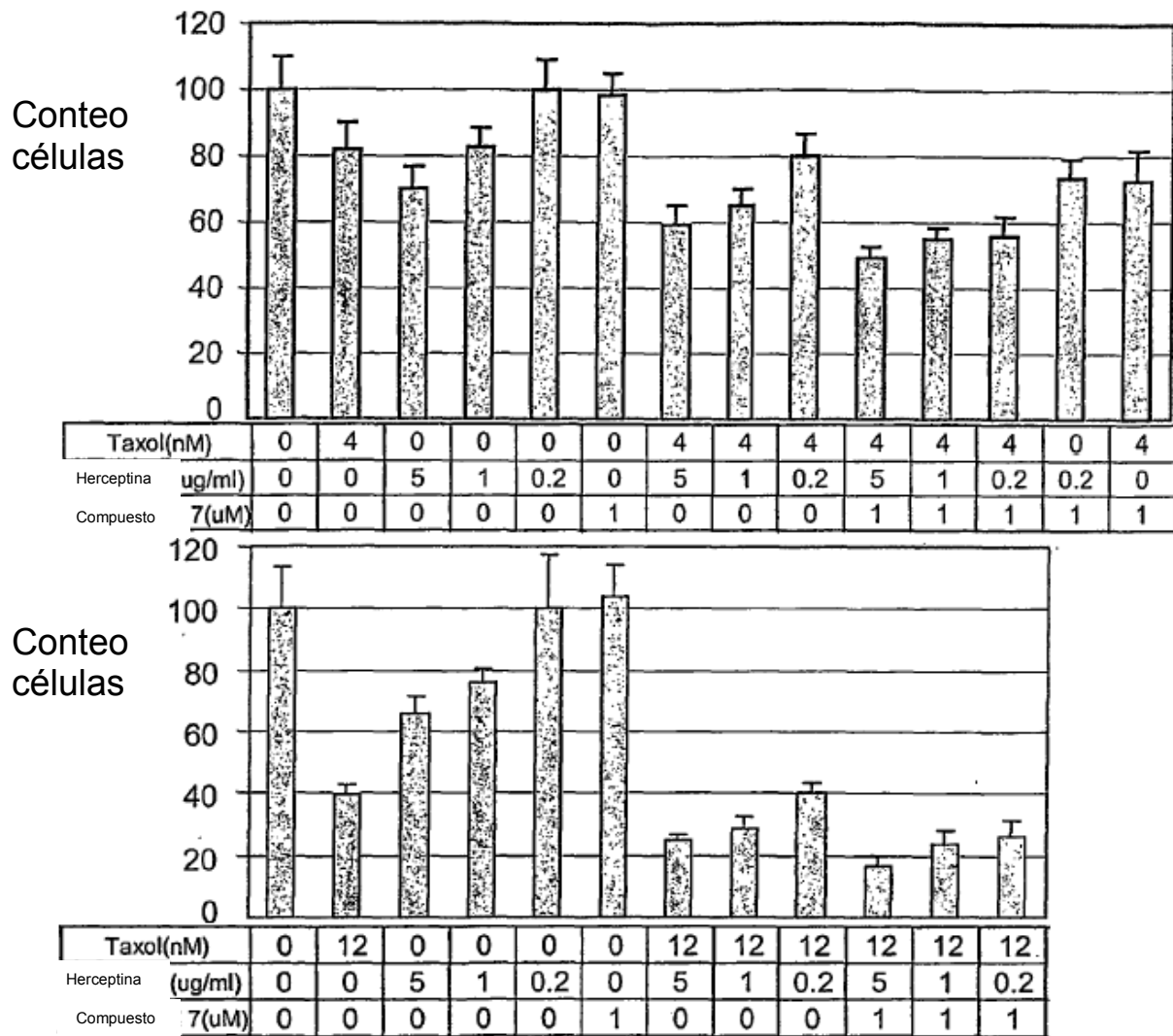
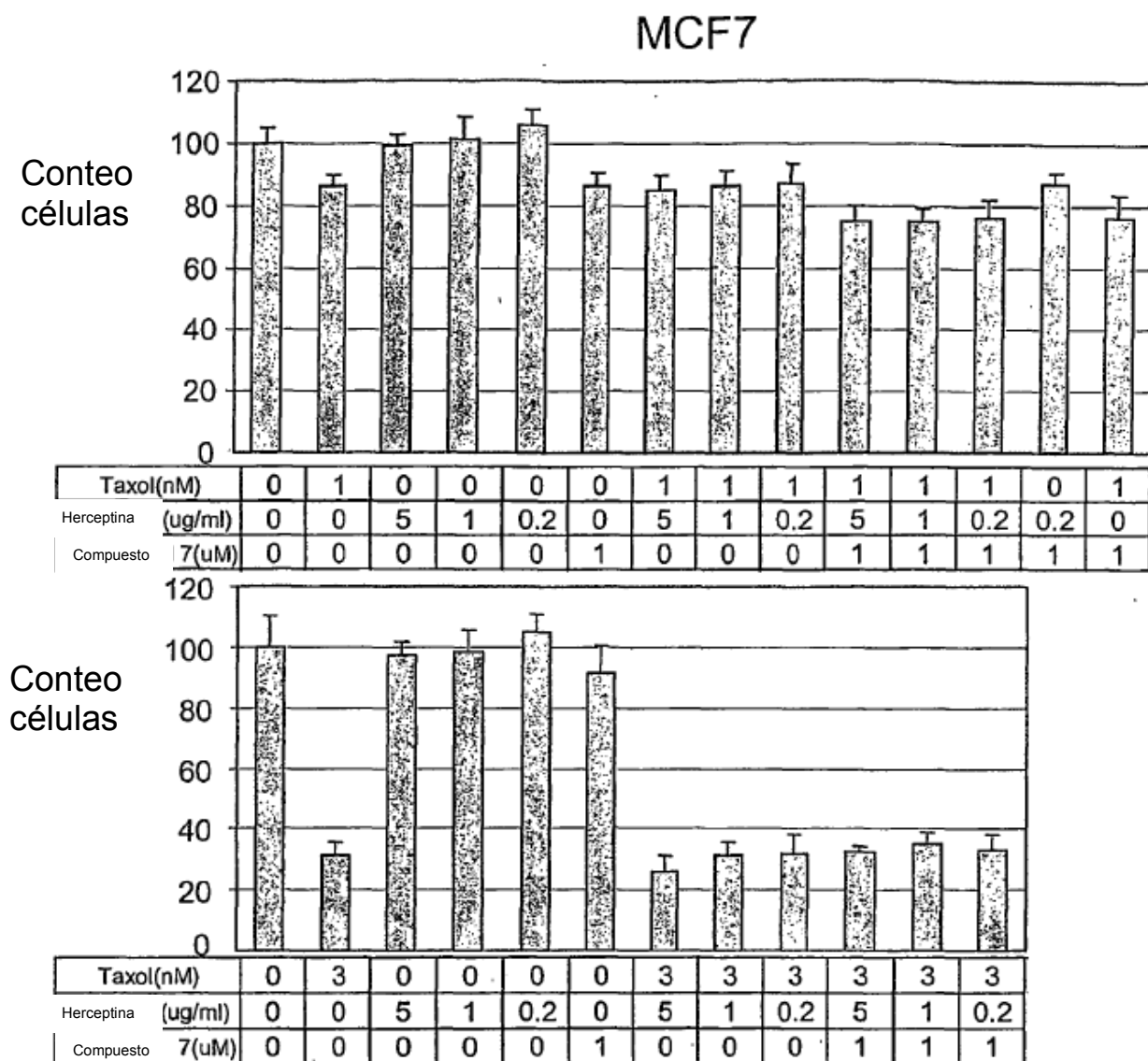


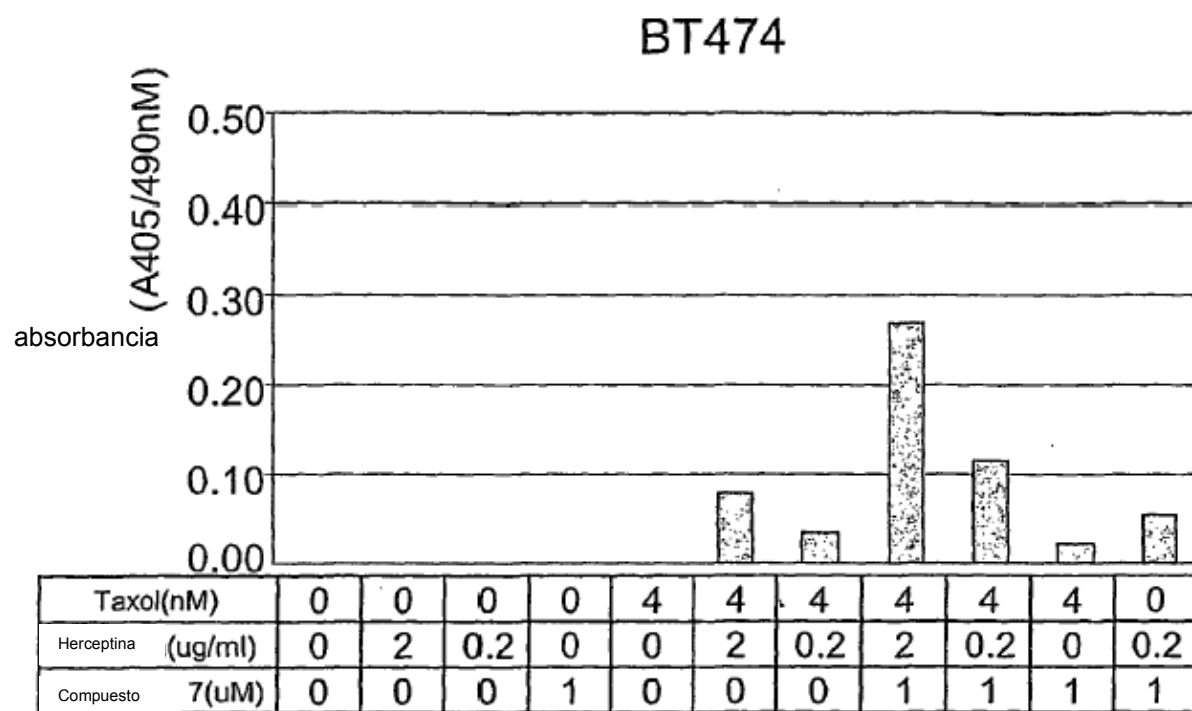
FIG. 22

FIG. 23

BT474



**FIG. 24**

**FIG. 25**

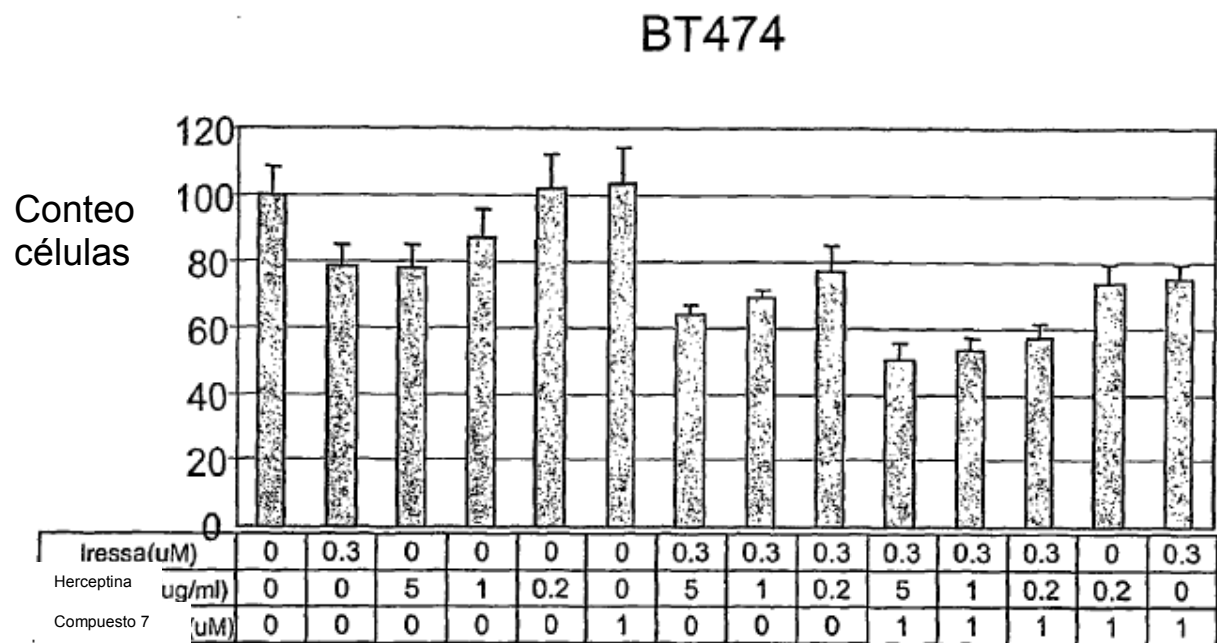


FIG. 26

FIGURA 27

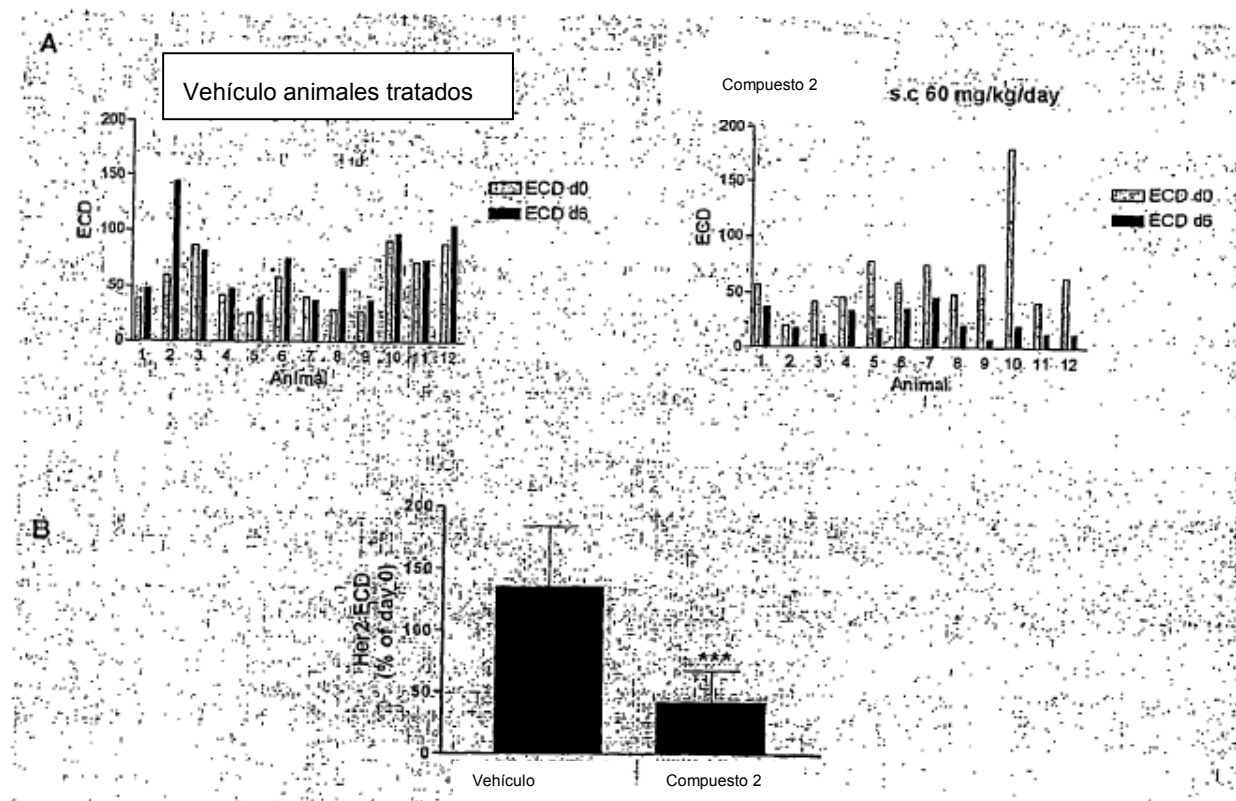


FIGURA 28

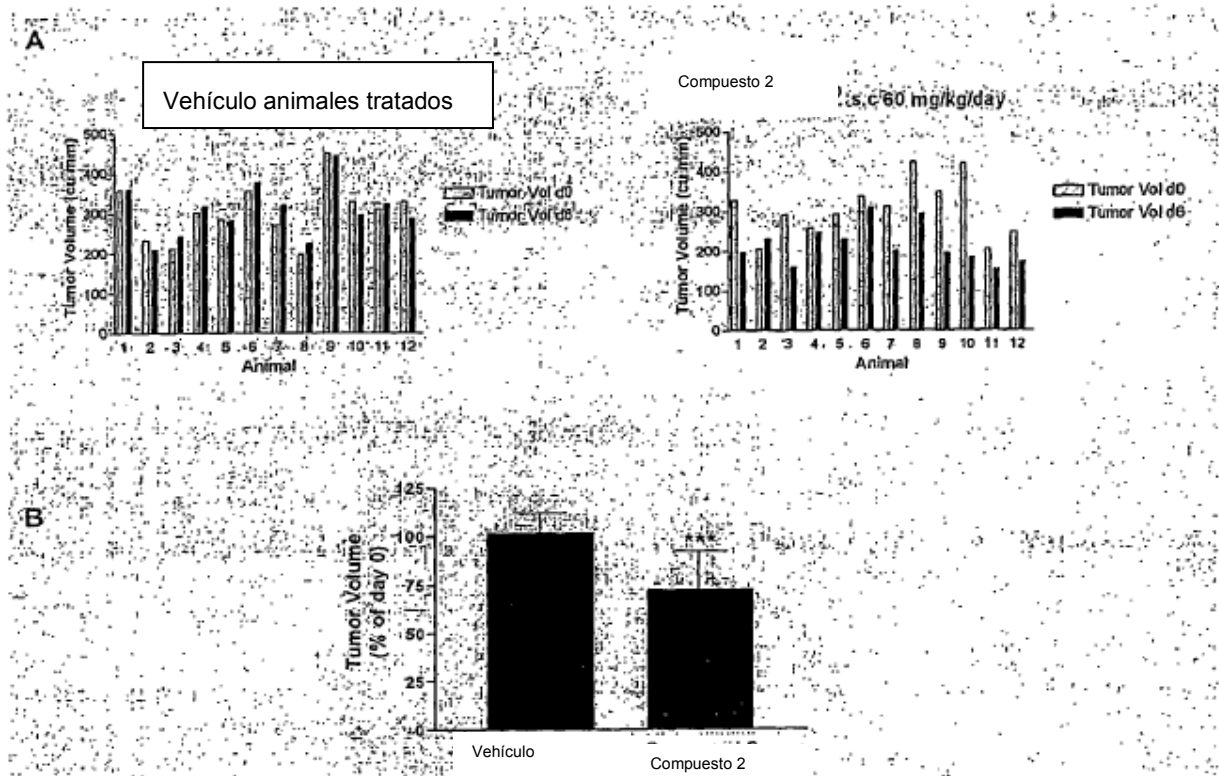


FIGURA 29

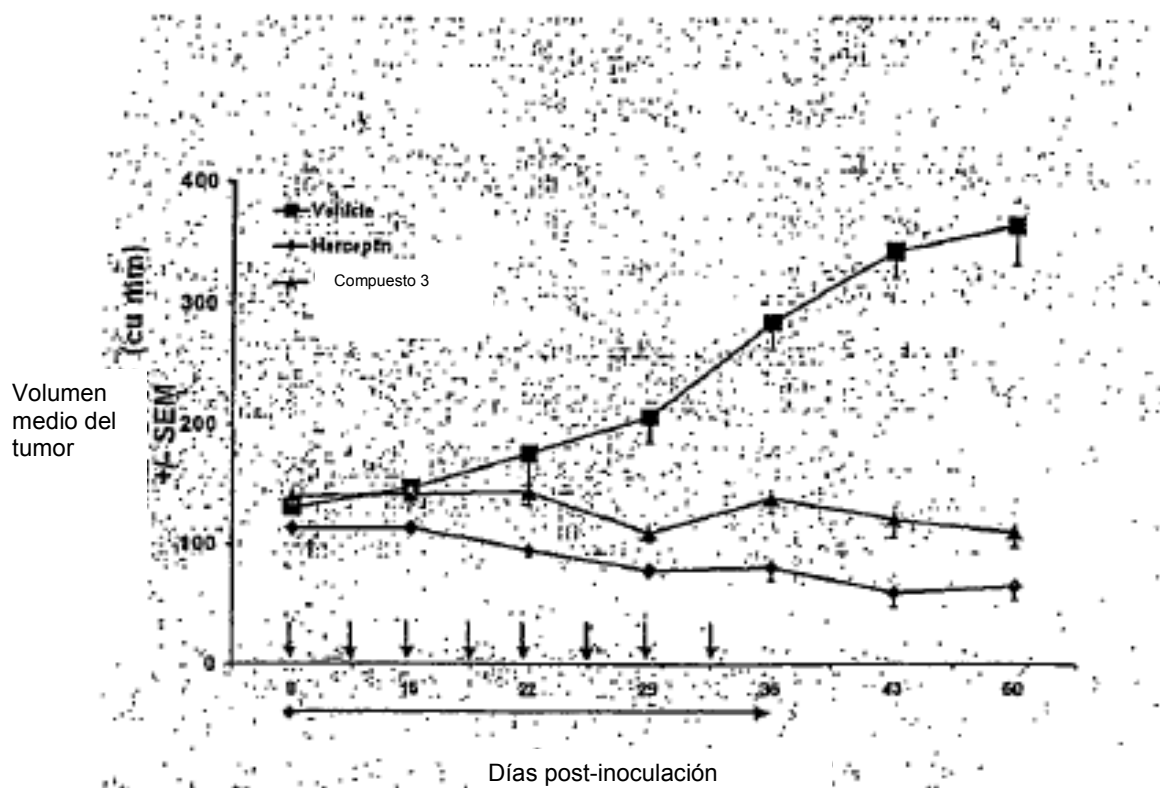


Figura 30

