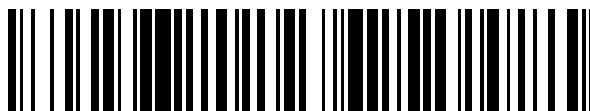


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 754**

51 Int. Cl.:

G01N 33/573	(2006.01)	C12N 15/13	(2006.01)
C12Q 1/37	(2006.01)	C12N 5/00	(2006.01)
G01N 33/574	(2006.01)	C12Q 1/68	(2006.01)
A61K 47/48	(2006.01)	A61P 35/00	(2006.01)
A61K 51/10	(2006.01)	A61K 48/00	(2006.01)
G01N 33/532	(2006.01)		
C07K 16/40	(2006.01)		
A61K 39/395	(2006.01)		
C12N 9/50	(2006.01)		
C12N 15/32	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.08.2008 E 08795130 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.10.2015 EP 2185933**

54 Título: **Proteína matriptasa y usos de la misma**

30 Prioridad:

07.08.2007 US 963837 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.11.2015

73 Titular/es:

**OXFORD BIOTHERAPEUTICS LTD. (50.0%)
94A Milton Park
Abingdon, Oxfordshire OX14 4RY, GB y
E. R. SQUIBB & SONS, L.L.C. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ROHLFF, CHRISTIAN y
TERRETT, JONATHAN ALEXANDER**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 550 754 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proteína matriptasa y usos de la misma

Introducción

5 La presente invención se refiere a la identificación del tallo de la proteína de membrana matriptasa asociada con el
cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata y cáncer de útero que tiene
utilidad como un marcador para el cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de
próstata y cáncer de mama y cáncer de útero, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata
10 y metástasis de cáncer de útero y que también forma una diana biológica contra la cual los anticuerpos terapéuticos (u
otros reactivos de afinidad) u otros agentes farmacéuticos se pueden hacer, las formulaciones/composiciones que
comprenden la proteína/polipéptido, el uso de proteína/polipéptido o una composición que comprende el mismo en
terapia, los anticuerpos para uso en terapia, composiciones que comprenden un anticuerpo terapéutico contra un
polipéptido relevante o una combinación de anticuerpos y el uso de la misma en la terapia. La invención también se
15 extiende al uso de la proteína relevante, fragmentos de la misma o los anticuerpos dirigidos contra la misma para el
diagnóstico de uno o más de cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de
próstata y cáncer de útero y kits que comprenden dicha proteína, fragmentos o anticuerpos y el uso de dichos kits en los
métodos de diagnóstico.

Antecedentes de la invención

Cáncer de mama

20 A nivel mundial, el cáncer de mama es a la vez el cáncer más común (10% de todos los casos de cáncer) y la principal
causa de muerte por cáncer (6% de las muertes por cáncer) en las mujeres. La incidencia global del cáncer de mama es
más de 1 millón de casos por año, con aproximadamente 400,000 muertes. Las mujeres en América del Norte tienen la
tasa más alta de cáncer de mama en el mundo (más de 200,000 nuevos casos por año, con aproximadamente 40,000
muertes). La probabilidad de desarrollar cáncer de mama invasivo en algún momento de la vida de una mujer es
25 aproximadamente de 1 de 8. La incidencia de cáncer de mama aumenta con la edad, aumentando bruscamente
después de los 40 años. En los Estados Unidos, aproximadamente el 77% de los cánceres de mama invasivos ocurren
en mujeres mayores de 50 años. Se ha estimado que aproximadamente US \$ 8.1mil millones se gastan en los Estados
Unidos, cada año en el tratamiento del cáncer de mama.

Tratamiento del Cáncer de Mama

30 La cirugía conservadora de la mama (lumpectomía) o mastectomía son los tratamientos habituales para el cáncer de
mama. Para el estadio I o II del cáncer de mama, la cirugía conservadora de la mama es tan efectiva como la
mastectomía. Los pacientes pueden entonces someterse a una cirugía reconstructiva. El muestreo de los ganglios
linfáticos axilares y la extirpación o la biopsia del ganglio linfático centinela (SLNB) se realiza para ver si el cáncer se ha
diseminado a los ganglios linfáticos.

35 La quimioterapia neoadyuvante se puede administrar antes de la cirugía para reducir el tamaño de grandes cánceres.
La quimioterapia adyuvante después de la cirugía reduce el riesgo de recurrencia del cáncer de mama. La quimioterapia
también se puede usar como el tratamiento principal para las mujeres cuyo cáncer se ha diseminado fuera de la mama y
el área de la axila. Los agentes quimioterapéuticos utilizados incluyen antraciclinas (por ejemplo, metotrexato,
fluorouracilo, doxorubicina, epirubicina), y taxanos (por ejemplo, paclitaxel, docetaxel, vinorelbina) y agentes alquilantes
(por ejemplo ciclofosfamida).

40 La radioterapia (generalmente radiación de haz externo, pero a veces braquiterapia) se da una vez que la quimioterapia
se completa.

45 La terapia hormonal con moduladores receptores de estrógeno (por ejemplo, tamoxifeno) selectivos, se puede dar a las
mujeres con cánceres de mama positivos para los receptores de estrógeno. Tomar tamoxifeno después de la cirugía
durante 5 años puede reducir la recurrencia en un 50% en las mujeres con cáncer de mama precoz. También se pueden
utilizar los inhibidores de la aromatasa tales como exemestano, letrozol o anastrozol.

Las mujeres con cánceres positivos para HER2 (cerca de 1/3 de los cánceres de mama) se pueden administrar con
modificadores de respuesta biológica tales como trastuzumab (Herceptin). Los ensayos clínicos han demostrado que la
adición de trastuzumab a la quimioterapia reduce la tasa de recurrencia y la tasa de mortalidad durante la quimioterapia
sola, después de la cirugía en mujeres con cáncer de mama precoz positivo para HER2.

50 Cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal (CRC) es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad relacionadas con el cáncer, responsable de un estimado de medio millón de muertes al año, la mayoría en Occidente, así los países desarrollados. En estos territorios, el CRC es la tercera neoplasia maligna más frecuente (número estimado de casos nuevos al año en USA y UE es de aproximadamente 350,000 por año). Los costes sanitarios estimados relacionados con el tratamiento para el cáncer colorrectal en los Estados Unidos son más de \$8 mil millones.

Tratamiento del cáncer colorrectal

Una vez que CRC ha sido diagnosticado, el tratamiento correcto necesita ser seleccionado. La cirugía suele ser el tratamiento principal para el cáncer de recto, aunque a menudo se suministra radiación y quimioterapia antes de la cirugía. Los posibles efectos secundarios de la cirugía incluyen sangrado de la cirugía, trombosis venosa profunda, y los daños a los órganos cercanos durante la operación.

En la actualidad, el 60 por ciento de los pacientes con cáncer colorrectal reciben quimioterapia para tratar su enfermedad; sin embargo, esta forma de tratamiento sólo beneficia a un pequeño porcentaje de la población, mientras que lleva consigo un alto riesgo de toxicidad, lo que demuestra la necesidad de definir mejor los criterios de selección de pacientes.

El cáncer colorrectal tiene una tasa de recurrencia del 30 al 40 por ciento dentro de un promedio de 18 meses después del diagnóstico primario. Al igual que con todos los tipos de cáncer, entre más temprano se detecta mayor probabilidad de que se puede curar, sobre todo porque los patólogos han reconocido que la mayoría de los tumores de CRC se desarrollan en una serie de etapas bien definidas a partir de adenomas benignos.

Cáncer de esófago

Existen aproximadamente 16,000 nuevos casos de cáncer de esófago en los Estados Unidos cada año, con cerca de 14,000 muertes. El cáncer de esófago es de 3 a 4 veces más común entre los hombres que entre las mujeres. El cáncer de esófago es más común en países como Irán, China, India y los países del sur de África. En estos países, el principal tipo de cáncer de esófago es el carcinoma de células escamosas. El adenocarcinoma del esófago es el principal tipo entre los blancos y en los países occidentales, la tasa de los hombres blancos ha aumentado en aproximadamente 2% al año.

Tratamiento del cáncer de esófago

Las opciones para el tratamiento precoz del cáncer de esófago incluyen cirugía (esofagectomía), la quimioterapia y la radioterapia. Desafortunadamente, la mayoría de los cánceres de esófago no se encuentran lo suficientemente temprano para que la cirugía curativa sea una opción de tratamiento. La radioterapia se utiliza como tratamiento primario en algunos pacientes y se puede combinar con quimioterapia. Un estudio reciente ha demostrado que los pacientes que recibieron quimioterapia seguida de cirugía tuvieron una tasa de supervivencia de 5 años del 39% frente al 16% para las personas que sólo se sometieron a cirugía. Los agentes quimioterapéuticos utilizados incluyen 5-fluorouracilo, cisplatino, carboplatino, bleomicina, mitomicina, doxorrubicina, metotrexato, paclitaxel, vinorelbina, topotecan e irinotecan. Otros tratamientos tales como stents mecánicos y la terapia fotodinámica se utilizan como tratamiento paliativo cuando todo el cáncer no se puede quitar.

Cáncer gástrico

El cáncer gástrico es la segunda causa principal de muertes relacionadas con cáncer en el mundo, con aproximadamente 700,000 muertes al año, principalmente en los países menos desarrollados. En los Estados Unidos, cerca de 22,000 personas son diagnosticadas con cáncer gástrico cada año, con aproximadamente 11,000 muertes. Esta cifra es aproximadamente diez veces mayor en Japón. Dos tercios de las personas diagnosticadas con cáncer gástrico son mayores de 65 años.

Tratamiento del cáncer gástrico

La cirugía es la única manera de curar el cáncer gástrico. Existen tres tipos usados en cirugía resección de mucosa endoscópica (sólo para el cáncer de estómago en estadio precoz), gastrectomía subtotal o gastrectomía total. El cáncer gástrico a menudo se disemina a los ganglios linfáticos por lo que estos también deben ser eliminados. Si el cáncer se ha extendido al bazo, también se elimina el bazo. La cirugía para el cáncer gástrico es difícil y pueden ocurrir complicaciones.

La quimioterapia se puede administrar como el tratamiento primario para el cáncer gástrico que se ha diseminado a órganos distantes. La quimioterapia junto con radioterapia de haz externo puede retrasar la recurrencia del cáncer y prolongar la duración de la vida de las personas con cáncer gástrico menos avanzado, especialmente cuando el cáncer

no puede ser eliminado completamente mediante cirugía. Los agentes quimioterapéuticos usados incluyen fluorouracilo, doxorrubicina, metotrexato, etopósido y cisplatino. Más recientemente, el mesilato de imatinib (Gleevec) se ha puesto a prueba en los tumores del estroma gastrointestinal (GIST), mejorando la supervivencia libre de progresión.

Cáncer de próstata

- 5 El cáncer de próstata es el tercer cáncer más común en el mundo entre los hombres y representa el 5.4% de todos los casos de cáncer a nivel mundial y el 3.3% de las muertes relacionadas con el cáncer. La incidencia global del cáncer de próstata es de cerca de 680,000 casos, con aproximadamente 221,000 muertes. En los Estados Unidos, el cáncer de próstata es el cáncer más común, con excepción de los cánceres de piel, en los hombres estadounidenses. Aproximadamente 234,460 nuevos casos de cáncer de próstata se diagnostican en los Estados Unidos cada año.
- 10 Aproximadamente 1 hombre de 6 serán diagnosticados con cáncer de próstata durante su vida, pero sólo 1 de cada 34 morirá de la misma. A poco más de 1.8 millones de hombres en los Estados Unidos son sobrevivientes de cáncer de próstata. El riesgo de desarrollar cáncer de próstata aumenta significativamente con la edad y el 60% de los casos ocurren en hombres mayores de 70 años. El cáncer de próstata es la segunda causa de muerte por cáncer en los hombres estadounidenses. Alrededor de 27,350 hombres en los Estados Unidos mueren de cáncer de próstata cada
- 15 año. El cáncer de próstata representa aproximadamente el 10% de las muertes por cáncer en los hombres. Los métodos modernos de detección y tratamiento significan que los cánceres de próstata se encuentran ahora más temprano y se tratan más eficazmente. Esto ha llevado a una caída anual en las tasas de mortalidad de aproximadamente el 3.5% en los últimos años. El cáncer de próstata es más común en América del Norte y el noroeste de Europa. Es menos común en Asia, África, América Central y América del Sur. Se ha estimado que aproximadamente
- 20 US \$ 8.0 mil millones se gastan en los Estados Unidos cada año en el tratamiento del cáncer de próstata.

Tratamiento del cáncer de próstata

- Dado que el cáncer de próstata a menudo crece muy lentamente, algunos hombres no tienen tratamiento y se recomienda el manejo expectante. Si se requiere tratamiento y no se cree que el cáncer se haya extendido fuera de la glándula, se puede realizar una prostatectomía radical. Se puede realizar la resección transuretral de la próstata (TURP)
- 25 para aliviar los síntomas, pero no para curar el cáncer de próstata.

También se puede utilizar como tratamiento, la radioterapia de haz externo (radioterapia conformada tridimensional (3D-CRT), la radioterapia de intensidad modulada (IMRT) o radioterapia con haz de protones conformada) o braquiterapia.

- La criocirugía se utiliza a veces para tratar el cáncer de próstata localizado, pero como no se sabe mucho acerca de la eficacia a largo plazo de la criocirugía, no se utiliza de forma rutinaria como primer tratamiento para el cáncer de
- 30 próstata. Se puede utilizar para el cáncer recurrente después de otros tratamientos.

La terapia de privación de andrógenos (ADT) (orquiectomía o análogos o antagonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH)) se pueden utilizar para reducir los cánceres de la próstata o hacerlos crecer más lentamente.

- La quimioterapia se utiliza a veces si el cáncer de próstata se ha diseminado fuera de la glándula prostática y es resistente a la terapia hormonal. Los agentes quimioterapéuticos incluyen docetaxel, prednisona, doxorrubicina, etopósido, vinblastina, paclitaxel, carboplatino, estramustina, vinorelbina. Al igual que la terapia hormonal, es poco probable que la quimioterapia resulte en una cura.
- 35

Cáncer de útero

Más del 95% de los cánceres de útero son carcinomas –ya sea carcinomas cervicales o carcinomas de endometrio.

- 40 Cáncer de cuello uterino

- El cáncer cervical se supera solo por el cáncer de mama como el tumor maligno más frecuente en ambas la incidencia y la mortalidad y sigue siendo un problema importante de salud pública en todo el mundo. Sólo en los Estados Unidos, el cáncer cervical invasivo representa aproximadamente el 19% de todos los cánceres ginecológicos. En los Estados Unidos, cerca de 9,710 casos de cáncer de cuello uterino invasivo son diagnosticados cada año, con 3,700 muertes. El
- 45 cáncer de cuello uterino no invasivo (carcinoma *in situ*) es aproximadamente 4 veces más común que el cáncer cervical invasivo. Entre 1955 y 1992, el número de muertes por cáncer de cuello uterino en los Estados Unidos se redujo en un 74%. La razón principal de este cambio es el aumento del uso del procedimiento de detección con las pruebas de Pap. La tasa de mortalidad por cáncer de cuello uterino en los Estados Unidos sigue disminuyendo en casi un 4% al año. La mitad de las mujeres diagnosticadas con este cáncer están entre las edades de 35 y 55. El cáncer cervical es más frecuente en las mujeres hispanas; la tasa es más del doble que en las mujeres blancas no hispanas. Las mujeres afroamericanas desarrollan este tipo de cáncer aproximadamente el 50% más a menudo que las mujeres blancas no
- 50

hispanas. En muchos países en desarrollo, donde los programas de selección de masas no están ampliamente disponibles, el problema clínico es más grave. A nivel mundial, el número de nuevos casos se estima en 471.000, con una tasa de supervivencia de cuatro años de sólo el 40% (Munoz et al., 1989, *Epidemiology of Cervical Cancer in: "Human Papillomavirus"*, New York, Oxford Press, pp 9-39; National Institutes of Health, Consensus Development Conference Statement on Cervical Cancer, Apr.1-3, 1996). Estos casos suelen ser diagnosticados en una etapa tardía invasiva, y no como precánceres o cánceres en etapas tempranas.

Tratamiento del cáncer de cuello uterino

Para el cáncer de pre-invasivo, la criocirugía, la cirugía con láser o la conización se pueden utilizar como tratamiento. Para el cáncer de cuello uterino en estadio I-IIA, una histerectomía es el tratamiento habitual. En algunos casos, puede ser posible una traquelectomía. Para el cáncer de cuello uterino recurrente, se realiza por lo general una exenteración pélvica. La radioterapia (ya sea radioterapia externa o braquiterapia) es una opción para los pacientes en estadio IB-estadio IV. La combinación de radioterapia con quimioterapia se ha encontrado para ser más eficaz que la radioterapia sola. Los agentes quimioterapéuticos usados incluyen cisplatino, paclitaxel, topotecan, ifosfamida y fluorouracilo. Cáncer de cuello uterino en estadio IVB generalmente no se considera curable, pero una combinación de radioterapia y quimioterapia puede ayudar a aliviar los síntomas.

Cáncer de endometrio

En los Estados Unidos, el cáncer del endometrio es el cáncer más común del sistema reproductivo femenino. Existen cerca de 39,000 casos nuevos cada año, con cerca de 7,500 muertes. Aproximadamente el 70% de los casos se encuentran en mujeres entre las edades de 45 y 74.

Tratamiento del cáncer de endometrio

La cirugía, la radioterapia, la terapia hormonal y la quimioterapia se usan para tratar el cáncer de endometrio. La cirugía por histerectomía es el tratamiento principal, pero en ciertas situaciones, una combinación de tratamientos se puede utilizar. Los agentes quimioterapéuticos usados incluyen doxorrubicina, cisplatino y paclitaxel. El principal tratamiento hormonal para el cáncer de endometrio utiliza progestinas, tales como acetato de medroxiprogesterona y acetato de megestrol.

Desafíos terapéuticos

Los principales retos en el tratamiento de los cánceres mencionados anteriormente son mejorar las tasas de detección temprana, para encontrar nuevos marcadores no invasivos que pueden ser utilizados para seguir la progresión de la enfermedad e identificar la recaída, y encontrar mejores y menos terapias tóxicas, especialmente para enfermedad más avanzada, donde la supervivencia de 5 años sigue siendo pobre. Hay una gran necesidad de identificar objetivos que son más específicos a las células cancerosas por ejemplo, los que se expresan en la superficie de las células tumorales de modo que puedan ser atacados por los nuevos enfoques prometedores como agentes inmunoterapéuticos y toxinas dirigidas.

Los anticuerpos de conejo policlonales dirigidos contra la región del tallo extracelular de matriptasa han estado disponibles comercialmente de AbCAM UK (ab28267) desde 2006.

Tsuzuki et al. (Biochem. J., 2005, 388, 679-687) revela que matriptasa se escinde entre Gly¹⁴⁹ y Ser¹⁵⁰ y que el análisis de transferencia Western de membranas crudas preparadas a partir de yeyuno de rata mostró la presencia del fragmento N-terminal pero insignificante o sin ocurrencia de la parte terminal C de la proteína.

Resumen de la invención

Se revelan en este documento los métodos y composiciones para la selección, diagnóstico, pronóstico y la terapia del cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata y cáncer de útero, para la estratificación de los pacientes de cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata y cáncer de útero, para controlar la eficacia del tratamiento del cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata y del cáncer de útero, y para el desarrollo de fármacos para el tratamiento del cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata y cáncer de útero.

Hemos utilizado la espectrometría de masas para identificar péptidos generados por electroforesis en gel o con marcación con reactivos ICAT y digestión trípica de proteínas de la membrana extraídas de cáncer de mama, cáncer colorrectal y muestras de tejido de cáncer de próstata. Las secuencias peptídicas se compararon con bases de datos de proteínas y de ADNc existentes y las correspondientes secuencias de genes identificados.

La proteína así identificada (matriptasa) se conoce por someterse a una serie de escisiones endoproteolíticas seguido por autoescisión del sitio de activación que resulta en un tallo de matriptasa que permanece en la superficie celular y un dominio catalítico de la proteína matriptasa que se libera en la sangre.

- 5 Se describen en este documento los agentes capaces de unirse específicamente a este remanente post-proteolítico ("tallo") que permanece en la superficie celular, o fragmentos del mismo, o agentes de hibridación capaces de hibridar con un ácido nucleico que codifica el tallo de matriptasa o agentes capaces de detectar la actividad del tallo de matriptasa para uso en el tratamiento, la selección de, la detección y/o diagnóstico de la enfermedad, tales como el cáncer, y especialmente el cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata o cáncer de útero.
- 10 También se describe en este documento el tallo de matriptasa, o un fragmento del mismo para uso en el tratamiento, la selección de, la detección y/o diagnóstico de la enfermedad tal como el cáncer, y especialmente el cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata o cáncer de útero.
- 15 De acuerdo con la invención, se proporciona un reactivo de afinidad capaz de unirse específicamente al tallo de matriptasa en donde el tallo de matriptasa tiene la secuencia definida en una cualquiera de las SEQ ID NOS: 10-13 o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con una cualquiera de las SEQ ID NOS: 10-13, y en donde el reactivo de afinidad está conjugado con una unidad estructural terapéutica tal como una unidad estructural citotóxica. El reactivo de afinidad puede, por ejemplo, ser un anticuerpo.
- 20 En algunas realizaciones, el anticuerpo de la presente invención se selecciona del grupo que consiste en: un anticuerpo completo, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo monocatenario, un inmunoconjugado, un anticuerpo defucosilado, y un anticuerpo biespecífico. El fragmento de anticuerpo puede ser seleccionado del grupo que consiste de: un Unicuerpo®, un anticuerpo de dominio, un Afficuerpo®, y un Nanocuerpo®. En algunas realizaciones, los inmunoconjugados de la invención comprenden un agente terapéutico. En otro aspecto de la invención, el agente terapéutico es una citotoxina o un isótopo radioactivo.
- 25 En algunas realizaciones, el anticuerpo de la presente invención se selecciona del grupo que consiste en: un Afficuerpo®, un DARPIn®, una Anticalina®, un Avímero, un Versacuerpo, y una Duocalina®.
- 30 También se describe un agente de hibridación capaz de hibridarse con un ácido nucleico que codifica el tallo de matriptasa, por ejemplo, un agente de hibridación que contiene o está conjugado a un marcador detectable. Un ejemplo de un agente de hibridación es un ARN inhibidor (ARNi). Otros ejemplos incluyen moléculas de ácido nucleico antisentido, incluyendo oligonucleótidos y ribozimas.
- 35 La invención también proporciona un kit que contiene uno o más reactivos de afinidad mencionados anteriormente. También se describen kits que contienen agentes de hibridación o que contienen uno o más agentes capaces de detectar la actividad del tallo de matriptasa junto con instrucciones para su uso en un método mencionado anteriormente. El kit puede contener además reactivos capaces de detectar y reportar la unión de dichos reactivos de afinidad y/o agentes de hibridación a sus socios de unión.
- 40 Otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más reactivos de afinidad de acuerdo con la invención capaces de unirse específicamente al tallo de matriptasa.
- 45 También se describe un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable y una composición farmacéutica que comprende uno o más reactivos de afinidad o reactivos de hibridación como se menciona anteriormente y un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.
- 50 Se describe en este documento un método para preparar un anticuerpo del tallo de anti-matriptasa, comprendiendo dicho método las etapas de: obtener una célula huésped que contiene una o más moléculas de ácido nucleico que codifican el anticuerpo de la invención; el cultivo de la célula huésped en un cultivo de células huésped; proporcionar condiciones del cultivo de la célula huésped en donde la una o más moléculas de ácidos nucleicos se expresan; y recuperar el anticuerpo a partir de la célula huésped o a partir del cultivo de células huésped.
- 55 También se describen los métodos de fabricación de los anticuerpos de la invención, que comprenden las etapas de: inmunizar un animal transgénico que comprende genes de inmunoglobulina humanos con un péptido del tallo de matriptasa; recuperar las células B de dicho animal transgénico; construcción de hibridomas de dichas células B; selección de hibridomas que expresan anticuerpos que unen el tallo de matriptasa; y la recuperación de dichos anticuerpos que unen el tallo de matriptasa a partir de dichos hibridomas seleccionados.
- 60 El método de fabricación de anticuerpos del tallo de anti-matriptasa, puede comprender las etapas de:

inmunización de un animal transgénico que comprende genes de inmunoglobulina humanos con un péptido del tallo de matriptasa;

recuperación de ARNm de las células B de dicho animal transgénico;

conversión de dicho ARNm en ADNc;

- 5 expresión de dicho ADNc en fagos tales como los anticuerpos del tallo de anti-matriptasa codificados por dicho ADNc se presentan en la superficie de dichos fagos;

selección de fagos que presentan anticuerpos del tallo anti-matriptasa;

recuperación de moléculas de ácido nucleico a partir de dichos fagos seleccionados que codifican dichos anticuerpos del tallo anti-matriptasa;

- 10 expresión de dichas moléculas de ácidos nucleicos recuperados en una célula huésped; y

recuperación de anticuerpos a partir de dicha célula huésped que se unen a proteínas del tallo de matriptasa.

También se describe el uso de un polipéptido del tallo de matriptasa, uno o más fragmentos o derivados inmunogénicos de los mismos para el tratamiento o profilaxis del cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata o cáncer de útero.

- 15 Otro aspecto de la invención proporciona un anticuerpo u otro reactivo de afinidad de acuerdo con la presente invención para uso en el tratamiento o prevención de enfermedades, tales como el cáncer, siendo dicho cáncer opcionalmente seleccionado de cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata o el cáncer de útero.

- 20 También se describe un método para determinar la disponibilidad del tallo de matriptasa como una diana terapéutica en un sujeto, el método que comprende:

(a) ensayos de rendimiento configurado para detectar el dominio catalítico soluble de matriptasa en una o más muestras obtenidas de dicho sujeto; y

(b) correlacionar los resultados de dicho(s) ensayo(s) con la presencia o ausencia del tallo de matriptasa.

- 25 Adecuadamente, dicho método incluye la determinación de que cuando el nivel de dicho dominio catalítico detectado de matriptasa es mayor en el sujeto que un nivel de control, dicha determinación indica la disponibilidad del tallo de matriptasa como una diana terapéutica.

- 30 También se describen los métodos de tratamiento de cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata y cáncer de útero, que comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que modula (por ejemplo, favorece la expresión o inhibe la expresión) o complementa la expresión o la actividad biológica (o ambas) del tallo de matriptasa en pacientes que tienen cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata o cáncer de útero, con el fin de (a) prevenir la aparición o el desarrollo de cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata o cáncer de útero; (b) prevenir la progresión del cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata o cáncer de útero; o (c) mejorar los síntomas de cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata o cáncer de útero.

- 40 También se describe un método para detectar, diagnosticar y/o seleccionar o monitorizar la progresión del cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata o cáncer de útero o de monitorizar el efecto de un fármaco o la terapia contra el cáncer de mama, contra el cáncer colorrectal, contra el cáncer esofágico, contra el cáncer gástrico, contra el cáncer de próstata o contra el cáncer de útero en un sujeto, que comprende detectar la presencia o el nivel del tallo de matriptasa, o uno o más fragmentos del mismo, o la presencia o el nivel de ácido nucleico que codifica el tallo de matriptasa o la presencia o el nivel de la actividad del tallo de matriptasa o que comprende detectar un cambio en el nivel de la misma en dicho sujeto.

- 45 Se describe además un método para detectar, diagnosticar y/o seleccionar el cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata o cáncer de útero en un sujeto candidato que comprende la detección de la presencia del tallo de matriptasa, o uno o más fragmentos de la misma, o la presencia del ácido nucleico que codifica el tallo de matriptasa o la presencia de la actividad del tallo de matriptasa en dicho sujeto candidato, en donde ya sea (a) la presencia de un nivel elevado del tallo de matriptasa o dicho uno o más fragmentos de los mismos o

- un elevado nivel de ácido nucleico que codifica el tallo de matriptasa o la presencia de un nivel elevado de la actividad del tallo de matriptasa en el sujeto candidato, en comparación con el nivel en un sujeto sano o (b) la presencia de un nivel detectable del tallo de matriptasa o dicho uno o más fragmentos del mismo o un nivel detectable de ácido nucleico que codifica el tallo de matriptasa o la presencia de un nivel detectable de la actividad del tallo de matriptasa en el sujeto candidato en comparación con un nivel indetectable correspondiente en un sujeto sano indica la presencia de cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata o cáncer de útero en dicho sujeto.
- También se describe un método de seguimiento de la progresión del cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata o cáncer de útero en un sujeto o de monitorizar el efecto de un fármaco o la terapia contra el cáncer de mama, contra el cáncer colorrectal, contra el cáncer de esófago, contra el cáncer gástrico, contra el cáncer de próstata o contra el cáncer de útero que comprende detectar la presencia del tallo de matriptasa, o uno o más fragmentos de la misma, o la presencia del ácido nucleico que codifica el tallo de matriptasa o la presencia de la actividad del tallo de matriptasa en dicho sujeto candidato en un primer momento y en un momento más tarde, la presencia de un nivel elevado o disminuido del tallo de matriptasa o dicho uno o más fragmentos del mismo o un nivel elevado o disminuido del ácido nucleico que codifica el tallo de matriptasa o la presencia de un nivel elevado o disminuido de la actividad del tallo de matriptasa en el sujeto en el momento posterior en comparación con el nivel en el sujeto en dicho primer momento, indicando la progresión o regresión del cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata o cáncer de útero o indicando el efecto o no efecto de un fármaco o la terapia contra el cáncer de mama, contra el cáncer colorrectal, contra el cáncer de esófago, contra el cáncer gástrico, contra el cáncer de próstata o contra el cáncer de útero, en dicho sujeto.
- La presencia del tallo de matriptasa, o uno o más fragmentos de los mismos, o la presencia del ácido nucleico que codifica el tallo de matriptasa o la presencia de la actividad del tallo de matriptasa puede, por ejemplo, ser detectados por análisis de una muestra biológica obtenida a partir de dicho sujeto.
- Por lo general, el método puede incluir la etapa de obtener una muestra biológica para el análisis de dicho sujeto.
- La muestra biológica utilizada puede ser de cualquier fuente tal como una muestra de tejido, por ejemplo, tejido de mama, colorrectal, del esófago, gástrico, de próstata o de útero. Por ejemplo, en la búsqueda de evidencia de cáncer de mama metastásico, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata o cáncer de útero, se podría mirar a los sitios principales de metástasis de cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata o de cáncer del útero, por ejemplo, el hígado, los pulmones y los huesos para el cáncer de mama; el hígado, la cavidad peritoneal, la pelvis, retroperitoneo y los pulmones para el cáncer colorrectal; la tráquea, el hígado, los huesos y el cerebro para el cáncer de esófago; el hígado, los pulmones, el cerebro y los huesos para el cáncer gástrico; la vejiga, el recto y los huesos para el cáncer de próstata y la vejiga, el recto, los pulmones, el hígado, los huesos y el cerebro para el cáncer de útero.
- Alternativamente, la presencia del tallo de matriptasa, o uno o más fragmentos de los mismos, o la presencia del ácido nucleico que codifica el tallo de matriptasa o la presencia de la actividad del tallo de matriptasa se pueden detectar mediante análisis *in situ*.
- En ciertos ejemplos, los métodos de diagnóstico descritos en este documento pueden ser al menos parcial, o totalmente, realizados *in vitro*.
- Adecuadamente, la presencia del tallo de matriptasa, o uno o más fragmentos de los mismos, o la presencia del ácido nucleico que codifica el tallo de matriptasa o la presencia de la actividad del tallo de matriptasa se detecta cuantitativamente.
- Por ejemplo, la detección cuantitativa puede comprender:
- (a) poner en contacto una muestra biológica con un reactivo de afinidad que es específica para el tallo de matriptasa, dicho reactivo de afinidad está opcionalmente conjugado con un marcador detectable; y
 - (b) detectar si la unión ha ocurrido entre el reactivo de afinidad y al menos una especie en la muestra, dicha detección se realiza ya sea directa o indirectamente.
- Alternativamente, la presencia del tallo de matriptasa, o uno o más fragmentos de los mismos, o la presencia del ácido nucleico que codifica el tallo de matriptasa o la presencia de la actividad del tallo de matriptasa se pueden detectar cuantitativamente por métodos que implican el uso de una tecnología de imagen.
- En otro ejemplo descrito en el presente documento el método implica el uso de inmunohistoquímica en secciones de tejido de mama, colorrectal, de esófago, gástrico, de próstata o de útero con el fin de determinar la presencia del tallo de

matriptasa, o uno o más fragmentos del mismo, o la presencia del ácido nucleico que codifica el tallo de matriptasa o la presencia de la actividad del tallo de matriptasa, y por lo tanto para localizar células de cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata o cáncer de útero.

- 5 En un ejemplo se detecta la presencia del tallo de matriptasa o uno o más fragmentos que contienen epítomos del mismo, por ejemplo utilizando un reactivo de afinidad capaz de unirse específicamente al tallo de matriptasa o uno o más fragmentos de los mismos, tales como un anticuerpo.

En otro ejemplo se detecta la actividad del tallo de matriptasa.

- 10 También se describe un método para detectar, diagnosticar y/o seleccionar o monitorizar la progresión del cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata o cáncer de útero o de monitorizar el efecto de un fármaco o la terapia contra el cáncer de mama, contra el cáncer colorrectal, contra el cáncer de esófago, contra el cáncer gástrico, contra el cáncer de próstata o contra el cáncer de útero en un sujeto que comprende detectar la presencia o el nivel de anticuerpos capaces de unirse inmuno-específicamente al tallo de matriptasa, o uno o más fragmentos que contienen el epítomo de los mismos o que comprende la detección de un cambio en el nivel del mismo en dicho sujeto.

- 15 También se discute un método para detectar, diagnosticar y/o seleccionar el cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata o cáncer de útero en un sujeto, que comprende detectar la presencia de anticuerpos capaces de unirse inmuno-específicamente al tallo de matriptasa, o uno o más fragmentos que contienen epítomos del mismo en dicho sujeto, en el cual (a) la presencia de un nivel elevado de anticuerpos capaces de unirse inmuno-específicamente al tallo de matriptasa o dicho uno o más fragmentos que contienen epítomos de la misma en dicho sujeto en comparación con el nivel en un sujeto sano o (b) la presencia de un nivel detectable de anticuerpos capaces de unirse inmuno-específicamente al tallo de matriptasa o dicho uno o más fragmentos que contienen epítomos del mismo en dicho sujeto en comparación con un nivel indetectable correspondiente en un sujeto sano indica la presencia del cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata o cáncer de útero en dicho sujeto.

- 25 Un método particular de detectar, diagnosticar y/o seleccionar el cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata o cáncer de útero comprende:

(a) poner en contacto con una muestra biológica a ensayar el tallo de matriptasa, o uno o más fragmentos que contienen epítomos del mismo; y

- 30 (b) detectar la presencia de anticuerpos en el sujeto capaz de unirse inmuno-específicamente al tallo de matriptasa, o uno o más fragmentos que contienen epítomos de los mismos

- 35 También se describe un método de monitorizar la progresión del cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata o cáncer de útero o de monitorizar el efecto de un fármaco o la terapia contra el cáncer de mama, contra el cáncer colorrectal, contra el cáncer de esófago, contra el cáncer gástrico, contra el cáncer de próstata o contra el cáncer de útero en un sujeto que comprende detectar la presencia de anticuerpos capaces de unirse inmuno-específicamente al tallo de matriptasa, o uno o más fragmentos que contienen epítomos del mismo en dicho sujeto en un primer momento y en un momento más tarde, la presencia de un nivel elevado o disminuido de anticuerpos capaces de unirse inmuno-específicamente al tallo de matriptasa, o uno o más fragmentos que contienen epítomos del mismo en dicho sujeto en el momento posterior en comparación con el nivel en dicho sujeto en dicho primer momento, lo que indica la progresión o regresión del cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata o cáncer de útero o el efecto o no efecto de un fármaco o terapia contra el cáncer de mama, contra el cáncer colorrectal, contra el cáncer de esófago, contra el cáncer gástrico, contra el cáncer de próstata o contra el cáncer de útero en dicho sujeto.

- 45 La presencia de anticuerpos capaces de unirse inmuno-específicamente al tallo de matriptasa, o uno o más fragmentos que contienen epítomos del mismo normalmente se detecta mediante el análisis de una muestra biológica obtenida a partir de dicho sujeto (muestras biológicas de ejemplo se mencionan anteriormente, por ejemplo, la muestra es una muestra de tejido de mama, colorrectal, esofágico, gástrico, de próstata o de útero, o bien una muestra de sangre o saliva).

El método incluye por lo general la etapa de obtener dicha muestra biológica para el análisis de dicho sujeto.

Los anticuerpos que se pueden detectar incluyen anticuerpos IgA, IgM e IgG.

En cualquiera de los métodos anteriores, el nivel que se puede detectar en el sujeto candidato que tiene cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata o cáncer de útero es 2 o más veces mayor que el nivel en el sujeto sano.

5 En una realización, el cáncer se previene o trata utilizando un reactivo de afinidad de acuerdo con la presente invención que reconoce el tallo de matriptasa. En otra realización, el reactivo de afinidad es un anticuerpo o una porción de unión del mismo, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo monocatenario, un inmunocombinado, un anticuerpo defucosilado, y un anticuerpo biespecífico, un unicuerpo®, un anticuerpo de dominio, un Afficuerpo®, un Nanocuerpo®, un DARPIn®, una Anticalina®, un Avímero, un Versacuerpo, o una Duocalina®. En otra realización, el cáncer es un cáncer de mama, un cáncer colorrectal, un cáncer de esófago, un cáncer gástrico, un cáncer de próstata, o un cáncer de útero.

10 Otros aspectos de la presente invención se exponen a continuación y en las reivindicaciones de este documento.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos de la proteína de la invención. Los péptidos tripticos detectados experimentalmente mediante espectrometría de masas son destacados, los péptidos coincidentes de masa se muestran en negrita, los péptidos secuenciados por espectrometría de masas en tándem se subrayan.

15 Las figuras 2a-2d muestran las cuatro secuencias posibles del tallo de matriptasa y muestran también los sitios de escisión. En cada figura, la secuencia del tallo se muestra en negrita y el sitio de escisión (si lo hay) se muestra subrayado.

La figura 3 muestra la secuencia del dominio catalítico soluble de la proteína de la invención. La secuencia del dominio catalítico se muestra en negrita y el sitio de escisión se muestra subrayado.

20 La figura 4 muestra la secuencia de la proteína de fusión del tallo de la matriptasa-hFcG 1. El tallo de la proteína humana de la invención se muestra en negrita, la región FcG1 humana se muestra en cursiva y el sitio de reconocimiento de escisión del Factor Xa es subrayado.

La figura 5 muestra los datos de diagrama de caja para el dominio catalítico de la proteína de la invención en el cáncer de próstata.

25 Las figuras 6a-6b muestran los datos de la curva ROC para el dominio catalítico de la proteína de la invención en muestras de cáncer de mama (Fig 6 (a)) y cáncer colorrectal (Fig 6 (b)).

Las figuras 7a-7b muestran gráficos del análisis de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de un anticuerpo policlonal de conejo para la región de tallo extracelular de matriptasa (AbCAM, UK, ab28267).

30 La figura 8 muestra un gráfico del análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) de un anticuerpo policlonal de conejo para la región de tallo extracelular de matriptasa (AbCAM, UK, ab28267) en las células de cáncer de colon HT-29.

La figura 9 muestra los resultados del análisis Western Blot para detectar matriptasa en células CHO-S que expresan la proteína Fc del tallo de matriptasa recombinante, utilizando un anticuerpo policlonal de conejo para la región de tallo extracelular de matriptasa (AbCAM, UK, ab28267).

35 Descripción detallada de la invención

La invención descrita en detalle a continuación abarca la administración de composiciones terapéuticas a un sujeto mamífero para tratar o prevenir el cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata o cáncer de útero. También se discuten los métodos y composiciones para la selección clínica, diagnóstico, pronóstico del cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata o cáncer de útero en un sujeto mamífero, para identificar a los pacientes con más probabilidades de responder a un tratamiento terapéutico particular, para el seguimiento de los resultados de la terapia del cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata o cáncer de útero, para la selección de fármacos y desarrollo de fármacos.

40 Se describen en este documento los agentes capaces de unirse específicamente al tallo de matriptasa, o un fragmento del mismo, para su uso en el tratamiento, la selección de, la detección y/o diagnóstico de la enfermedad, tal como el cáncer, y especialmente el cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata o cáncer de útero.

En un aspecto de la invención, se proporciona un reactivo de afinidad capaz de unirse específicamente al tallo de la matriptasa, en donde el tallo de matriptasa tiene la secuencia definida en una cualquiera de SEQ ID NOs: 10- 13 o una secuencia que tiene al menos 80%de identidad con una cualquiera de SEQ ID NOs: 10-13, y en donde el reactivo de afinidad contiene o está conjugado a una unidad estructural terapéutica tal como una unidad estructural citotóxica. El reactivo de afinidad puede ser, por ejemplo, un anticuerpo.

Otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más reactivos de afinidad de acuerdo con la presente invención capaz de unirse específicamente al tallo de matriptasa o un fragmento de la misma.

Para mayor claridad de la divulgación, y no a modo de limitación, la invención se describirá con respecto al análisis de tejido de mama, colorrectal, esofágico, gástrico, de próstata y uterino. Sin embargo, como un experto en el arte apreciará, los ensayos y técnicas descritas a continuación se pueden aplicar a otros tipos de muestras de pacientes, incluyendo una muestra de tejido de un paciente en riesgo de tener cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata y cáncer de útero (por ejemplo, una biopsia, tal como una biopsia de mama, colon, esófago, estómago, próstata o útero) u homogeneizado de los mismos. Los métodos y composiciones descritos en el presente documento son especialmente apropiados para la selección, el diagnóstico y el pronóstico de un sujeto vivo, pero también se pueden usar para el diagnóstico después de la muerte en un sujeto, por ejemplo, para identificar miembros de la familia en riesgo de desarrollar la misma enfermedad.

Tallo de matriptasa

Se utilizan la electroforesis unidimensional, las etiquetas de afinidad codificada por isótopos (ICAT) u otro método apropiado para analizar muestras de tejido de cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata o el cáncer de útero procedente de un sujeto, preferiblemente un sujeto vivo, con el fin de medir la expresión del tallo de matriptasa para la selección o diagnóstico de cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata o cáncer de útero, para determinar el pronóstico de un paciente con cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata o cáncer de útero, para controlar la eficacia de la terapia del cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata o cáncer de útero, o para el desarrollo de fármacos.

Tal como se utiliza en este documento, el término "proteína de la invención", o "matriptasa", se refiere a la proteína ilustrada en la figura 1 detectada experimentalmente por electroforesis 1D de muestras de tejido de mama y colorrectal y análisis de ICAT de muestras de tejido de próstata. Los derivados de proteínas de estas secuencias también pueden ser útiles para los mismos propósitos como se describe en el presente documento.

Esta proteína ha sido identificada en extractos de proteínas de membrana de muestras de tejido de mama, colorrectal y próstata procedentes de pacientes con cáncer de mama, cáncer colorrectal y cáncer de próstata, a través de los métodos y aparatos de las tecnologías preferidas descritas en los Ejemplos 1 y 2 (electroforesis en gel 1D o ICAT, junto con digesto triptico de extractos de proteínas de membrana). Las secuencias de péptidos se compararon con las bases de datos SWISS-PROT y trEMBL (en poder del Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) and the European Bioinformatics Institute (EBI), que están disponibles en www.expasy.com), y se identificó la siguiente entrada: Q9Y5Y6, supresor de la proteína de tumorigenicidad 14.

El supresor de la proteína de tumorigenicidad 14 degrada la matriz extracelular. De acuerdo con SWISS-PROT, se propone que desempeña un papel en la invasión y metástasis del cáncer de mama. Muestra una actividad similar a la tripsina como se define mediante la escisión de sustratos sintéticos con Arg o Lys como el sitio P1. Tiene un papel fisiológico esencial en el procesamiento de profilagrina, la maduración de los corneocitos y la formación de matriz lipídica asociada con la diferenciación terminal del epitelio oral y la epidermis y también es fundamental para el crecimiento del folículo piloso. Esta es una serina proteasa transmembrana de tipo II expresada en la mayoría de los epitelios humanos y es una proteasa estrictamente epitelial. Se expresa en carcinomas de origen epitelial y no en los tumores de origen mesenquimal.

La proteína también se ha descrito en US2006/0171884 (donde se conoce como "matriptasa"). Los anticuerpos generados contra el dominio catalítico de matriptasa también se describen, y están indicados para el tratamiento del cáncer. La proteína también se ha descrito en WO2007/141280. Se describen los métodos y las composiciones para la selección, el diagnóstico y el pronóstico del cáncer colorrectal.

Se ha informado que la región de tallo extracelular de matriptasa consiste en un dominio SEA único que comprende los residuos de aminoácidos 86-201 (Véase la figura 2 (a), secuencia del tallo de matriptasa A, SEQ ID No: 10). La activación de matriptasa requiere escisiones endoproteolíticas secuenciales y autoescisión del sitio de activación. La escisión se produce después del aminoácido Gly149, lo que resulta en una región de tallo que comprende los residuos de aminoácidos 86 - 149 (Véase la figura 2 (b), secuencia del tallo de matriptasa B, SEQ ID No: 11). Además la escisión

- proteolítica puede ocurrir después de los aminoácidos K189, lo que resulta en una región del tallo que comprende las secuencias de los aminoácidos 86-189 (Véase la figura 2 (c), secuencia del tallo de matriptasa C, SEQ ID No: 12) o aminoácido K204, lo que resulta en un tallo de la región que comprende las secuencias de aminoácidos 86-204 (Véase la figura 2 (d), la secuencia de tallo de matriptasa D, SEQ ID No: 13). A continuación la matriptasa se convierte en su conformación activa por escisión proteolítica después de Arg614. El dominio catalítico de la serina proteasa terminal C consiste en los residuos de aminoácidos 615-855 (Véase la figura 3, SEQ ID No: 14). Véase, por ejemplo, matriptasa: Potent Proteolysis on the Cell Surface; List, Bugge and Szabo; Mol Med 12(1-3)1-7, Jan- March 2006 y Regulation of the activity of matriptase on epithelial cell surfaces by a blood derived factor; Benaud, Dickson and Lin; Eur J Biochem 268, 1439-1447, 2001.
- La activación de matriptasa conduce a la liberación auto-catalítica de reactivos catalíticos en la sangre. El dominio catalítico de matriptasa (como se define por la SEQ ID No: 14) se puede ensayar por cualquier método conocido para los expertos en el arte, incluyendo pero no limitando a, la tecnología descrita en el presente documento en los Ejemplos 5 y 6, ensayos de quinasas, ensayos enzimáticos, ensayos de unión y otros ensayos funcionales, inmunoensayos, y transferencia Western.
- Por lo tanto, la detección del tallo de matriptasa (por ejemplo, utilizando el ensayo descrito en el Ejemplo 4) y también la detección del dominio catalítico soluble de matriptasa (por ejemplo, utilizando los ensayos descritos en los Ejemplos 5 y 6) en una muestra obtenida de un sujeto demostraría que la escisión del matriptasa había ocurrido e indicaría disponibilidad de la región del tallo de matriptasa como una diana terapéutica en ese sujeto. Existe una concordancia de datos entre los resultados del ensayo de inmunohistoquímica para detectar el tallo de matriptasa en el Ejemplo 4 y los resultados de los ensayos para detectar el dominio catalítico soluble de matriptasa en los Ejemplos 5 y 6, lo que indica que este enfoque es viable.
- El tallo de matriptasa es útil ya que son fragmentos particularmente fragmentos que contienen epítomos por ejemplo fragmentos antigénicos o inmunogénicos de los mismos y derivados de los mismos. Los fragmentos que contienen epítomos incluyendo fragmentos antigénicos o inmunogénicos por lo general serán de 12 aminoácidos de longitud o más, por ejemplo 20 aminoácidos o más por ejemplo, 50 o 100 aminoácidos o más. Los fragmentos pueden ser 95% o más de la longitud del tallo completo de la proteína por ejemplo, 90% o más, por ejemplo, 75% o 50% o 25% o 10% o más de la longitud del tallo completo de la proteína.
- Alternativamente, la proteína/polipéptido empleados o mencionados en este documento pueden ser limitados a los indicados/descritos específicamente en la presente memoria o una unidad estructural de 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica o similar a la misma.
- El epítopo que contiene fragmentos que incluyen fragmentos antigénicos o inmunogénicos serán capaces de provocar una respuesta inmune relevante en un paciente.
- Los derivados del tallo de matriptasa incluyen variantes en la secuencia en la cual se han hecho (por ejemplo 1-20 tal como 15 aminoácidos, o hasta 20%, tal como hasta 10% o 5% o 1% por número de aminoácidos basados en la longitud total del tallo de la proteína) una o más delecciones, inserciones o sustituciones. Las sustituciones pueden ser por lo general sustituciones conservadoras. Los derivados por lo general tendrán esencialmente la misma función biológica como la proteína de la que se derivan. Los derivados por lo general serán comparables antigénicos o inmunogénicos con la proteína de la que se derivan. Los derivados por lo general tendrán ya sea la actividad de unión al ligando, o la capacidad de formación del complejo receptor activo, o preferiblemente ambas, de la proteína de la que se derivan.
- Los derivados de las proteínas también incluyen proteínas tratadas químicamente tal como proteínas carboximetiladas, carboxiamidadas, acetiladas, por ejemplo tratadas durante la purificación.
- Las Tablas 1a y 1b a continuación, ilustran las diferentes ocurrencias de matriptasa tal como se detecta por electroforesis en gel 1D y espectrometría de masas de los extractos de proteínas de membrana de las muestras de tejido de mama y colorrectal procedentes de pacientes con cáncer de mama y cáncer colorrectal, respectivamente. La primera columna de la izquierda provee el peso molecular y la columna de la derecha provee una lista de las secuencias observadas por espectrometría de masas y las correspondientes SEQ ID Nos.
- La Tabla 2 a continuación ilustra las diferentes ocurrencias de matriptasa como se detecta por ICAT y espectrometría de masas de los extractos de proteínas de membrana de las muestras de tejido de próstata procedentes de pacientes con cáncer de próstata. La columna de la izquierda provee el número de la muestra y en la columna de la derecha provee una lista de las secuencias observadas por espectrometría de masas y las correspondientes SEQ ID Nos.

Tabla 1a - Cáncer de mama 1D GE

MW (Da)	Trípticos identificados [SEQ ID No]
59316	SQFVVTSNSNK [8]
62727	FTTPGFPDSPYPAHAR [2], GDADSVLSLTFR [3], HPGFEATFFQLPR [4], SAPGVQERR [6]

Tabla 1b - Cáncer colorrectal 1D GE

MW (Da)	Trípticos identificados [SEQ ID No]
74658	FTTPGFPDSPYPAHAR [2], GDADSVLSLTFR [3], SFVVTSVVAFTDSK [7]
76173	FTTPGFPDSPYPAHAR [2], GDADSVLSLTFR [3], HPGFEATFFQLPR [4], IFQAGVSWGDGCAQR [5]
77754	FTTPGFPDSPYPAHAR [2]

Tabla 2 - Cáncer de próstata ICAT

Muestra	Trípticos identificados [SEQ ID No]
Muestra 1	TQDNCSFGLHAR [9]
Muestra 2	TQDNCSFGLHAR [9]
Muestra 3	TQDNCSFGLHAR [9]

5

10

15

20

25

30

Para el tallo de matriptasa, el nivel detectado obtenido al analizar tejido procedente de sujetos que tienen cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata o cáncer de útero en relación con el nivel detectado obtenido al analizar tejido procedente de sujetos libres de cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata y de útero dependerá de la técnica de protocolo y de detección analítica particular que se use. De acuerdo con lo anterior, el método contempla que cada laboratorio establecerá un intervalo de referencia en sujetos libres de cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata y cáncer de útero de acuerdo con el protocolo de análisis y la técnica de detección en uso, como es convencional en el arte de diagnóstico. Preferiblemente, al menos una muestra de tejido de control positivo procedente de un sujeto conocido por tener cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata o cáncer de útero o al menos una muestra de tejido de control negativo procedente de un sujeto conocido por estar libre de cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata y cáncer de útero (y más preferiblemente ambas muestras de control positivo y negativo) se incluyen en cada lote de muestras de ensayo analizadas,

El tallo de matriptasa se puede utilizar para la detección, el pronóstico, el diagnóstico o el seguimiento del cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata y cáncer de útero o para el desarrollo de fármacos. En un ejemplo, el tejido de un sujeto (por ejemplo, un sujeto sospechoso de tener cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata o cáncer de útero) se analizó por electroforesis 1D o ICAT para la detección de sólo aquellos péptidos específicos al tallo de matriptasa, que consiste en esos péptidos contenidos en una cualquiera de las secuencias definidas por la SEQ ID Nos: 10-13. Preferiblemente, uno de los péptidos detectados es el péptido definido por la SEQ ID No: 7. Una mayor abundancia del tallo de matriptasa en el tejido del sujeto con respecto al tejido de un sujeto o sujetos libres de cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata y cáncer de útero (por ejemplo, una muestra de control) o un intervalo de referencia determinado previamente indica la presencia de cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata o cáncer de útero.

Se pueden emplear las secuencias mostradas en las Tablas 1-2.

En relación a las variantes, fragmentos, fragmentos inmunogénicos o fragmentos antigénicos de matriptasa:

- para aplicaciones de cáncer colorrectal: preferiblemente, estos comprenden la secuencia definida por SEQ ID No: 7.

5 Tal como se usa en el presente documento, el tallo de matriptasa es "aislado" cuando está presente en una preparación que es sustancialmente libre de proteínas contaminantes, *i.e.*, una preparación en la cual menos del 10% (preferiblemente menos del 5%, más preferiblemente menos del 1%) de la proteína total presente es(son) proteína(s) contaminante(s). Una proteína contaminante es una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos significativamente diferente de la de tallo de matriptasa aislado, como se determina por análisis espectral de masas. Tal como se usa en el presente documento, una secuencia "significativamente diferente" es una que permite que la proteína contaminante sea resuelta a partir del tallo de matriptasa por análisis espectral de masas, realizado de acuerdo con los protocolos de referencia en los ejemplos 1 y 2.

10 El tallo de matriptasa se puede ensayar por cualquier método conocido para los expertos en el arte, incluyendo pero no limitando a, las tecnologías preferidas descritas en el presente documento, los ensayos de quinasa, ensayos enzimáticos, ensayos de unión y otros ensayos funcionales, inmunoensayos, y transferencias de Western. En una realización, el tallo de matriptasa se separa en un gel 1-D en virtud de su MW y se visualiza por tinción del gel. En una realización, la matriptasa se tiñe con un colorante fluorescente y se toma la imagen con un escáner de fluorescencia. Sypro Red (Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon) es un colorante apropiado para este propósito. Un colorante fluorescente preferido se revela en la Solicitud de los Estados Unidos No.09/412,168, presentada el 5 de octubre de 1999. En otra realización, el tallo de matriptasa se analiza utilizando etiquetas de afinidad codificadas por isótopos (ICAT).

20 Alternativamente, el tallo de matriptasa se puede detectar en un inmunoensayo. En un ejemplo, un inmunoensayo se lleva a cabo poniendo en contacto una muestra de un sujeto que se va a evaluar con un anticuerpo de tallo anti-matriptasa (u otro reactivo de afinidad) bajo condiciones tales que la unión (por ejemplo, la unión inmuno-específica) puede ocurrir si el tallo de matriptasa está presente, y detectar o medir la cantidad de cualquier unión (por ejemplo, la unión inmuno-específica) por medio del agente de unión. El tallo de agentes de unión de matriptasa puede ser producido por los métodos y las técnicas que se enseñan en el presente documento.

25 El tallo de matriptasa se puede detectar en virtud de la detección de un fragmento de la misma por ejemplo, fragmento que contiene un epítipo (por ejemplo, un inmunogénico o antigénico) de la misma. Los fragmentos pueden tener una longitud de al menos 10, más por lo general al menos 20 aminoácidos por ejemplo, al menos 50 ó 100 aminoácidos.

30 En un ejemplo, se puede utilizar la unión de un reactivo de afinidad (por ejemplo, un anticuerpo) en secciones de tejido para detectar el tallo aberrante de la localización de matriptasa o un nivel aberrante del tallo de matriptasa. En un ejemplo específico, un anticuerpo (u otro reactivo de afinidad) para el tallo de matriptasa se pueden utilizar para someter a ensayo un tejido del paciente (por ejemplo, tejido de mama, colorrectal, esofágico, gástrico, de próstata o de útero) para el nivel del tallo de matriptasa donde un nivel aberrante del tallo de matriptasa es indicativo de cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata o cáncer de útero. Como se usa en el presente documento, un "nivel aberrante" significa un nivel que se incrementa en comparación con el nivel de un sujeto libre de cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata y cáncer de útero o un nivel de referencia.

35 Cualquier inmunoensayo apropiado se puede utilizar, incluyendo, sin limitación, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos utilizando técnicas tales como transferencias Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), inmunoensayos "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes e inmunoensayos con proteína A.

40 La invención también provee kits de diagnóstico, que comprenden un anticuerpo de tallo de anti-matriptasa (u otro reactivo de afinidad) de acuerdo con la invención. Además, dicho kit puede comprender opcionalmente uno o más de los siguientes: (1) instrucciones para usar el reactivo de afinidad de tallo de anti-matriptasa para el diagnóstico, pronóstico, seguimiento terapéutico o cualquier combinación de estas aplicaciones; (2) un socio de unión marcado para el reactivo de afinidad; (3) una fase sólida (tal como una tira de reactivo) sobre la que se inmoviliza el reactivo de afinidad del tallo de anti-matriptasa; y (4) una etiqueta o inserto que indica la aprobación reglamentaria para uso diagnóstico, pronóstico o terapéutico o cualquier combinación de los mismos. Si no se provee ningún socio de unión marcado para el reactivo de afinidad, el propio reactivo de afinidad anti-matriptasa se puede marcar con un marcador detectable, por ejemplo, una unidad estructural quimioluminiscente, enzimática, fluorescente, o radiactiva.

Producción de reactivos de afinidad para el tallo de matriptasa

45 De acuerdo con los expertos en el arte, hay tres tipos principales de anticuerpos monoclonales de reactivos de inmunoafinidad, anticuerpos de expresión en fagos y las moléculas derivadas de anticuerpos más pequeñas, como un Afficuerpo®, anticuerpos de dominio(dAbs), nanocuerpos, un unicuerpo®, un DARPin®, una Anticalina®, una Duocalina®, Avímeros o Versacuerpos. En general, en las aplicaciones de acuerdo con la presente invención, donde se

indica el uso de anticuerpos, se pueden utilizar otros reactivos de afinidad (por ejemplo, un Afficuerpo®, anticuerpos de dominio, nanocuerpos, un unicuerpo®, un DARPIn®, un Anticalina®, un Duocalina®, Avímeros o Versacuerpos). Se puede decir que tales sustancias son capaces de unirse inmuno-específicamente a la matriptasa. Cuando sea apropiado el término "agente de afinidad" será interpretado para abarcar los reactivos de inmunoafinidad y otras sustancias capaces de unirse específicamente a la matriptasa incluyendo, pero sin limitarse a ligandos, lectinas, estreptavidinas, miméticos de anticuerpos y agentes de unión sintéticos.

Producción de anticuerpos para el tallo de matriptasa

De acuerdo con la invención, el tallo de matriptasa, un análogo del tallo de matriptasa, una proteína relacionada con el tallo de matriptasa o un fragmento o derivado de cualquiera de los anteriores se puede utilizar como un inmunógeno para generar anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a dicho inmunógeno. Tales inmunógenos se pueden aislar por cualquier medio conveniente, incluyendo los métodos descritos anteriormente. El término "anticuerpo" tal como se utiliza en este documento, se refiere a un péptido o polipéptido derivado de, modelado después o sustancialmente codificado por un gen de inmunoglobulina o genes de inmunoglobulina, o fragmentos de los mismos, capaces de unirse específicamente a un antígeno o epítipo. Véase, por ejemplo Fundamental Immunology, 3rd Edition, W.E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993); Wilson (1994) J. Immunol. Methods 175:267-273; Yarmush (1992) J. Biochem. Biophys. Methods 25:85-97. El término anticuerpo incluye partes de unión a antígeno, i.e., "sitios de unión a antígeno" (por ejemplo, fragmentos, subsecuencias, regiones determinantes de la complementariedad (CDR)) que retienen la capacidad para unirse al antígeno, incluyendo (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste de los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un brazo único de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), que consiste en un dominio VH; y (vi) una región determinante de la complementariedad aislada (CDR). Los anticuerpos de cadena sencilla también están incluidos por referencia en el término "anticuerpo". Los anticuerpos de la invención incluyen, pero no se limitan a anticuerpos policlonales, monoclonales, biespecíficos, anticuerpos humanizados o quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab y fragmentos F(ab')₂, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos anti-idiotipo anticuerpos(anti-Id), y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores. Las moléculas de inmunoglobulina de la invención pueden ser de cualquier clase (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD e IgA) o subclase de molécula de inmunoglobulina.

El término "se une específicamente" (o "se une inmuno-específicamente") no está destinado a indicar que un anticuerpo se une exclusivamente a su diana prevista. Más bien, un anticuerpo "se une específicamente" si su afinidad por su diana prevista es aproximadamente 5 veces mayor cuando se compara con su afinidad por una molécula no diana. Adecuadamente, no hay reacción con cruzamiento significativa o unión con cruzamiento con sustancias no deseadas, especialmente proteínas de origen natural o tejidos de una persona o animal sanos. La afinidad del anticuerpo, por ejemplo, será al menos aproximadamente 5 veces, tal como 10 veces, tal como 25 veces, especialmente de 50 veces, y en particular 100 veces o más, mayor para una molécula diana que su afinidad para una molécula no diana. En algunas realizaciones, la unión específica entre un anticuerpo u otro agente de unión y un antígeno significa una afinidad de unión de al menos 10^6 M^{-1} . Los anticuerpos, por ejemplo, se pueden unir con afinidades de al menos aproximadamente 10^7 M^{-1} , tales como entre aproximadamente 10^8 M^{-1} a aproximadamente 10^9 M^{-1} , de aproximadamente 10^9 M^{-1} a aproximadamente 10^{10} M^{-1} , o de aproximadamente 10^{10} M^{-1} a aproximadamente 10^{11} M^{-1} .

La afinidad se calcula como $K_d = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ (k_{off} es la constante de la velocidad de disociación, k_{on} es la constante de la velocidad de asociación y K_d es la constante de equilibrio. Se puede determinar, la afinidad en equilibrio, mediante la medición de la fracción unida (r) del ligando marcado en varias concentraciones (c). Los datos se representan mediante la ecuación de Scatchard: $r/c = K(nr)$:

dónde

r = moles de ligando unido/mol del receptor en equilibrio;

c = concentración del ligando libre en equilibrio;

K = constante de asociación en equilibrio; y

n = número de sitios de unión del ligando por molécula receptora

Mediante el análisis gráfico, r/c se representa en el eje Y contra r en el eje X produciendo así una representación de Scatchard. La afinidad es la pendiente negativa de la línea. K_{off} se puede determinar por medio de la competencia del ligando marcado unido con un ligando en exceso no marcado (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 6,316,409). La afinidad de un agente de direccionamiento para su molécula diana es, por ejemplo, al menos

aproximadamente 1×10^{-6} moles/litro, tal como al menos aproximadamente a 1×10^{-7} moles/litro, tal como al menos aproximadamente 1×10^{-8} moles/litro, especialmente al menos aproximadamente 1×10^{-9} moles/litro, y en particular al menos aproximadamente 1×10^{-10} moles/litro. La medición de la afinidad del anticuerpo por el análisis de Scatchard es bien conocida en la técnica. Véase, por ejemplo van Erp *et al.*, *J. Immunoassay* 12: 425-43, 1991; Nelson and Griswold, *Comput. Methods Programs Biomed.* 27: 65-8, 1988.

Los métodos conocidos para los expertos en el arte se utilizan para producir anticuerpos que reconocen el tallo de matriptasa, un análogo del tallo de matriptasa, un polipéptido relacionado del tallo de matriptasa, o un fragmento o derivado de cualquiera de los anteriores. Un experto en el arte reconocerá que muchos procedimientos están disponibles para la producción de anticuerpos, por ejemplo, como se describe en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988), Cold Spring Harbor, N.Y. Un experto en el arte apreciará también que los fragmentos de unión o fragmentos Fab que imitan anticuerpos también se pueden preparar a partir de la información genética mediante diversos procedimientos (*Antibody Engineering: A Practical Approach* (Borrebæck, C., ed.), 1995, Oxford University Press, Oxford; *J. Immunol.* 149, 3914-3920 (1992)).

En una realización de la invención, se producen anticuerpos para un dominio específico del tallo de matriptasa. En una realización específica, los fragmentos hidrófilos del tallo de matriptasa se utilizan como inmunógenos para la producción de anticuerpos.

En la producción de anticuerpos, la selección del anticuerpo deseado se puede lograr mediante técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas). Por ejemplo, para seleccionar anticuerpos que reconocen un dominio específico del tallo de matriptasa, se pueden ensayar hibridomas generados para un producto que se une a un fragmento del tallo de matriptasa que contiene tal dominio. Para la selección de un anticuerpo que se une específicamente a un primer homólogo del tallo de matriptasa pero que no se une específicamente a (o se une menos ávidamente a) un segundo homólogo del tallo de matriptasa, se puede seleccionar sobre la base de la unión positiva al primer homólogo del tallo de matriptasa y una falta de unión (o unión reducida a) con el segundo homólogo del tallo de matriptasa. Del mismo modo, para la selección de un anticuerpo que se une específicamente al tallo de matriptasa pero que no se une específicamente (o se une menos ávidamente a) a una isoforma diferente de la misma proteína (tal como una glicofoma diferente que tiene el mismo péptido central como el tallo de matriptasa), se puede seleccionar sobre la base en la unión positiva al tallo de matriptasa y una falta de unión (o unión reducida a) con la isoforma diferente (por ejemplo, una glicofoma diferente). Por lo tanto, la presente invención provee un anticuerpo (tal como un anticuerpo monoclonal) que se une con mayor afinidad (por ejemplo al menos 2 veces, tal como al menos 5 veces, particularmente al menos 10 veces mayor afinidad) al tallo de matriptasa que a una isoforma diferente o isoformas (por ejemplo glicofomas) del tallo de matriptasa. Del mismo modo, para la selección de un anticuerpo que se une específicamente el tallo de matriptasa pero que no se une específicamente (o se une menos ávidamente a) a la matriptasa de longitud completa (como se define por la SEQ ID No: 1), se puede seleccionar sobre la base de la unión positiva al tallo de matriptasa y una falta de unión (o unión reducida a) la matriptasa de longitud completa. Por lo tanto, la presente invención provee un anticuerpo (tal como un anticuerpo monoclonal) que se une con mayor afinidad (por ejemplo al menos 2 veces, tal como al menos 5 veces, particularmente al menos 10 veces mayor afinidad) al tallo de matriptasa que a la matriptasa de longitud completa.

Los anticuerpos policlonales que se pueden usar en los métodos de la invención son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpos derivadas de los sueros de animales inmunizados. El suero inmune no fraccionado también se puede utilizar. Varios procedimientos conocidos en la técnica se pueden utilizar para la producción de anticuerpos policlonales para el tallo de matriptasa, un fragmento del tallo de matriptasa, un polipéptido relacionado con el tallo de matriptasa, o un fragmento de un polipéptido relacionado con el tallo de matriptasa. Por ejemplo, una forma es purificar polipéptidos de interés o sintetizar los polipéptidos de interés utilizando, por ejemplo, métodos de síntesis de péptidos en fase sólida bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo *Guide to Protein Purification*, Murray P. Deutcher, ed., *Meth. Enzymol.* Vol 182 (1990); *Solid Phase Peptide Synthesis*, Greg B. Fields ed., *Meth. Enzymol.* Vol 289 (1997); Kiso *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo) 38: 1192-99, 1990; Mostafavi *et al.*, *Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids* 1: 255-60, 1995; Fujiwara *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo) 44: 1326-31, 1996. Los polipéptidos seleccionados se pueden utilizar para inmunizar por medio de la inyección de diversos animales huésped, incluyendo pero no limitando a conejos, ratones, ratas, etc., para generar anticuerpos policlonales o monoclonales. Si el tallo de matriptasa se purifica por electroforesis en gel, el tallo de matriptasa se puede utilizar para la inmunización con o sin extracción previa del gel de poliácridamida. Varios adyuvantes (i.e. inmunoestimulantes) se pueden usar para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie huésped, incluyendo, pero no limitando a, adyuvante de Freund completo o incompleto, un gel mineral tal como hidróxido de aluminio, sustancias de superficie activa tales como lisolecitina, poliol plurónico, un polianión, un péptido, una emulsión de aceite, hemocianina de lapa californiana, dinitrofenol, y un adyuvante tal como BCG (bacilo de Calmette-Guerin) o *Corynebacterium parvum*. Los adyuvantes adicionales también son bien conocidos en la técnica.

Para la preparación de anticuerpos monoclonales (mAb) dirigidos hacia el tallo de matriptasa, un fragmento del tallo de matriptasa, un polipéptido relacionado con el tallo de matriptasa, o un fragmento de un polipéptido relacionado con el

- tallos de matriptasa, se puede utilizar cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en cultivo. Por ejemplo, la técnica del hibridoma desarrollada originalmente por Kohler and Milstein (1975, *Nature* 256:495-497), así como la técnica de trioma, la técnica del hibridoma de células B humanas (Kozbor et al., 1983, *Immunology Today* 4:72), y la técnica de hibridoma de EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., 1985, in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Tales anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de los mismos. La producción de hibridoma de los mAbs de la invención se puede cultivar *in vitro* o *in vivo*. En una realización adicional de la invención, los anticuerpos monoclonales se pueden producir en animales libres de gérmenes utilizando la tecnología conocida (PCT/US90/02545).
- Los anticuerpos monoclonales incluyen, pero no se limitan a anticuerpos monoclonales humanos y anticuerpos monoclonales quiméricos (por ejemplo, quimeras humano-ratón). Un anticuerpo quimérico es una molécula en donde diferentes porciones se derivan de diferentes especies animales, tales como los que tienen una región constante de inmunoglobulina humana y una región variable derivada de un mAb murino. (Véase, por ejemplo Cabilly et al, Patente de los Estados Unidos No.4,816,567; and Boss et al., Patente de los Estados Unidos No. 4,816,397). Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpos de especies no humanas que tienen una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) a partir de la especie no humana y una región marco de una molécula de inmunoglobulina humana. (Véase, por ejemplo Queen, patente de los Estados Unidos No. 5,585,089).
- Los anticuerpos monoclonales y quiméricos humanizados se pueden producir por técnicas de ADN recombinantes conocidas en la técnica, por ejemplo utilizando métodos descritos en Publicación PCT No. WO 87/02671; Solicitud de la Patente Europea 184,187; Solicitud de la Patente Europea 171,496; Solicitud de la Patente Europea 173,494; Publicación PCT No. WO 86/01533; Patente de los Estados Unidos No. 4,816,567; Solicitud de la Patente Europea 125,023; Better et al., 1988, *Science* 240:1041-1043; Liu et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-3443; Liu et al., 1987, *J. Immunol.* 139:3521-3526; Sun et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:214-218; Nishimura et al., 1987, *Canc. Res.* 47:999-1005; Wood et al., 1985, *Nature* 314:446-449; y Shaw et al., 1988, *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-1559; Morrison, 1985, *Science* 229:1202-1207; Oi et al., 1986, *Bio/Techniques* 4:214; Patente de los Estados Unidos 5,225,539; Jones et al., 1986, *Nature* 321:552-525; Verhoeyan et al. (1988) *Science* 239:1534; y Beidler et al., 1988, *J. Immunol.* 141:4053-4060.
- Los anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables para el tratamiento terapéutico de los sujetos humanos. Tales anticuerpos se pueden producir utilizando ratones transgénicos que son incapaces de expresar genes de la cadena pesada y ligera de inmunoglobulina endógena, pero que pueden expresar genes de cadena pesada y ligera humanos. Los ratones transgénicos se inmunizan de la manera normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo, todo o una porción del tallo de matriptasa. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno se pueden obtener utilizando tecnología de hibridoma convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana albergados por los ratones transgénicos se reordenan durante la diferenciación de células B, y posteriormente experimentan cambio de clase y mutación somática. Por lo tanto, utilizando dicha técnica, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para una visión general de esta tecnología para la producción de anticuerpos humanos, véase Lonberg and Huszar (1995, *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93). Para una discusión detallada de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para producir tales anticuerpos, véase, por ejemplo la Patente de los Estados Unidos 5,625,126; la Patente de los Estados Unidos 5,633,425; la Patente de los Estados Unidos 5,569,825; la Patente de los Estados Unidos 5,661,016; y la Patente de los Estados Unidos 5,545,806.. Además, las compañías tales como Medarex (Princeton, NJ) se pueden encargar de proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado utilizando tecnología similar a la descrita anteriormente.
- Los anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo seleccionado se pueden generar utilizando una técnica denominada "selección guiada". En este enfoque un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, se utiliza para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo. (Jespers et al. (1994) *Bio/technology* 12:899-903).
- Los anticuerpos de la presente invención también se pueden generar mediante el uso de la tecnología de expresión en fagos para producir y seleccionar bibliotecas de polipéptidos para la unión a una diana seleccionada. Véase, por ejemplo Cwirla et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6378-82, 1990; Devlin et al., *Science* 249, 404-6, 1990, Scott and Smith, *Science* 249, 386-88, 1990; y Ladner et al., Patente de los Estados Unidos No. 5,571,698. Un concepto básico de los métodos de expresión en fagos es el establecimiento de una asociación física entre el ADN que codifica un polipéptido que se seleccionan y el polipéptido. Esta asociación física es proporcionada por la partícula de fago, que muestra un polipéptido como parte de una cápside que encierra el genoma del fago que codifica el polipéptido. El establecimiento de una asociación física entre polipéptidos y su material genético permite la selección de masa simultánea de muy grandes números de fago que llevan diferentes polipéptidos. Los fagos que presentan un polipéptido con afinidad a una diana se unen a la diana y estos fagos se enriquecen mediante la selección de afinidad por la diana. La identidad de los polipéptidos mostrados a partir de estos fagos se puede determinar a partir de sus respectivos

genomas. Utilizando estos métodos un polipéptido identificado como que tiene una afinidad de unión para una diana deseada puede entonces ser sintetizada a granel por medios convencionales. Véase, por ejemplo la Patente de los Estados Unidos No. 6,057,098. En particular, tal fago se puede utilizar para mostrar dominios de unión a antígeno expresados a partir de un repertorio o biblioteca de anticuerpos combinatoria (por ejemplo, humano o murino). El fago que expresa un dominio de unión a antígeno que se une al antígeno de interés se puede seleccionar o identificar con antígeno, por ejemplo, utilizando antígeno marcado o antígeno unido o capturado a una superficie sólida o perla. Los fagos usados en estos métodos son fagos por lo general filamentosos incluyendo dominios de unión fd y M13 expresados del fago con Fab, Fv o dominios de anticuerpos Fv estabilizados con disulfuro fusionados recombinantemente a ya sea el gen del fago III o la proteína del gen VIII. Métodos de expresión en fagos que se pueden usar para hacer los anticuerpos de la presente invención incluyen los revelados en Brinkman et al., J. Immunol. Methods 182:41-50 (1995); Ames et al., J. Immunol. Methods 184:177-186 (1995); Kettleborough et al., Eur. J. Immunol. 24:952-958 (1994); Persic et al., Gene 187 9-18 (1997); Burton et al., Advances in Immunology 57:191-280 (1994); Solicitud PCT No. PCT/GB91/01134; Publicaciones PCTs WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y las Patentes de los Estados Unidos Nos. 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727; 5,733,743 y 5,969,108;

Como se describe en las referencias anteriores, después de la selección de fagos, las regiones codificantes del anticuerpo a partir del fago se pueden aislar y utilizar para generar anticuerpos completos, incluyendo anticuerpos humanos, o cualquier otro fragmento de unión a antígeno deseado, y expresar en cualquier huésped deseado, incluyendo células de mamífero, células de insecto, células vegetales, levaduras y bacterias, por ejemplo como se describe en detalle a continuación. Por ejemplo, las técnicas para producir recombinantemente fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂ también se pueden emplear utilizando métodos conocidos en el arte tales como los descritos en la publicación PCT WO 92/22324; Mullinax et al., BioTechniques 12(6):864-869 (1992); y Sawai et al., AJRI 34:26-34 (1995); y Better et al., Science 240:1041-1043 (1988).

Ejemplos de técnicas que se pueden usar para producir Fv de cadena sencilla y anticuerpos incluyen los descritos en las Patentes de los Estados Unidos 4,946,778 y 5,258,498; Huston et al., *Methods in Enzymology* 203:46-88 (1991); Shu et al., *PNAS* 90:7995-7999 (1993); y Skerra et al., *Science* 240:1038-1040 (1988).

La invención provee además el uso de anticuerpos biespecíficos, que se pueden hacer por métodos conocidos en el arte. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada- cadena ligera de la inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Milstein et al., 1983, *Nature* 305:537-539). Debido a la clasificación aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que normalmente se realiza mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante engorrosa, y los rendimientos de producto son bajos. Procedimientos similares se revelan en WO 93/08829, publicado el 13 de mayo de 1993, y en Traunecker et al, 1991, *EMBO J.* 10:3655-3659.

De acuerdo con un enfoque diferente y más preferido, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan a secuencias del dominio constante de inmunoglobulina. La fusión preferiblemente es con un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones de bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de inmunoglobulina de cadena pesada y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se co-transfectan en un organismo huésped apropiado. Esto provee una gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos del polipéptido en realizaciones cuando las relaciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas utilizadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en relaciones iguales resulta en rendimientos elevados o cuando las relaciones no son de significado particular.

En una realización preferida de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que provee una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se encontró que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, como la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo una mitad de la molécula biespecífica provee una manera fácil de separación. Este enfoque se revela en WO 94/04690 publicado el 3 de marzo de 1994. Para más detalles de generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 1986, 121:210.

- La invención provee fragmentos activos funcionalmente, derivados o análogos de las moléculas de inmunoglobulina del tallo de anti-matriptasa. Funcionalmente activo significa que el fragmento, derivado o análogo es capaz de obtener anticuerpos anti-anti-idiotipo (i.e., anticuerpos terciarios) que reconocen el mismo antígeno que es reconocido por el anticuerpo a partir del cual se deriva el fragmento, el derivado o el análogo. Específicamente, en una realización particular, la antigenicidad del idiotipo de la molécula de inmunoglobulina se puede potenciar mediante la delección de secuencias marco y CDR que son terminal C a la secuencia de CDR que reconoce específicamente el antígeno. Para determinar cuáles secuencias de CDR unidas al antígeno, los péptidos sintéticos que contienen las secuencias de CDR se pueden utilizar en ensayos de unión con el antígeno mediante cualquier método de ensayo de unión conocido en la técnica.
- La presente invención provee fragmentos de anticuerpo tales como, pero no limitando a, fragmentos $F(ab')_2$ y fragmentos Fab. Los fragmentos de anticuerpos que reconocen epítomos específicos se pueden generar por técnicas conocidas. Los fragmentos $F(ab')_2$ consisten en la región variable, la región constante de la cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada y se generan por digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo. Los fragmentos Fab se generan reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos $F(ab')_2$. La invención también provee dímeros de cadena pesada y cadena ligera de los anticuerpos de la invención, o cualquier fragmento mínimo del mismo tal como anticuerpos de Fv o de cadena sencilla (SCA) (por ejemplo, como se describe en la Patente de los Estados Unidos 4,946,778; Bird, 1988, Science 242:423-42; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; and Ward et al., 1989, Nature 334:544-54), o cualquier otra molécula con la misma especificidad que el anticuerpo de la invención. Los anticuerpos de cadena sencilla se forman uniendo los fragmentos de cadena pesada y ligera de la región Fv mediante un puente aminoácido, resultando en un polipéptido de cadena sencilla. Se pueden utilizar las técnicas para el montaje de fragmentos Fv funcionales en *E. coli* (Skerra et al., 1988, Science 242:1038-1041).
- En otras realizaciones, la invención provee proteínas de fusión de las inmunoglobulinas de la invención (o fragmentos funcionalmente activos de los mismos), por ejemplo en las cuales la inmunoglobulina se fusiona a través de un enlace covalente (por ejemplo, un enlace peptídico), ya sea en el terminal N o el terminal C a una secuencia de aminoácidos de otra proteína (o porción del mismo, preferiblemente al menos una porción de 10, 20 o 50 aminoácidos de la proteína) que no es la inmunoglobulina. Preferiblemente la inmunoglobulina, o fragmento de la misma, se une covalentemente a la otra proteína en el extremo N del dominio constante. Como se ha indicado anteriormente, tales proteínas de fusión pueden facilitar la purificación, aumentar la vida media *in vivo*, y mejorar la entrega de un antígeno a través de una barrera epitelial al sistema inmune.
- Las inmunoglobulinas de la invención incluyen análogos y derivados que están modificados, i.e. por la unión covalente de cualquier tipo de molécula siempre que dicha unión covalente no perjudique la unión inmuno-específica. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados y análogos de las inmunoglobulinas incluyen aquellos que se han modificado adicionalmente, por ejemplo por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivación por medio de grupos conocidos de protección/bloqueo, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc.
- Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas se puede llevar a cabo mediante técnicas conocidas, incluyendo, pero no limitando a la escisión química específica, acetilación, formilación, etc. Adicionalmente, el análogo o derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.
- Los anticuerpos anteriores se pueden usar en métodos conocidos en el arte relativos a la localización y actividad del tallo de matriptasa, por ejemplo, para formación de imágenes, medición de los niveles del mismo en muestras fisiológicas apropiadas, en métodos de diagnóstico, etc.
- Un proceso específico para la preparación de un anticuerpo monoclonal que es capaz de unirse inmuno-específicamente al tallo de matriptasa comprende la etapa de inmunizar un animal no humano (por ejemplo, ratón o conejo) con una proteína que es el tallo de matriptasa (por ejemplo, como se define por una cualquiera de las SEQ ID Nos 10-13) o un fragmento inmunogénico del mismo o una proteína de fusión que contiene el tallo de matriptasa o un fragmento inmunogénico de la misma o la inmunización de un animal no humano con células que expresan dicha proteína en cualquiera de los casos, opcionalmente junto con un inmunoestimulante (por ejemplo, alumbre, CpG, adyuvante de Ribi etc). Una proteína de fusión de ejemplo contiene el tallo de matriptasa o un fragmento inmunogénico del mismo junto con una secuencia señal de osteonectina terminal N, y el sitio de escisión del FactorXa terminal C y FcG1 humano. Por ejemplo, el animal no humano puede ser inmunizado con una proteína de fusión, tal como se define por SEQ ID No 15, o células que expresan dicha proteína. Otras etapas del proceso por lo general pueden comprender el aislamiento de células productoras de anticuerpos a partir de dicho animal, e inmortalizarlos mediante la fusión con células inmortales (por ejemplo, la línea celular de mieloma Sp2/0 (ATCC CRL 1581)) para producir un hibridoma productor de anticuerpos. Entonces, los anticuerpos se pueden aislar a partir de dicho hibridoma. Si se desea, la especificidad de los anticuerpos se puede evaluar mediante la determinación de su capacidad para unirse inmuno-específicamente al tallo de matriptasa (véase por ejemplo el Ejemplo 3) ya sea antes o después de la formación de hibridomas. Como se describió anteriormente, los animales transgénicos (por ejemplo ratones transgénicos) se pueden utilizar para producir anticuerpos completamente humanos. Tales animales transgénicos están adaptados para expresar genes de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humanos y genes de cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina no endógenos.

Alternativamente, los anticuerpos de animales no humanos se pueden humanizar. Un anticuerpo monoclonal humanizado que es capaz de unirse inmunoespecíficamente al tallo de matriptasa adecuadamente se caracteriza por tener una o más CDR (por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o 6 o más, por ejemplo 1, 2 o 3 o más para cada una de las cadenas ligera y pesada) de dicho anticuerpo monoclonal animal no humano. Los anticuerpos humanizados pueden tener las CDR de dicho anticuerpo monoclonal y regiones marco humanas o humanizadas de la región variable. Cuando una región constante está presente este (estos) será(n) por lo general humanos. Los anticuerpos completos (bivalentes) se pueden utilizar o se pueden preparar derivados de los mismos (por ejemplo, fragmentos Fab, derivados ScFv) como se describió anteriormente.

Producción de un Afficuerpo® para el tallo de matriptasa

- 10 Las moléculas Afficuerpo® representan una nueva clase de proteínas de afinidad basadas en un dominio de proteína de 58 residuos de aminoácidos, derivados de uno de los dominios de unión a IgG de la proteína A estafilocócica. Este dominio de manido de tres hélices se ha utilizado como un andamio para la construcción de bibliotecas combinatorias de fagémidos, a partir de la cual variantes de Afficuerpo® que se dirigen a las moléculas deseadas se pueden seleccionar utilizando la tecnología de expresión en fagos (Nord K, Gunneriusson E, Ringdahl J, Stahl S, Uhlen M, Nygren PA, Binding proteins selected from combinatorial libraries of an α -helical bacterial receptor domain, Nat Biotechnol 1997;15:772-7. Ronmark J, Gronlund H, Uhlen M, Nygren PA, Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A, Eur J Biochem 2002;269:2647-55.). La estructura simple, robusta de moléculas Afficuerpo® en combinación con su bajo peso molecular (6 kDa), la hace apropiada para una amplia variedad de aplicaciones, por ejemplo, como reactivos de detección (Ronmark J, Hansson M, Nguyen T, et al, Construction and characterization of affibody-Fc chimeras produced in Escherichia coli, J Immunol Methods 2002;261:199-211) y para inhibir las interacciones del receptor (Sandstorm K, Xu Z, Forsberg G, Nygren PA, Inhibition of the CD28-CD80 co-stimulation signal by a CD28- binding Afficuerpo® ligand developed by combinatorial protein engineering, Protein Eng 2003;16:691-7). Más detalles de Afficuerpo® y métodos de producción de los mismos se pueden obtener por referencia a la Patente de los Estados Unidos No. 5831012.
- 25 El Afficuerpo® marcado también puede ser útil en aplicaciones de formación de imágenes para determinar la abundancia de las isoformas.

Producción de anticuerpos de dominio para el tallo de matriptasa

- 30 Los anticuerpos de dominio (dAbs) son las unidades de unión funcional más pequeñas de anticuerpos, que corresponden a las regiones variables de cualquiera de las cadenas pesadas (VH) o ligeras (VL) de anticuerpos humanos. Los anticuerpos de dominio tienen un peso molecular de aproximadamente 13 kDa. Domantis ha desarrollado una serie de bibliotecas grandes y altamente funcionales de dAbs de VH y VL completamente humanos (más de diez millones de secuencias diferentes en cada biblioteca), y utiliza estas bibliotecas para seleccionar dAb que son específicos para dianas terapéuticas. En contraste con muchos anticuerpos convencionales, los anticuerpos de dominio son bien expresados en bacterias, levaduras, y sistemas de células de mamíferos. Otros detalles de anticuerpos de dominios y métodos de producción de los mismos se pueden obtener por referencia a la Patente de los Estados Unidos 6,291,158; 6,582,915; 6,593,081; 6,172,197; 6,696,245; Serie de Estados Unidos No. 2004/0110941; Solicitud de patente europea No. 1433846 y Patentes Europeas 0368684 y 0616640; WO05/035572, WO04/101790, WO04/081026, WO04/058821, WO04/003019 y WO03/002609.

Producción de un nanocuerpo® para el tallo de matriptasa

- 40 Los Nanocuerpos® son proteínas terapéuticas derivadas de anticuerpos que contienen las propiedades funcionales y estructurales únicas de anticuerpos de cadena pesada de origen natural. Estos anticuerpos de cadena pesada contienen un único dominio variable (VHH) y dos dominios constantes (C_H2 y C_H3). Es importante destacar que, el dominio VHH clonado y aislado es un polipéptido perfectamente estable que alberga la capacidad total de unión al antígeno del anticuerpo de cadena pesada inicial. Los Nanocuerpos tienen una alta homología con los dominios VH de los anticuerpos humanos y pueden ser aún más humanizados sin ninguna pérdida de actividad. Es importante destacar que, los Nanocuerpos tienen un bajo potencial inmunogénico, que ha sido confirmado en estudios de primates con los compuestos de plomo Nanocuerpos®.

- 50 Los Nanocuerpos® combinan las ventajas de los anticuerpos convencionales con características importantes de fármacos de moléculas pequeñas. Al igual que los anticuerpos convencionales, Los nanocuerpos® muestran una alta especificidad diana, elevada afinidad por el blanco y baja toxicidad inherente. Sin embargo, como fármacos de moléculas pequeñas pueden inhibir las enzimas y las hendiduras de los receptores de fácil acceso. Adicionalmente, los nanocuerpos® son extremadamente estables, se pueden administrar por medios distintos de la inyección (véase por ejemplo WO 04/041867) y son fáciles de fabricar. Otras ventajas de nanocuerpos® incluyen reconocer epítopos no comunes u ocultos, como resultado de su pequeño tamaño, la unión en las cavidades o sitios activos de dianas de

proteína con alta afinidad y selectividad debido a su, flexibilidad de formato de fármacos 3-dimensional únicos, la adaptación de la vida media y la facilidad y la velocidad del descubrimiento de fármacos.

Los nanocuerpos® están codificados por los genes únicos y se producen de manera eficiente en casi todos los huéspedes procariotas y eucariotas, por ejemplo, *E. coli* (véase, por ejemplo US 6,765,087), mohos (por ejemplo *Aspergillus* o *Trichoderma*) y levadura (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Hansenula* o *Pichia*) (véase, por ejemplo US 6,838,254). El proceso de producción es escalable y se han producido cantidades de multi-kilogramos de Nanocuerpos®. Debido a que los Nanocuerpos® muestran una estabilidad superior en comparación con los anticuerpos convencionales, se pueden formular como una solución lista para su uso, de larga vida útil.

El método Nanoclon (véase por ejemplo WO 06/079372) es un método propio para generar Nanocuerpos® contra una diana deseada, basado en la selección completamente automatizada de las células B.

Producción de un unicuerpo® para el tallo de matriptasa

Un unicuerpo® es otra tecnología de fragmento de anticuerpo; sin embargo éste se basa en la eliminación de la región bisagra de anticuerpos IgG4. La delección de la región de bisagra da como resultado una molécula que es esencialmente la mitad del tamaño de anticuerpos IgG4 tradicionales y tiene una región de unión univalente en lugar de la región de unión bivalente de anticuerpos IgG4.

También es bien conocido que los anticuerpos IgG4 son inertes y por lo tanto no interactúan con el sistema inmune, que puede ser ventajoso para el tratamiento de enfermedades en las que no se desea una respuesta inmune, y esta ventaja se pasa sobre un unicuerpo®. Por ejemplo, un unicuerpo® puede funcionar para inhibir o silenciar, pero no destruyen, las células a las que están unidos. Además, la unión de unicuerpo® a las células cancerosas no las estimulan para proliferar. Además, debido a que un unicuerpo® tiene aproximadamente la mitad del tamaño de anticuerpos IgG4 tradicionales, pueden mostrar una mejor distribución sobre tumores sólidos más grandes con una eficacia potencialmente ventajosa. Un unicuerpo® se elimina del cuerpo a un ritmo similar a los anticuerpos IgG4 enteros y son capaces de unirse con una afinidad similar por sus antígenos como anticuerpos completos. Más detalles de un unicuerpo® se pueden obtener por referencia a la patente WO2007/059782.

Producción de un DARPin® para el tallo de matriptasa

Un DARPin® (Proteína de Repetición de Anquirina Diseñada) es un ejemplo de una tecnología DRP mimética de anticuerpo (Proteína Diseñada con repeticiones) que se ha desarrollado para explotar las capacidades de unión de polipéptidos que no son anticuerpos. Las proteínas repetidas tales como proteínas de repetición ricas en anquirina o leucina, son moléculas de unión ubicuas, que producen, anticuerpos diferentes, intra y extracelularmente. Su arquitectura modular única ofrece la repetición de unidades estructurales (repeticiones), que se apilan para formar dominios repetidos alargados que muestran las superficies de unión diana variables y modulares. Sobre la base de esta modularidad, bibliotecas combinatorias de polipéptidos con especificidades de unión altamente diversificadas se pueden generar. Esta estrategia incluye el diseño consenso de repeticiones autocompatibles que muestran residuos superficiales variables y su montaje al azar en dominios repetidos.

Se pueden producir DARPin® en sistemas de expresión bacteriana con rendimientos muy altos y pertenecen a las proteínas más estables que se conocen. Se han seleccionado DARPin® de alta afinidad, altamente específicos, a un amplio rango de proteínas diana, incluyendo receptores humanos, citoquinas, quinasas, proteasas humanas, virus y proteínas de membrana. Se puede obtener un DARPin® que tiene afinidad en el rango de dígito único nanomolar a picomolar.

Se han utilizado DARPin® en un amplio rango de aplicaciones, incluyendo ELISA, ELISA sándwich, análisis citométrico de flujo (FACS), inmunohistoquímica (IHC), aplicaciones de chip, purificación por afinidad o transferencia Western. También se ha demostrado que los DARPin® son altamente activos en el compartimento intracelular por, ejemplo, como proteínas marcadoras intracelulares fusionados a la proteína fluorescente verde (GFP). Los DARPin® se utilizaron además para inhibir la entrada viral con IC50 en el rango pM. Los DARPin® no sólo son ideales para bloquear las interacciones proteína a proteína, sino que inhiben también las enzimas. Se han inhibido con éxito las proteasas, quinasas y transportadoras, en la mayoría de los casos un modo de inhibición alostérica. Los enriquecimientos muy rápidos y específicos en el tumor y las muy favorable relaciones de tumor a sangre hacen que los DARPin® sean muy apropiados para los diagnósticos *in vivo* o los enfoques terapéuticos.

Información adicional con respecto DARPin® y otras tecnologías de DRP se pueden encontrar en la Publicación de Solicitud de la Patente de los Estados Unidos No.2004/0132028, y la Publicación de Solicitud de la Patente Internacional No. WO 02/20565.

Producción de una Anticalina® para el tallo de matriptasa

Una Anticalina® es un mimético de anticuerpo adicional. Sin embargo, en este caso, la especificidad de unión se deriva de lipocalinas, una familia de proteínas de bajo peso molecular que es natural y abundantemente expresada en los tejidos humanos y fluidos corporales. Las lipocalinas han evolucionado para llevar a cabo una serie de funciones *in vivo* asociadas con el transporte fisiológico y el almacenamiento de compuestos químicamente sensibles o insolubles. Las lipocalinas tienen una estructura intrínseca robusta que comprende un barril-β altamente conservado que soporta cuatro bucles en un extremo de la proteína. Estos bucles forman la entrada de un bolsillo de unión y las diferencias conformacionales en esta parte de la molécula son las responsables de la variación en la especificidad de unión entre las lipocalinas individuales.

Aunque la estructura general de los bucles hipervariables soportados por un marco de lámina β conservada es reminiscente de las inmunoglobulinas, las lipocalinas difieren considerablemente de anticuerpos en términos de tamaño, ya que están compuestas por una cadena polipeptídica única de 160-180 aminoácidos que es marginalmente más grande de un dominio de inmunoglobulina único.

Las lipocalinas son clonadas y sus bucles son sometidos a manipulación de ingeniería genética con el fin de crear una Anticalina®. Se han generado bibliotecas de Anticalinas® estructuralmente diversas y la visualización de Anticalina® permite la selección y el cribado de la función de unión, seguido de la expresión y la producción de proteínas solubles para su posterior análisis en sistemas procariotas o eucariotas. Los estudios han demostrado con éxito que se puede desarrollar una Anticalina® que es específica para virtualmente cualquier proteína diana humana; que pueden ser aislados y se pueden obtener afinidades de unión en el rango nanomolar o más alto.

Una Anticalina® también se puede formatear como una proteína de direccionamiento dual, una denominada Duocalina®. Una Duocalina® se une a dos dianas terapéuticas separadas en una proteína monomérica que es fácilmente producida utilizando los procesos estándar de fabricación al tiempo que conserva la especificidad diana y afinidad independientemente de la orientación estructural de sus dos dominios de unión.

La modulación de dianas múltiples a través de una molécula única es particularmente ventajosa en enfermedades que se sabe que involucran más de un solo factor causal. Por otra parte, los formatos de unión bi- o polivalentes tal como la Duocalina® tienen un potencial significativo en el direccionamiento de las moléculas de la superficie celular en la enfermedad, la mediación de efectos agonistas sobre las vías de transducción de señales o inducir efectos de internalización mejorada a través de la unión y la agrupación de los receptores de la superficie celular. Además, la elevada estabilidad intrínseca de la Duocalina® es comparable a una Anticalina® monomérica, ofreciendo una formulación flexible y la potencial administración de la Duocalina®.

Información adicional con respecto a las Anticalinas® se puede encontrar en la Patente de los Estados Unidos No.7,250,297 y la Publicación de Solicitud de la Patente Internacional No. WO 99/16873.

Producción de Avímeros para el tallo de matriptasa

Los Avímeros han evolucionado de una gran familia de dominios receptores extracelulares humanos mediante entremezclado de exón *in vitro* y expresión en fagos, generando proteínas multidominio con propiedades de unión e inhibidoras. Al unir múltiples dominios de unión independientes, se ha demostrado que se crea avidéz y da como resultado una mejor afinidad y especificidad en comparación con las proteínas convencionales de unión de un solo epítipo. Otras ventajas potenciales incluyen la producción simple y eficaz de moléculas específicas multidianas en Escherichiacoli, termoestabilidad mejorada y resistencia a las proteasas. Se han obtenido Avímeros con afinidades subnanomolares contra una variedad de dianas.

Información adicional con respecto a los Avímeros se puede encontrar en la Publicación de la Solicitud de la Patente de los Estados Unidos Nos. 2006/0286603, 2006/0234299, 2006/0223114, 2006/0177831, 2006/0008844, 2005/0221384, 2005/0164301, 2005/0089932, 2005/0053973, 2005/0048512, 2004/0175756..

Producción de Versacuerpos para el tallo de matriptasa

Los Versacuerpos son pequeñas proteínas de 3 - 5 kDa con > 15% de cisteínas, que forman un andamio de alta densidad de disulfuro, reemplazando el núcleo hidrofóbico que tienen las proteínas típicas. La sustitución de un gran número de aminoácidos hidrofóbicos, que comprende el núcleo hidrofóbico, con un pequeño número de disulfuros da como resultado que una proteína sea más pequeña, más hidrófila (menos agregación y la unión no específica), más resistente a las proteasas y de calor, y tiene una menor densidad de epítopos de células T, debido a que los residuos que contribuyen más a la presentación de MHC son hidrofóbicos. Es bien conocido que estas cuatro propiedades afectan la inmunogenicidad, y se espera que conjuntamente causen una gran disminución de inmunogenicidad.

La inspiración para Versacuerpos proviene de los productos biofarmacéuticos inyectables naturales producidas por las sanguijuelas, serpientes, arañas, escorpiones, caracoles y anémonas, que son conocidos por exhibir inesperadamente

baja inmunogenicidad. Comenzando con las familias de proteínas naturales seleccionadas, por diseño y por la selección del tamaño, hidrofobicidad, el procesamiento de antígenos proteolítica, y la densidad de epítipo se minimizan a niveles muy por debajo de la media de las proteínas inyectables naturales.

5 Dada la estructura de los Versacuerpos, estos miméticos de anticuerpos ofrecen un formato versátil que incluye multi-valencia, multi-especificidad, diversos mecanismos de vida media, módulos de direccionamiento del tejido y la ausencia de la región Fc del anticuerpo. Además, los Versacuerpos se fabrican en *E. coli* con altos rendimientos, y debido a su hidrofilia y pequeño tamaño, los Versacuerpos son altamente solubles y se puede formular en concentraciones elevadas. Los Versacuerpos son excepcionalmente estables al calor (pueden ser hervidos) y ofrecen vida útil prolongada.

10 Información adicional con respecto a Versacuerpos se puede encontrar en la Publicación de Solicitud de la Patente de los Estados Unidos No. 2007/0191272.

Expresión de reactivos de afinidad

Expresión de anticuerpos

15 Los anticuerpos de la invención se pueden producir por cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de anticuerpos, en particular, por síntesis química o por expresión recombinante, y se producen preferiblemente mediante técnicas de expresión recombinante..

20 La expresión recombinante de anticuerpos, o fragmentos, derivados o análogos de los mismos, requiere la construcción de un ácido nucleico que codifica el anticuerpo. Si se conoce la secuencia de nucleótidos del anticuerpo, un ácido nucleico que codifica el anticuerpo se puede ensamblar a partir de oligonucleótidos sintetizados químicamente (por ejemplo, como se describe en Kutmeier et al., 1994, BioTechniques 17:242), que, brevemente, implica la síntesis de oligonucleótidos superpuestos que contienen porciones de la secuencia que codifica el anticuerpo, hibridación y ligamiento de esos oligonucleótidos, y después la amplificación de los oligonucleótidos ligados por PCR.

25 Alternativamente, el ácido nucleico que codifica el anticuerpo se puede obtener mediante la clonación del anticuerpo. Si un clon que contiene el ácido nucleico que codifica el anticuerpo particular no está disponible, pero la secuencia de la molécula de anticuerpo es conocida, un ácido nucleico que codifica el anticuerpo se puede obtener a partir de una fuente apropiada (por ejemplo, una biblioteca de ADNc de anticuerpo, o una biblioteca de ADNc generada a partir de cualquier tejido o células que expresan el anticuerpo) mediante la amplificación por PCR utilizando cebadores sintéticos hibridables en los extremos 3' y 5' de la secuencia o por clonación utilizando una sonda de oligonucleótidos específica para la secuencia del gen particular.

30 Si una molécula de anticuerpo que reconoce específicamente un antígeno particular no está disponible (o una fuente para una biblioteca de ADNc para clonar un ácido nucleico que codifica dicho anticuerpo), los anticuerpos específicos para un antígeno particular se pueden generar por cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, mediante la inmunización de un animal, tal como un conejo, para generar anticuerpos policlonales o, más preferiblemente; mediante la generación de anticuerpos monoclonales. Alternativamente, un clon que codifica al menos la porción Fab del anticuerpo se puede obtener mediante la selección de bibliotecas de expresión de Fab (por ejemplo, como se describe en Huse et al., 1989, Science 246:1275-1281) para clones de fragmentos Fab que se unen al antígeno específico o por la selección de bibliotecas de anticuerpos (Véase, por ejemplo, Clackson et al., 1991, Nature 352:624; Hane et al., 1997 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4937).

40 Una vez que se obtiene un ácido nucleico que codifica al menos el dominio variable de la molécula del anticuerpo, se puede introducir en un vector que contiene la secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de la molécula de anticuerpo (véase, por ejemplo, la Publicación PCT WO 86/05807; Publicación PCT WO 89/01036; y la Patente de los Estados Unidos No. 5,122,464). Los vectores que contienen cadena pesada o ligera completa para la co-expresión con el ácido nucleico para permitir la expresión de una molécula de anticuerpo completa también son disponibles. Luego, el ácido nucleico que codifica el anticuerpo se puede utilizar para introducir la sustitución(es) o delección(es) de nucleótidos necesarios para sustituir (o eliminar) los uno o más residuos de cisteína de región variable que participa en un enlace disulfuro intracatenario con un residuo de aminoácido que no contiene un grupo sulfhidrilo. Tales modificaciones se pueden llevar a cabo por cualquier método conocido en la técnica para la introducción de mutaciones específicas o delecciones en una secuencia de nucleótidos, por ejemplo, pero sin limitarse a, mutagénesis química, mutagénesis dirigida al sitio *in vitro* (Hutchinson et al., 1978, J. Biol. Chem. 253:6551), métodos basados en PCT, etc.

50 Además, las técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855; Neuberger et al., 1984, Nature 312:604-608; Takeda et al., 1985, Nature 314:452-454) mediante corte y empalme de genes a partir de una molécula de anticuerpo de ratón de especificidad de antígeno apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada se puede usar. Como se ha descrito

supra, un anticuerpo quimérico es una molécula en donde diferentes porciones se derivan de diferentes especies animales, tales como los que tienen una región variable derivada de un mAb murino y una región constante de anticuerpo humano, por ejemplo, anticuerpos humanizados.

Una vez que se ha obtenido un ácido nucleico que codifica una molécula de anticuerpo de la invención, el vector para la producción de la molécula de anticuerpo se puede producir por tecnología de ADN recombinante utilizando técnicas bien conocidas en la técnica. Por lo tanto, los métodos para preparar la proteína de la invención expresando ácido nucleico que contiene las secuencias de molécula de anticuerpo se describen en el presente documento. Los métodos que son bien conocidos para los expertos en el arte se pueden utilizar para construir vectores de expresión que contienen una molécula de anticuerpo que codifica las secuencias y señales de control transcripcional y traduccional apropiadas de codificación. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas, y recombinación genética *in vivo*. Véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook et al. (1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) y Ausubel et al. (eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY).

El vector de expresión se transfiere a una célula huésped mediante técnicas convencionales y las células transfectadas se cultivan entonces mediante técnicas convencionales para producir un anticuerpo de la invención.

Las células huésped utilizadas para expresar un anticuerpo recombinante de la invención pueden ser ya sea células bacterianas tales como *Escherichia coli*, o, preferiblemente, células eucariotas, especialmente para la expresión de molécula de anticuerpo recombinante completa. En particular, células de mamífero tales como células de ovario de hámster chino (CHO), en conjunción con un vector tal como el principal elemento promotor del gen precoz intermedio del citomegalovirus humano son un sistema de expresión eficaz para anticuerpos (Foecking et al., 1986, Gene 45:101; Cockett et al., 1990, Bio/Technology 8:2).

Se puede utilizar una variedad de sistemas de vectores de expresión en huésped para expresar una molécula de anticuerpo de la invención. Tales sistemas de expresión en huésped representan vehículos por los cuales las secuencias codificantes de interés se pueden producir y posteriormente purificar, pero también representan células que pueden, cuando se transforman o transfectan con las secuencias codificantes de nucleótidos apropiadas, expresan la molécula de anticuerpo de la invención *in situ*. Estos incluyen, pero no se limitan a microorganismos tales como bacterias (por ejemplo *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas con ADN bacteriófago recombinante, ADN de plásmido o vectores de expresión de ADN cósmido que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; levaduras (por ejemplo *Saccharomyces*, *Pichia*) transformadas con vectores de expresión de levadura recombinante que contiene secuencias de codificación de anticuerpo; sistemas de células de insectos infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen las secuencias de codificación del anticuerpo; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo virus mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; o sistemas de células de mamíferos (por ejemplo células COS, CHO, BHK, 293, 3T3) que albergan construcciones de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamíferos (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor 7.5K del virus vaccinia).

En sistemas bacterianos, un número de vectores de expresión se pueden seleccionar ventajosamente dependiendo del uso pretendido para la molécula de anticuerpo que se expresa. Por ejemplo, cuando una gran cantidad de dicha proteína se va a producir, para la generación de composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula de anticuerpo, pueden ser vectores deseables que dirigen la expresión de altos niveles de productos de proteína de fusión que se purifican fácilmente. Tales vectores incluyen, pero no se limitan, a la expresión del vector pUR278 de *E. coli* (Ruther et al., 1983, EMBO J. 2:1791), en el cual la secuencia que codifica el anticuerpo se puede ligar individualmente en el vector en marco con la región codificante *lacZ* de modo que se produce una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye & Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 24:5503-5509); y similares. Los vectores pGEX también se pueden usar para expresar polipéptidos foráneos como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y se pueden purificar fácilmente a partir de células lisadas mediante la adsorción y unión a una matriz de cuentas de glutatión-agarosa seguido de la elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX se diseñan para incluir sitios de escisión de trombina o factor Xa proteasa de modo que el producto génico diana clonado se pueda liberar de la unidad estructural GST..

En un sistema de insecto, virus de la poliedrosis nuclear *Autographa californica* (AcNPV) se utiliza como un vector para expresar genes foráneos. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificante de anticuerpo se puede clonar individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo el gen de polihedrina) del virus y se coloca bajo control de un promotor AcNPV (por ejemplo el promotor de polihedrina). En las células huésped de mamífero, se puede utilizar un número de sistemas de expresión basados en virus (por ejemplo, un sistema de expresión de adenovirus).

Como se discutió anteriormente, se puede escoger una cepa de la célula huésped que module la expresión de las secuencias insertadas, o modifique y procese el producto génico en la forma específica deseada. Tales modificaciones (por ejemplo glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína..

5 Para la producción de alto rendimiento a largo plazo de anticuerpos recombinantes, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, se pueden producir las líneas celulares que expresan de manera estable un anticuerpo de interés mediante la transfección de las células con un vector de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos del anticuerpo y la secuencia de nucleótidos de un seleccionable (por ejemplo, neomicina o higromicina), y seleccionando para la expresión de la marcador seleccionable. Tales líneas celulares diseñadas pueden ser particularmente útiles en la selección y
10 evaluación de compuestos que interactúan directa o indirectamente con la molécula de anticuerpo..

Los niveles de expresión de la molécula de anticuerpo se pueden aumentar mediante la amplificación del vector (para una revisión, véase Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol.3. (Academic Press, New York, 1987)). Cuando un marcador en el sistema vector que expresa el anticuerpo es amplificable, el aumento en el nivel de inhibidor presente en el cultivo de la
15 célula huésped aumentará el número de copias del gen marcador. Puesto que la región amplificada se asocia con el gen del anticuerpo, la producción del anticuerpo también aumentará (Crouse et al., 1983, Mol. Cell. Biol. 3:257)..

La célula huésped puede ser co-transfectada con dos vectores de expresión de la invención, el primer vector que codifica un polipéptido derivado de la cadena pesada y el segundo vector que codifica un polipéptido derivado de la cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permiten la expresión igual
20 de polipéptidos de cadena pesada y ligera. Alternativamente, se puede utilizar un único vector que codifica ambos polipéptidos de cadena pesada y ligera. En tales situaciones, la cadena ligera se debe colocar antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (Proudfoot, 1986, Nature 322:52; Kohler, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197). Las secuencias que codifican para las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc o ADN genómico.

25 Una vez que la molécula de anticuerpo de la invención se ha expresado recombinantemente, se puede purificar por cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de anticuerpo, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad tal como con proteína A o antígeno específico, y cromatografía en columna de exclusión molecular), centrifugación, solubilidad diferencial, o por cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas..

30 Alternativamente, cualquier proteína de fusión se puede purificar fácilmente mediante el uso de un anticuerpo específico para la proteína de fusión que se expresa. Por ejemplo, un sistema descrito por Janknecht et al., permite la purificación fácil de proteínas de fusión no desnaturalizadas expresadas en líneas celulares humanas (Janknecht et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8972-897). En este sistema, el gen de interés se subclona en un plásmido de recombinación de vaccinia de tal manera que el marco de lectura abierto del gen se fusiona traduccionalmente a una etiqueta amino-terminal que consiste en seis residuos de histidina. La etiqueta sirve como un dominio de unión a la matriz para la
35 proteína de fusión. Los extractos de células infectadas con virus vaccinia recombinante se cargan en columnas de Ni²⁺ + ácido nitriloacético de agarosa y las proteínas etiquetadas con histidina se eluyen selectivamente con soluciones reguladoras que contienen imidazol.

Los anticuerpos que son generados por estos métodos entonces pueden ser seleccionados por una primera selección de afinidad y especificidad con el polipéptido purificado de interés y, si es necesario, comparando los resultados con la afinidad y especificidad de los anticuerpos con los polipéptidos que se desea para ser excluidos de la unión. El procedimiento de selección puede implicar la inmovilización de los polipéptidos purificados en pozos separados de placas de microtitulación. La solución que contiene un anticuerpo potencial o grupos de anticuerpos se colocan en los pozos de microtitulación respectivos y se incubó durante aproximadamente 30 min a 2 h. A continuación, los pozos de
40 microtitulación se lavan y un anticuerpo secundario marcado (por ejemplo, un anticuerpo anti-ratón conjugado con fosfatasa alcalina si los anticuerpos aumentados son anticuerpos de ratón) se adicionaron a los pozos y se incubaron durante aproximadamente 30 min y luego se lavan. Se adiciona sustrato a los pozos y una reacción de color aparecerá donde está presente el anticuerpo para el(los) polipéptido(s) inmovilizado(s)..

A continuación, los anticuerpos así identificados se pueden analizar por afinidad y especificidad en el diseño del ensayo
45 seleccionado. En el desarrollo de inmunoensayos para una proteína diana, la proteína diana purificada actúa como un estándar con el que juzgar la sensibilidad y especificidad del inmunoensayo utilizando los anticuerpos que han sido seleccionados. Debido a que la afinidad de unión de diversos anticuerpos puede diferir; ciertos pares de anticuerpos (por ejemplo, en ensayos sándwich) pueden interferir unos con otros estéricamente, etc., el rendimiento del ensayo de un anticuerpo puede ser una medida más importante que la afinidad absoluta y la especificidad de un anticuerpo..

Los expertos en el arte reconocerán que muchos enfoques pueden ser tomados en la producción de anticuerpos o fragmentos de unión y cribado y selección para afinidad y especificidad para los diversos polipéptidos, pero estos enfoques no cambian el alcance de la invención.

Para aplicaciones terapéuticas, los anticuerpos (particularmente anticuerpos monoclonales) pueden ser adecuadamente anticuerpos de animal humano o humanizado (por ejemplo, ratón). Los anticuerpos en animales pueden ser criados en animales utilizando la proteína humana (por ejemplo, el tallo de matriptasa) como inmunógeno. Por lo general, la humanización implica el injerto de CDRs identificadas de esta manera en regiones marco humanas. Normalmente se requiere alguna retromutación posterior para optimizar la conformación de cadenas. Tales procedimientos son conocidos para las persona expertas en el arte.

Expresión de un Afficuerpo®

La construcción de un Afficuerpo® se ha descrito en otra parte (Ronnmark J, Gronlund H, Uhle' n, M., Nygren P.A°, Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A, 2002, Eur. J. Biochem. 269, 2647-2655.), incluyendo la construcción de bibliotecas de expresión en fago Afficuerpo® (Nord, K., Nilsson, J., Nilsson, B., Uhle' n, M. & Nygren, P.A°, A combinatorial library of an a-helical bacterial receptor domain, 1995, Protein Eng. 8, 601-608. Nord, K., Gunneriusson, E., Ringdahl, J., Sta° hl, S., Uhle' n, M. & Nygren, P.A°, Binding proteins selected from combinatorial libraries of an a-helical bacterial receptor domain, 1997, Nat. Biotechnol.15, 772-777.).

Los análisis biosensor para investigar la variantes de Afficuerpo® óptimas usando estudios de unión de biosensores también se ha descrito en otra parte (Ronnmark J, Gronlund H, Uhle' n, M., Nygren P.A°, Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A, 2002, Eur. J. Biochem. 269, 2647-2655.).

Modificaciones de reactivo de afinidad

En la presente invención, reactivos de afinidad del tallo anti-matriptasa tales como anticuerpos o fragmentos de los mismos se conjugan con una unidad estructural terapéutica. Como también se describe en el presente documento, los anticuerpos se pueden conjugar con una unidad estructural de diagnóstico (tal como una etiqueta detectable) y se pueden utilizar para el diagnóstico o para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección se puede facilitar mediante el acoplamiento del anticuerpo a una sustancia detectable (etiqueta). Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, núclidos radiactivos, metales que emiten positrones (para su uso en tomografía por emisión de positrones), e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. Véase en general la Patente de los Estados Unidos No. 4,741,900 para iones metálicos que se pueden conjugar con anticuerpos para su uso como diagnósticos de acuerdo con la presente invención. Las enzimas apropiadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; grupos prostéticos apropiados incluyen estreptavidina, avidina y biotina; materiales fluorescentes apropiados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo y ficoeritrina; materiales luminiscentes apropiados incluyen luminol; materiales bioluminiscentes apropiados incluyen luciferasa, luciferina, y aequorina; y nucleidos radiactivos apropiados incluyen ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹¹¹In y ⁹⁹Tc. Se puede utilizar también ⁶⁸Ga.

Los anticuerpos o fragmentos del tallo de anti-matriptasa de los mismos, así como otros reactivos de afinidad de la invención se conjugan con un agente terapéutico o unidad estructural del fármaco para modificar una respuesta biológica dada. Un agente terapéutico de ejemplo a la que el reactivo de afinidad se puede conjugar es una unidad estructural citotóxica. El agente terapéutico o unidad estructural de fármacos no se debe interpretar como limitada a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la unidad estructural de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, o toxina de la difteria; dicha proteína como el factor de necrosis tumoral, α-interferón, β-interferón, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador del plasminógeno tisular, un agente trombotico o un agente anti-angiogénico, por ejemplo, angiostatina o endostatina; o, un modificador de la respuesta biológica tal como una linfocina, la interleucina-1(IL-1), la interleucina-2 (IL-2), la interleucina-6 (IL-6), factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos (GM-CSF), factor estimulante de colonias granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento nervioso (NGF) u otro factor de crecimiento.

Las técnicas para conjugar tal unidad estructural terapéutica con anticuerpos son bien conocidas, véase, por ejemplo Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And

Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), and Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody- Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62:119-58 (1982).

Alternativamente, un anticuerpo se puede conjugar con un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpos como se describe por Segal en la Patente de los Estados Unidos No. 4,676,980.

- 5 Se puede utilizar, un anticuerpo con o sin una unidad estructural terapéutica conjugada a él, como un agente terapéutico que se administra solo o en combinación con el(los) factor(es) citotóxico(s) y/o citoquina(s).

También se describen anticuerpos totalmente humanos, o humanizados que inducen la citotoxicidad mediada por células dirigidas por anticuerpos (ADCC). Un anticuerpo completamente humano es uno en el cual las secuencias de proteínas están codificadas por secuencias de inmunoglobulina humanas de origen natural, ya sea desde linfocitos B humanos productores de anticuerpos aislados, o de linfocitos B murinos transgénicos de ratones en los que la inmunoglobulina murina de codificación de regiones cromosómicas han sido sustituidos por secuencias humanas ortólogos. Los anticuerpos transgénicos de este último tipo incluyen, pero no se limitan a, HuMab (Medarex, Inc., CA) y Xenomouse (Abgenix Inc., CA). Un anticuerpo humanizado es uno en el cual la región constante de una molécula de anticuerpo no humano de especificidad de antígeno apropiada, se sustituye por la región constante de un anticuerpo humano, preferiblemente del subtipo IgG, con las funciones efectoras apropiadas (Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855; Neuberger et al., 1984, Nature 312:604-608; Takeda et al., 1985, Nature 314:452-454). Las funciones efectoras apropiadas incluyen ADCC, que es un proceso natural mediante el cual los anticuerpos totalmente humanos o anticuerpos humanizados, cuando se unen a dianas en la superficie de las células cancerosas, activan las propiedades de muerte celular de linfocitos que son parte del sistema inmunológico normal. Estos linfocitos activos, llamados células asesinas naturales (NK), utilizan un proceso citotóxico para destruir las células vivas a las que están unidos los anticuerpos. La actividad de ADCC se puede detectar y cuantificar, mediante la medición de la liberación de europio (Eu3 +), a partir de las células vivas marcadas con Eu3 + en presencia de un anticuerpo específico del antígeno y las células mononucleares de sangre periférica extraídos de un sujeto humano vivo, inmunocompetente. El proceso de ADCC se describe en detalle en Janeway Jr. C.A. et al., Immunobiology, 5th ed., 2001, Garland Publishing, ISBN 0-8153-3642-X; Pier G.B. et al., Immunology, Infection, and Immunity, 2004, p246-5; Albanell J. et al., Advances in Experimental Medicine and Biology, 2003, 532:p2153-68 and Weng, W.-K. et al., Journal of Clinical Oncology, 2003, 21:p 3940-3947. Los métodos apropiados para la detección y cuantificación de ADCC se pueden encontrar en Blomberg et al., Journal of Immunological Methods. 1986, 86:p225-9; Blomberg et al., Journal of Immunological Methods. 1986, 21;92:p117-23 and Patel & Boyd, Journal of Immunological Methods. 1995, 184:p29-38.

- 30 Por lo general ADCC implica la activación de las células NK y es dependiente en el reconocimiento de las células recubiertas de anticuerpos por los receptores Fc en la superficie de la célula NK. Los receptores Fc reconocen la porción Fc (cristalina) de anticuerpos tales como IgG, unida específicamente a la superficie de una célula diana. El receptor de Fc que desencadena la activación de la célula NK se llama CD16 o FcγRIIIa. Una vez que el receptor FcγRIIIa se une a la IgG Fc, las células NK liberan citoquinas tales como IFN-γ, y gránulos citotóxicos que contienen perforina y granzimas que entran en la célula diana y promover la muerte celular mediante el desencadenante de la apoptosis.

La inducción de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) por un anticuerpo se puede mejorar mediante modificaciones que alteran las interacciones entre la región constante de anticuerpo (Fc) y diversos receptores que están presentes en la superficie de las células del sistema inmune. Tales modificaciones incluyen la reducción o ausencia de las unidades estructurales de fucosa alfa 1,6-ligada en las cadenas de oligosacáridos complejas que normalmente se adicionan a la Fc de los anticuerpos durante la síntesis natural o recombinante en células de mamífero. En un ejemplo, reactivos de afinidad del tallo anti-matriptasa no fucosilados tales como anticuerpos o fragmentos de los mismos se producen para el propósito de mejorar su capacidad para inducir la respuesta de ADCC.

Las técnicas para la reducción o la ablación de las unidades estructurales de fucosa alfa 1,6-ligada en las cadenas de oligosacáridos de la Fc están bien establecidas. En un ejemplo, el anticuerpo recombinante se sintetiza en una línea celular que se ve afectada en su capacidad para adicionar fucosa en una alfa 1,6 ligada con la N-acetilglucosamina más interna de los oligosacáridos de tipo complejo Fc biantenarío N-ligado. Tales líneas celulares incluyen, pero no se limitan a, el hibridoma de rata YB2/O, que expresa un nivel reducido del gen alfa 1,6-fucosiltransferasa, FUT8. Preferiblemente, el anticuerpo se sintetiza en una línea celular que es incapaz de adicionar unidades estructurales fucosil alfa 1,6 ligado a cadenas de oligosacáridos complejos, debido a la delección de ambas copias del gen FUT8. Tales líneas celulares incluyen, pero no se limitan a, líneas de células CHO/DG44/- FUT8. Las técnicas para sintetizar anticuerpos parcialmente fucosilados, o no fucosilados y reactivos de afinidad se describen en Shinkawa et al., J. Biol. Chem. 278:3466-34735 (2003); Yamane-Ohnuki et al., Biotechnology and Bioengineering 87: 614-22 (2004) y en WO00/61739 A1, WO02/31140 A1 y WO03/085107 A1. En un segundo ejemplo, la fucosilación de un anticuerpo recombinante se reduce o es abolido mediante la síntesis en una línea celular que ha sido manipulada genéticamente para sobreexpresar una glicosil transferasa que modifica las glicoproteínas en un nivel que maximiza la producción de oligosacáridos N-ligados complejos que llevan bisectriz N-acetilglucosamina. Por ejemplo, el anticuerpo se sintetiza en una línea de

células de Ovario de Hámster Chino que expresa la enzima N-acetil glucosamina transferasa III (GnT III). Las líneas celulares transfectadas de forma estable con glicosiltransferasas que modifican las glicoproteínas apropiadas, y los métodos de síntesis de anticuerpos utilizando estas células se describen en WO9954342..

5 Un anticuerpo no fucosilado o reactivo de afinidad se puede utilizar como un agente terapéutico que se administra solo o en combinación con el(los) factor(es) citotóxico(s) y/o citoquina(s)..

10 En una modificación adicional, las secuencias de aminoácidos de la Fc de anticuerpos son modificadas de una manera que mejora la activación de ADCC, sin afectar a la afinidad del ligando. Ejemplos de tales modificaciones se describen en Lazar et al., Proceedings of the National Academy of Sciences 2006, 103:p4005-4010; WO03074679 y WO2007039818. En estos ejemplos, la sustitución de aminoácidos en la Fc de anticuerpos, tales como aspartato de serina en la posición 239, e isoleucina por glutamato en la posición 332, alteró la afinidad de unión de un anticuerpo para los receptores de Fc, lo que lleva a un aumento en la activación de ADCC..

Un reactivo de anticuerpo con una activación de ADCC mejorada debido a sustituciones de aminoácidos se puede utilizar como un agente terapéutico que se administra solo o en combinación con el(los) factor(es) citotóxico(s) y/o citoquina (s).

15 Uso terapéutico del tallo de matriptasa

20 La invención provee el tratamiento o la prevención de diversas enfermedades y trastornos mediante la administración de un compuesto terapéutico. Tales compuestos son anticuerpos (u otros reactivos de afinidad al tallo de matriptasa y fragmentos de los mismos. Una característica importante de la presente invención es la identificación de genes que codifican el tallo de matriptasa involucrados en el cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata o cáncer de útero. El cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata o cáncer de útero se pueden tratar (por ejemplo, para mejorar los síntomas o para retrasar la aparición o progresión) o prevenir mediante la administración de un compuesto terapéutico que reduce la función o expresión del tallo de matriptasa en el tejido procedente de sujetos que tienen cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata o cáncer de útero..

25 En una realización, uno o más anticuerpos (u otros reactivos de afinidad) de acuerdo con la invención, cada uno se une específicamente al tallo de matriptasa se administran solos o en combinación con uno o más compuestos terapéuticos adicionales o tratamientos..

30 Un producto biológico tal como un anticuerpo (u otro reactivo de afinidad) es, por ejemplo, alogénico para el sujeto al que se administra. En una realización, un anticuerpo (u otro reactivo de afinidad) a un tallo humano de matriptasa se administra a un sujeto humano para la terapia (por ejemplo, para mejorar los síntomas o para retardar la aparición o progresión) o la profilaxis.

35 Sin estar limitados por la teoría, se concibe que la actividad terapéutica de anticuerpos (u otros reactivos de afinidad) que se unen específicamente al tallo de matriptasa se puede lograr a través del fenómeno de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) (véase por ejemplo Janeway Jr. C.A. et al., Immunobiology, 5th ed., 2001, Garland Publishing, ISBN 0-8153-3642-X; Pier G.B. et al., Immunology, Infection, and Immunity, 2004, p246-5; Albanell J. et al., Advances in Experimental Medicine and Biology, 2003, 532:p2153-68 and Weng, W.-K. et al., Journal of Clinical Oncology, 2003, 21:p 3940-3947).).

Tratamiento y Prevención del cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata y cáncer de útero

40 El cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata o cáncer de útero se tratan o previenen mediante la administración a un sujeto sospechoso de tener o saber que tiene cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata o cáncer de útero o de estar en riesgo de desarrollar cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata o cáncer de útero de un reactivo de afinidad de acuerdo con la invención que modula (i.e., aumenta o disminuye) el nivel o actividad (i.e., la función) del tallo de matriptasa que es diferencialmente presente en el tejido procedente de sujetos que tienen cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata o cáncer de útero en comparación con el tejido de sujetos libres de cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico , cáncer de próstata y cáncer de útero.

50 La inhibición del tallo de matriptasa para tratar el cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata y cáncer de útero

5 En una realización de la invención, el cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata o cáncer de útero se trata o previene mediante la administración de un compuesto que antagoniza (inhibe) el nivel y/o función del tallo de matriptasa que son elevados en el tejido procedente de sujetos que tienen cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata o cáncer de útero en comparación con el tejido de sujetos libres de cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata y cáncer de útero.

Los compuestos útiles para este propósito son los anticuerpos de tallo de anti-matriptasa (u otros reactivos de afinidad, y fragmentos y derivados que contienen la región de unión del mismo)

10 Tal inhibición se puede, por ejemplo, ensayar *in vitro* o en cultivo celular, pero los ensayos genéticos también se pueden utilizar. Las tecnologías preferidas descritas en este documento también se pueden utilizar para detectar los niveles del tallo de matriptasa antes y después de la administración del compuesto. Ensayos apropiados *in vitro* o *in vivo* se utilizan para determinar el efecto de un compuesto específico y si su administración está indicada para el tratamiento del tejido afectado, tal como se describe con más detalle a continuación.

15 En una realización específica, un compuesto que inhibe la función (actividad) del tallo de matriptasa se administra terapéutica o profilácticamente a un sujeto en donde un nivel aumentado de tejido o actividad funcional del tallo de matriptasa (por ejemplo, mayor que el nivel normal o nivel deseado) se detecta en comparación con el tejido de sujetos con cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata o cáncer de útero que no reciben tratamiento de acuerdo con la invención o para llevar el nivel o la actividad a la encontrada en sujetos libre de
20 cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata y cáncer de útero o un rango de referencia predeterminado. Se pueden utilizar métodos estándar en la técnica para medir el aumento en el nivel o la función del tallo de matriptasa, como se describe anteriormente..

Composiciones terapéuticas y profilácticas y su uso

25 También se revelan métodos de tratamiento (y profilaxis) que comprenden administrar a un sujeto una cantidad eficaz de un compuesto de la invención. En un aspecto particular, el compuesto se purifica sustancialmente (por ejemplo, sustancialmente libre de sustancias que limitan su efecto o producen efectos secundarios no deseados). El sujeto es, por ejemplo, un animal, incluyendo pero no limitando a animales tales como vacas, cerdos, caballos, gallinas, gatos, perros, etc., y es, por ejemplo, un mamífero, tal como un humano. En una realización específica, un mamífero no humano es el sujeto.

30 Se conocen varios sistemas de entrega y se pueden usar para administrar un compuesto de la invención, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el compuesto, endocitosis mediada por el receptor (véase, por ejemplo Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432), construcción de un ácido nucleico como parte de un retroviral u otro vector etc. Los métodos de introducción puede ser enteral o parenteral e incluyen, pero no se limitan a rutas por vía intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural, y oral. Los compuestos se pueden administrar por cualquier vía conveniente, por
35 ejemplo por infusión o inyección en bolo, por absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, rectal y mucosa intestinal, etc.) y se pueden administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, puede ser deseable introducir las composiciones farmacéuticas de la invención en el sistema nervioso central por cualquier vía apropiada, incluyendo la inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular se puede facilitar mediante un catéter intraventricular, por
40 ejemplo, unido a un depósito, tal como un depósito de Ommaya. La administración pulmonar también se puede utilizar por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente de aerosol.

45 En una realización específica, puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas de la invención localmente al área en necesidad de tratamiento; esto se puede lograr, por ejemplo, y no a modo de limitación, por infusión local durante cirugía, aplicación tópica, por ejemplo, por inyección, por medio de un catéter, o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso, o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas sialásticas, o fibras. En una realización, la administración puede ser por inyección directa en tejido de mama, colorrectal, esofágico, gástrico; próstata o uterino o en el sitio (o sitio anterior) de un tumor maligno o tejido neoplásico o pre-neoplásico.

50 En otra realización, el compuesto se puede administrar en una vesícula, en particular un liposoma (véase Langer, 1990, Science 249:1527-1533; Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez- Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 317-327; véase en general *Ibid*).

En otra realización adicional, el compuesto se puede entregar en un sistema de liberación controlada. En una realización, una bomba se puede utilizar (véase Langer, *supra*; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201; Buchwald et al., 1980, Surgery 88:507; Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321:574). En otra realización, se pueden

utilizar materiales poliméricos (véase Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, J., 1983, Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; see also Levy et al., 1985, Science 228:190; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71:105).

5 En incluso otra realización, un sistema de liberación controlada se puede colocar en proximidad de la diana terapéutica i.e., mama, colon, esófago, estómago, próstata o útero, requiriendo así sólo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, pp. 115-138 (1984)).

Otros sistemas de liberación controlada se discuten en la revisión de Langer (1990, Science 249:1527-1533)..

10 La presente invención también provee composiciones farmacéuticas. Tales composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto, y un portador farmacéuticamente aceptable. En una realización específica, el término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno Federal o un gobierno estatal o indicado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Tales portadores farmacéuticos pueden ser

15 líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de petróleo, animal, vegetal o de origen sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un portador preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y soluciones de dextrosa y glicerol acuosas también se pueden emplear como portadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos apropiados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina,

20 yeso, sílica gel, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche descremada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes de solución reguladora de pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La composición se puede formular como un supositorio, con

25 aglutinantes y portadores tradicionales tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir portadores estándar tales como manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio grados farmacéuticos, etc. Los ejemplos de portadores farmacéuticos apropiados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" by E.W. Martin. Tales composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, preferiblemente en forma purificada, junto con una cantidad apropiada de portador para proporcionar la forma para la

30 administración apropiada al sujeto. La formulación se debe adecuar al modo de administración.

En una realización, por ejemplo, cuando se emplean uno o más anticuerpos, la composición se formula de acuerdo con procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a seres humanos. Por lo general, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en solución reguladora acuosa isotónica estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un

35 anestésico local tal como lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los ingredientes se suministran ya sea por separado o mezclados juntos en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente sellado tal como una ampolla o un sobre que indique la cantidad del agente activo. Cuando la composición se va a administrar por infusión, se puede dispensar con una botella de infusión que contiene agua de calidad farmacéutica estéril o solución salina. Cuando la composición

40 se administra por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina, para que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

Los compuestos de la invención se pueden formular como formas neutras o salinas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con grupos amino libres tales como los derivados de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las formadas con grupos carboxilo libres tales como los derivados de sodio, potasio,

45 amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína etc.

La cantidad del compuesto de la invención que será eficaz en el tratamiento de cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata o cáncer de útero se puede determinar mediante técnicas clínicas estándar. Además, los ensayos *in vitro* opcionalmente se pueden utilizar para ayudar a identificar los rangos de dosificación óptimos. La dosis precisa a utilizar en la formulación dependerá también de la vía de administración, y la

50 gravedad de la enfermedad o trastorno, y debe decidirse de acuerdo con el juicio del médico y las circunstancias de cada sujeto. Sin embargo, los rangos de dosificación apropiados para administración intravenosa son generalmente de aproximadamente de 20-500 microgramos del compuesto activo por kilogramo de peso corporal. Los rangos de dosificación apropiados para la administración intranasal son generalmente aproximadamente 0.01 pg/kg de peso corporal a 1 mg/kg de peso corporal. Las dosis eficaces se pueden extrapolar a partir de curvas dosis-respuesta

55 derivadas de sistemas de prueba de modelo *in vitro* o en animales.

Los supositorios generalmente contienen ingrediente activo en el rango de 0.5% a 10% en peso; las formulaciones orales contienen preferiblemente de 10% a 95% del ingrediente activo.

La invención también provee un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Opcionalmente asociado con dicho(s) recipiente(s) puede ser una nota en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, cuyo aviso refleja (a) la aprobación de la agencia de la fabricación, uso o venta para administración humana, (b) las instrucciones de uso, o ambas.

Por lo tanto, en un aspecto, el kit comprende anticuerpos empleados en la invención, por ejemplo los anticuerpos se pueden liofilizar para su reconstitución antes de la administración o uso. Cuando el kit es para uso en terapia/tratamiento, tales como el cáncer el anticuerpo o anticuerpos se pueden reconstituir con una solución acuosa isotónica, que puede estar opcionalmente proporcionada con el kit..

10 Determinación de la abundancia del tallo de matriptasa por tecnología de formación de imágenes

Una ventaja de la determinación de la abundancia del tallo de matriptasa por la tecnología de formación de imágenes puede ser que tal método no es invasivo (salvo que los reactivos pueden necesitar ser administrados) y no hay necesidad de extraer una muestra del sujeto.

Las tecnologías de formación de imágenes apropiadas incluyen la tomografía por emisión de positrones (PET) y la tomografía por emisión de fotón único (SPECT). La visualización del tallo de matriptasa utilizando dichas técnicas requiere la incorporación o unión de una etiqueta apropiada, por ejemplo un radiotrazador tal como ^{18}F , ^{11}C o ^{123}I (véase, por ejemplo NeuroRx - The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics (2005) 2(2), 348-360 and *idem* pages 361-371 para más detalles de las técnicas). Los radiotrazadores u otras etiquetas se pueden incorporar en el tallo de matriptasa por la administración al sujeto (por ejemplo, por inyección) de un ligando específico marcado de forma apropiada. Alternativamente, se pueden incorporar en un reactivo de afinidad de unión (por ejemplo, un anticuerpo) específico para el tallo de matriptasa que se puede administrar al sujeto (por ejemplo, por inyección). Para la discusión del uso de un Anticuerpo® para formación de imágenes véase, por ejemplo Orlova A, Magnusson M, Eriksson TL, Nilsson M, Larsson B, Hoiden- Guthenberg I, Widstrom C, Carlsson J, Tolmachev V, Stahl S, Nilsson FY, Tumor imaging using a picomolar affinity HER2 binding Affibody® molecule, Cancer Res. 2006 Apr 15;66(8):4339-48.

Las características preferidas de cada aspecto de la invención son como para cada uno de los otros aspectos *mutatis mutandis*.

Ejemplo1: Identificación de proteínas de membrana expresadas en muestras de tejido de cáncer de mama y colorrectal

Utilizando el siguiente protocolo de referencia, las proteínas de la membrana extraídas de muestras de tejido de cáncer de mama y cáncer colorrectal se separaron por gel 1D y se analizaron.

30 1.1 Materiales y métodos

1.1.1- Fraccionamiento de membrana plasmática

Las células recuperadas a partir del epitelio de un cáncer de mama o cáncer colorrectal se lisaron y se sometieron a centrifugación a 1000G. El sobrenadante se tomó, y se centrifugó posteriormente a 3000 g. Una vez más, el sobrenadante se tomó, y luego se centrifugó a 100,000 g.

El sedimento resultante se recuperó y se fraccionó por centrifugación en un gradiente de sacarosa 15-60%.

Se utilizó una transferencia Western para identificar los marcadores subcelulares, y se reunieron las fracciones de la membrana de plasma enriquecida.

La solución combinada se aplicó directamente a los geles 1D (véase la sección 1.1.4 más adelante), o se fraccionó adicionalmente en las fracciones de unión a heparina y unión a nucleótido, como se describe a continuación.

40 1.1.2- Fracción de unión de membrana plasmática de heparina

La solución combinada de 1.1.1 anterior se aplicó a una columna de Heparina, se eluyó de la columna y se fraccionó por electroforesis en geles de poliácridamida 1D (véase la sección 1.1.4 más adelante).

1.1.3- Fracción de unión de plasma de nucleótidos

La solución combinada de 1.1.1 anterior se aplicó a una columna de Cibacrom Blue 3GA, se eluyó de la columna y se fraccionó por electroforesis en gel es de poliácridamida 1D (véase la sección 1.1.4 más adelante).

1.1.4 - Tecnología de gel 1D

Los pellets de proteína o membrana se solubilizaron en solución reguladora de muestra 1D (1-2 mg/mL). A continuación, la mezcla de solución reguladora de muestra y proteínas se calentó a 95 °C, durante 3 min.

Un gel de gradiente de poliacrilamida al 9 - 16% fue arrojado con un gel de apilamiento y un peine de apilamiento de acuerdo con el procedimiento descrito en Ausubel F.M. et al., eds., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. II, Green Publishing Associates, Inc., and John Wiley & Sons, Inc., New York, section 10.2

Se adicionaron 30-50 microgramos de las mezclas de proteínas obtenidas a partir de extractos de detergente y estándares de peso molecular (66, 45, 31, 21,14 kDa) a los pozos del gel de apilamiento utilizando una punta de pipeta de 10 microlitros y las muestras se fraccionaron por electroforesis en el gel a 40 mA, durante 5 horas.

A continuación, las placas se abren, el gel se colocó en una bandeja de fijador (10% de ácido acético, 40% de etanol, 50% de agua) y se agitaron durante la noche. Después de esto, el gel se sometió a imprimación en 30 minutos agitando en una solución de imprimación (7.5% de ácido acético (75 mL), 0.05% de SDS (5 mL de 10%)). A continuación, el gel se incubó con un colorante fluorescente (7.5% de ácido acético, 0.06% de OGS colorante de la casa (600 mL)) con agitación durante 3 horas. Sypro Red (Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon) es un colorante apropiado para este propósito. Un colorante fluorescente preferido se revela en la Solicitud de los Estados Unidos No. 09/412.168, presentada el 5 de octubre de 1999.

Una salida legible por ordenador fue producida por la formación de imágenes los geles teñidos por fluorescencia con un escáner Apollo 3(Oxford Glycosciences, Oxford, UK). Este escáner se desarrolla desde el escáner descrito en el documento WO 96/36882 y en la tesis Ph.D. de David A. Basiji, titulada "Development of a High-through put Fluorescence Scanner Employing Internal Reflection Optics and Phase-sensitive Detection (Total Internal Reflection, Electrophoresis)", University of Washington (1997), Volume 58/12-B of Dissertation Abstracts International, page 6686. La última encarnación de este instrumento incluye las siguientes mejoras: El gel se transporta a través del escáner en un sistema de precisión de accionamiento de tornillo de avance. Esto es preferible para colocar la placa de vidrio en el sistema accionado por correa que se define en la tesis Basiji, ya que provee un medio reproducible de transporte con precisión del gel después de la óptica de la imagen.

El gel se fija en el escáner contra tres paradas de alineación que sujetan rígidamente la placa de vidrio en una posición conocida. Al hacer esto en combinación con el anterior sistema de transporte de precisión y el hecho de que el gel se una a la placa de vidrio, la posición absoluta del gel se puede predecir y se registra. Esto asegura que las coordenadas exactas de cada función en el gel se puedan comunicar al robot de corte para la escisión. Este robot de corte tiene una disposición de montaje idéntica a la placa de vidrio para preservar la exactitud posicional.

El portador que contiene el gel en su lugar tiene marcadores fluorescentes integrales (Designados M1, M2, M3) que se utilizan para corregir la geometría de la imagen y son una característica de control de calidad para confirmar que el barrido se ha realizado correctamente.

Los componentes ópticos del sistema se han invertido. El láser, un espejo, la guía de ondas y otros componentes ópticos están ahora por encima de la placa de vidrio que se va a escanear. La realización de la tesis de Basiji los tiene por debajo. La placa de vidrio se monta por lo tanto, sobre el lado gel del escáner hacia abajo, de modo que la ruta óptica se mantiene a través de la placa de vidrio. Al hacer esto, las partículas de gel que se pueden escapar de la placa de vidrio caerán sobre la base del instrumento en lugar de en la óptica.

En el barrido los geles, que fueron retirados de la tinción, se enjuagan con agua y se dejan secar al aire brevemente y se toma la imagen en el Apollo 3. Después de la impresión, los geles fueron sellados en bolsas de polietileno que contienen una pequeña cantidad de solución de tinción, y después se almacenaron a 4 °C.

Los pesos moleculares aparentes se calcularon por interpolación a partir de un conjunto de marcadores de peso molecular conocido se analizaron junto con las muestras.

1.1.5 - Recuperación y análisis de proteínas seleccionadas

Las proteínas se removieron por incisión robóticamente de los geles mediante el proceso descrito en la Patente de los Estados Unidos No. 6,064,754, Secciones 5.4 y 5.6, 5.7, 5.8, como es aplicable a electroforesis 1D, con modificación al cortador robótico de la siguiente manera: el cortador inicia en la parte superior del carril, y corta un disco de gel de 1.7 mm de diámetro desde el borde izquierdo del carril. El cortador se mueve entonces 2 mm a la derecha y 0.7 mm hacia abajo y corta un disco más. Esto se repite entonces. El cortador se mueve entonces de nuevo a una posición directamente por debajo del primer corte del gel, pero compensado por 2.2 mm hacia abajo, y el patrón de tres cortes diagonales se repite. Esto se continuó por toda la longitud del gel.

NOTA: Si se observa el carril para ampliar significativamente entonces se puede hacer una corrección también lateralmente, i.e. en lugar de regresar a una posición directamente debajo de un corte de gel anterior, el corte puede ser compensado ligeramente a la izquierda (a la izquierda del carril) y/o a la derecha (a la derecha del carril). Las proteínas contenidas dentro de los fragmentos del gel fueron procesadas para generar péptidos tripticos; las secuencias de aminoácidos parciales de estos péptidos se determinaron por espectroscopia de masas como se describe en el documento WO98/53323 y en la Solicitud No. 09/094.996, presentada el 15 de junio de 1998.

Las proteínas se procesaron para generar péptidos digeridos tripticos. Los péptidos tripticos se analizaron por espectrometría de masas utilizando un espectrómetro de masas DETM STR Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF)-PerSeptive Biosystems Voyager, y los péptidos tripticos seleccionados fueron analizados por espectrometría de masas en tándem (MS/MS) utilizando un espectrómetro de masas Micromass Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF) (Micromass, Altrincham, UK) equipado con una fuente nanoflow™ electrospray Z-spray. Para la secuenciación parcial de aminoácidos e identificación de matriptasa, espectros de masas en tándem no interpretada de los péptidos tripticos, se realizaron búsquedas utilizando el programa de búsqueda SEQUEST (Eng et al., 1994, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 5:976-989), version v.C.1. Los criterios para la identificación de la base de datos incluyen: la especificidad de escisión de tripsina; la detección de un paquete integrado de iones a, b, e y en péptidos reintegrados de la base de datos, y un incremento de la masa de todos los residuos de Cys para determinar la carbamidometilación. La base de datos buscada era una base de datos construida de entradas de proteínas en la base de datos no redundante en poder del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), que es accesible en www.ncbi.nlm.nih.gov. Después de la identificación de proteínas a través de la correlación espectro-espectro utilizando el programa SEQUEST, se asignaron las masas detectadas en espectros de masas MALDI-TOF de los péptidos digeridos tripticos dentro de las proteínas identificadas. En los casos en que no hay secuencias de aminoácidos podrían ser identificados a través de búsquedas con espectros MS/MS no interpretados de péptidos digeridos tripticos utilizando el programa SEQUEST, espectros de masas en tándem de los péptidos se interpretaron manualmente, utilizando métodos conocidos en el arte. (En el caso de la interpretación de espectros de masas de fragmentación de baja energía de iones de péptidos véase Gaskell et al., 1992, Rapid Commun. Mass Spectrom. 6:658-662).

1.1.6 - Discriminación de proteínas asociadas con cáncer de mama y cáncer colorrectal

El proceso para identificar la matriptasa utiliza las secuencias de péptidos obtenidas experimentalmente por espectrometría de masas descrito anteriormente de proteínas humanas de origen natural para identificar y organizar los exones de codificación en la secuencia del genoma humano publicado.

Los recientes avances dramáticos en la definición de la secuencia química del genoma humano han llevado a la próxima finalización de esta inmensa tarea (Venter, J.C. et al. (2001). The sequence of the human genome. Science 16: 1304-51; International Human Genome Sequencing Consortium. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome Nature 409: 860-921). Hay pocas dudas de que esta información de la secuencia tendrá un impacto sustancial en nuestra comprensión de muchos procesos biológicos, entre ellos la evolución molecular, la genómica comparativa, mecanismos patogénicos y la medicina molecular. Para el valor médico completo inherente en la secuencia del genoma humano que se lleva a cabo, se necesita que el genoma sea "organizado" y anotado. Con esto, se entiende al menos las siguientes tres cosas: (i) El montaje de las secuencias de las partes individuales del genoma en una secuencia continua, coherente para cada cromosoma. (ii) La identificación inequívoca de las regiones de cada cromosoma que contiene genes. (iii) Determinación de la estructura fina de los genes y las propiedades de sus productos de ARNm y proteínas. Aunque la definición de un "gen" es un tema cada vez más complejo (H Pearson: What is a gene? Nature (2006) 24: 399 - 401), lo que es de interés inmediato para el descubrimiento y desarrollo de fármacos es un catálogo de los genes que codifican, proteínas funcionales expresadas. Un subgrupo de estos genes se involucrará en las bases moleculares de la mayoría, si no todas las patologías. Por lo tanto, un objetivo importante e inmediato para la industria farmacéutica es identificar todos esos genes en el genoma humano y describir su estructura fina.

El procesamiento e integración de las masas de péptidos, distintivos de péptidos, ESTs y datos de secuencia genómica de dominio público para formar bases de datos OGAP®

Unidades genéticas discretas (exones, transcripciones y genes) fueron identificados utilizando los siguientes pasos secuenciales:

1. Se genera un "transcriptoma virtual", que contiene los péptidos tripticos que se correlacionan con el genoma humano mediante la combinación de las identificaciones de genes disponibles de Ensembl y diversos programas de predicción de genes. Esto también incorpora los datos de SNP (a partir de dbSNP) y todos los empalmes alternativos de las identificaciones de genes. Contaminantes conocidos también fueron agregados al transcriptoma virtual.

2. Todos los espectros en tándem en la base de datos de espectrometría de masas OGeS se interpretan con el fin de producir un péptido que se puede asignar a uno en el transcriptoma virtual. Un conjunto de algoritmos de interpretación espectrales automatizados se utiliza para producir las identificaciones de péptidos.

3. El conjunto de todos los péptidos coincidentes de masas en la base de datos OGeS de espectrometría de masas se genera mediante la búsqueda de todos los péptidos de transcripciones que contengan los caracteres de los péptidos en tándem utilizando una tolerancia basada en la precisión de masas del espectrómetro de masas, por lo general 20 ppm.
- 5 4. Todos los péptidos coincidentes de masas y en tándem se combinan en la forma de "grupos de proteínas". Esto se hace utilizando un proceso recursivo que las secuencias de grupos en grupos basados en coincidencias de péptidos comunes. Se considera que las secuencias biológicas pertenecen al mismo grupo si comparten uno o más péptidos coincidentes de masas o en tándem.
5. Después de la filtración inicial para seleccionar los péptidos incorrectamente identificados, a continuación los grupos resultantes se asignan en el genoma humano.
- 10 6. Los grupos de proteínas se agregan luego en regiones que definen los límites de genes preliminares utilizando su proximidad y la coobservación de péptidos dentro de los grupos de proteínas. La proximidad se define como el péptido que está dentro de 80,000 nucleótidos en la misma hebra del mismo cromosoma. Varias reglas de eliminación, basadas en la puntuación de observación del grupo y el mapeo múltiple para el genoma se utilizan para refinar la salida. Los "genes confirmados" resultantes son los que mejor representan los péptidos y las masas observadas por espectrometría
- 15 de masas en cada grupo. Las coordenadas nominales para el gen son también una salida de esta etapa.
7. El mejor conjunto de las transcripciones de cada gen confirmado se crea a partir de los grupos de proteínas, péptidos, ESTs, los exones candidatos y peso molecular de la mancha de proteína original.
8. Cada transcripción identificada estaba unida a la muestra proporcionando los péptidos observados.
9. El uso de una aplicación para la visualización y la extracción de los datos. El resultado de las etapas 1-8 fue una base
- 20 de datos que contiene genes, cada uno de los cuales consistía en un número de exones y una o más transcripciones. La solicitud fue escrita para mostrar y buscar estos datos de genoma/proteoma integrados. Cualquier característica (OMIM disease locus, InterPro etc.) que había sido asignado a un mismo sistema Golden Path co-ordinate por Ensembl podría ser una referencia cruzada a estos genes por coincidencia de ubicación y estructura fina.

Resultados

- 25 Se utilizó el proceso para generar aproximadamente 1 millón de secuencias de péptidos para identificar los genes que codifican proteínas y sus exones como resultado de la identificación de secuencias de proteínas de 18083 genes a través de 67 tejidos diferentes y 57 enfermedades, incluyendo 506 genes en el cáncer de vejiga, 4,713 genes en cáncer de mama, 1,371 genes en el cáncer cervical, 949 genes en el cáncer colorrectal, 1,544 genes en glioblastoma, 1,782 genes en el carcinoma hepatocelular, 2,424 genes en la leucemia linfocítica crónica, 978 genes en el cáncer de pulmón,
- 30 1,764 genes en el melanoma, 1,033 genes en el cáncer de ovario, 2,961 genes en el cáncer de páncreas y 3,307 genes en el cáncer de próstata, ilustrados en este documento por matriptasa aislada e identificada a partir de muestras de cáncer de mama y cáncer colorrectal.

1.2 Resultados

- 35 Estos experimentos identifican la matriptasa, como se describe adicionalmente en este documento. La matriptasa de longitud completa se detectó en la membrana plasmática de muestras de cáncer de mama y cáncer colorrectal y no se detectó en el citosol.

Ejemplo 2: Identificación de proteínas de membrana expresadas en muestras de tejido de cáncer de próstata

Utilizando el siguiente protocolo de referencia, las proteínas de membrana extraídas de muestras de tejido de cáncer de próstata se analizaron utilizando etiquetas de afinidad codificadas con isótopos (ICAT).

40 2.1 Materiales y métodos

2.1.1 - Preparación de fracciones de membrana

Las células recuperadas de un cáncer de próstata fueron lisadas y sometidas a centrifugación a 1000G. El sobrenadante fue tomado, y se centrifugó posteriormente a 3000 g. Una vez más, el sobrenadante se tomó, y luego se centrifugó a 100 000G.

- 45 Los pellets resultantes se disolvieron mediante la ebullición en solución reguladora de etiquetado (Tris-HCl 50 mM pH 8.3, EDTA 5 mM, 0.5% de SDS), y se midió la concentración de proteína.

Se utilizó una transferencia Western para verificar los marcadores de proteínas de membrana.

2.1.2 - Síntesis de reactivos ICAT

Los reactivos ICAT utilizados fueron sintetizados con los siguientes sustratos isotópicamente diferentes: 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanodiamina (A) (Aldrich, Milwaukee, WI) y 2,2',3,3',11,11',12,12'-octadeutero-4,7,10-trioxa-1,13-tridecanodiamina (B) (Gerber, S.A., Scott, C.R., Turecek, F. & Gelb, M.H. Analysis of rates of multiple enzymes in cell lysates by electrospray ionization mass spectrometry. J. Am. Chem. Soc. 121, 1102-1103 (1999)). Síntesis de N-(13-amino-4,7,10-trioxatridecanil) biotinamida (C) fue de la siguiente manera. Para biotina-pentafluorofenilester (Pierce, Rockford, IL) en dimetilformamida seca que contiene el exceso de N,N-diisopropiletilamina (Aldrich) se adicionaron cinco equivalentes de (A) con agitación a temperatura ambiente durante 3 h. El solvente se eliminó a presión reducida y (C) se purificó a homogeneidad por HPLC de fase reversa. El análogo pesado se preparó como para (C), pero con cinco equivalentes de (B). La síntesis de N-(13-yodoacetamido-4,7,10-trioxatridecanil) biotinamida (D) fue de la siguiente manera. A (C) (o análogo pesado) en dimetilformamida seca que contiene el exceso de N, N-diisopropiletilamina se le adicionaron dos equivalentes de anhídrido yodoacético (Aldrich) con agitación a temperatura ambiente, durante 3 h. El solvente se eliminó a presión reducida, y (D) se purificó a homogeneidad mediante HPLC de fase reversa y se caracterizó por MS.

2.1.3 - Análisis ICAT

Se utilizaron 100 ug de proteína total. Se redujeron los enlaces disulfuro en las mezclas de proteínas desnaturalizadas (solución reguladora Tris 50 mM pH 8.5, guanidina HCl 6 M, tributilfosfina 5 mM) durante 1 hora a 37 °C. Los grupos cisteinilo en cada mezcla se biotinilaron de forma independiente con un exceso molar de cinco veces del reactivo ICAT apropiado. El reactivo ICAT en exceso se eliminó de las muestras combinadas por filtración en gel (Bio-Rad, Richmond, CA) en solución reguladora Tris (50 mM, pH 8.5) con 0.1% de SDS, y la fracción de proteína se digirió con tripsina (Promega, Madison, WI), durante la noche a 37 °C. Después, la solución peptídica se pasó sobre una columna de avidina monomérica preparada (Pierce). La columna se lavó con agua, y los péptidos biotinilados se eluyeron con ácido fórmico al 0.3% (fracciones de 1 mL). El volumen de muestra eluida (en ácido fórmico al 0.3%) se redujo de 1,000 a 50 ul. La recuperación de péptidos a través de todo el procedimiento se estima en aproximadamente 70%.

Un espectrómetro de masas de trampa de iones LCQ (Finnigan MAT, San Jose, CA) fue utilizado con una fuente de microelectroaspersión fabricada en el laboratorio (véase por ejemplo Figey, D. et al. (see e.g. Figey, D. et al. Electrophoresis combined with novel mass spectrometry techniques: powerful tools for the analysis of proteins and proteomes. Electrophoresis 19, 1811-1818 (1998)) and an HP1100 solvent delivery system (Hewlett Packard, Palo Alto, CA). Un gradiente binario de 60 minutos con solvente B de 5-80% (acetonitrilo y ácido heptafluorobutírico al 0.005% (HFBA)). El solvente A consistió en 0.4% de ácido acético y 0.005% de HFBA. Se utilizó una velocidad de flujo de 0.5 ul/min con una columna capilar de sílica fundida 100 um x 12 cm empacada en el laboratorio con Monitor spherical silica (Column Engineering, Ontario, CA). Se ha logrado una cromatografía funcional con esta configuración con cargas de péptidos de hasta 500 pmol. en H₂O. Un microlitro de la mezcla de péptido se cargó a presión en la columna. Los péptidos que eluyen se analizaron mediante técnicas de uLC-MS/MS y uLC-MS, como se describe en otro lugar (véase, por ejemplo Gygi, S.P., Rochon, Y., Franz, B.R. & Aebersold, R. Correlation between protein and ARNm abundance in yeast. Mol. Cell. Biol. 19, 1720-1730 (1999) and Gygi, S.P., Han, D.K.M., Gingras, A.C., Sonenberg, N. & Aebersold, R. Protein analysis by mass spectrometry and sequence database searching: tools for cancer research in the post-genomic era, Electrophoresis 20, 310-319 (1999)). Las intensidades de los pares de péptidos que eluyen se midieron en el espectrómetro de masas de barrido. Existe una ligera diferencia en los tiempos de elución de pares de péptidos marcados diferencialmente, con el análogo pesado que eluye 1-2 s antes del análogo ligero. Por esta razón, la totalidad del área del pico de cada péptido que eluye fue reconstruido y utilizado en el cálculo de la relación. Para determinar la secuencia de aminoácidos, el espectrómetro de masas operado en un modo MS/MS dependiente de los datos (un espectro de masas de barrido completo es seguido por un espectro de masas en tándem), donde se selecciona el ion precursor "sobre la marcha" a partir del barrido anterior. Una relación m/z para un ión que había sido seleccionado para la fragmentación se colocó en una lista y se excluyó de forma dinámica, durante 1 min a partir de una adicional fragmentación. Para la secuenciación de aminoácidos parcial e identificación de OGTA284, se hicieron búsquedas espectros de masas en tándem sin interpretar de los péptidos tripticos utilizando el programa de búsqueda SEQUEST ((Eng, J., McCormack, A.L. & Yates, J.R. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. J. Am. Soc. Mass Spectrum. 5, 976-989 (1994)), which searched tandem mass spectra against the OWL non redundant sequence database (Bleasby, A.J., Akrigg, D. & Attwood, T.K. OWL-a non-redundant composite protein sequence database. Nucleic Acids Res. 22, 3574-3577 (1994)).

2.1.4 - Discriminación de proteínas asociadas al cáncer de próstata

Se empleó el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 sección 1.1.6, para discriminar proteínas asociadas al cáncer de próstata en las muestras experimentales.

2.2 Resultados

Estos experimentos identifican la matriptasa, como se describe adicionalmente en este documento. La matriptasa de longitud completa se detectó en la membrana de las muestras de cáncer de próstata y no se detectó en el citosol.

Ejemplo 3: Generación de anticuerpos para el tallo de matriptasa

- 5 Utilizando el siguiente protocolo de referencia, se generó una proteína de fusión de Fc del tallo de matriptasa y se utilizó para la inmunización y la generación de anticuerpos contra el tallo de matriptasa.

3.1 Materiales y métodos

3.1.1- Generación de tallo de matriptase Fc-proteína de fusión

- 10 El ADNc de la matriptasa de longitud completa (OGTA004) fue adquirido de Open Biosystems, IMAGE ID# 5213189,, y fue utilizado como plantilla para la amplificación. Se diseñaron cebadores para amplificar la región de tallo que abarca los aminoácidos 86-201 y para permitir la subclonación, en marco, con una secuencia señal osteonectina terminal N, y el sitio de escisión FactorXa terminal C y FcG1 humano. El inserto se subclonó en un vector de expresión de mamífero basado en Invitrogen pCDNA 3.1, con el marcador seleccionable de higromicina. Las células CHO-S fueron transfectadas utilizando el reactivo de Invitrogen DMRIE-C y las células estables fueron seleccionadas en virtud de 500 ug/mL de higromicina B. La expresión de la proteína de fusión se confirmó a través de transferencia de Western con anticuerpos anti-Fc humanos y anticuerpos de tallo de anti-matriptasa. La proteína de fusión se muestra en la figura 4.
- 15

3.1.2 - Generación de hibridoma

- 20 La línea celular de mieloma Sp2/0 (ATCC CRL 1581) se utilizó para las fusiones. El vial original de ATCC se descongeló y se expandió en el cultivo. Un stock de semillas de viales congelados se preparó a partir de esta expansión. Las células se mantuvieron en cultivo durante 1 mes, se pasaron dos veces por semana. El sobrenadante de células P388D1 (ATCC, TIB-63 FL) se utilizó como los medios acondicionados para los hibridomas. En resumen, las células se hicieron crecer y se expandieron a 200 mL. Los cultivos estacionarios se cultivaron durante ~ 7 días. El sobrenadante agotado se centrifugó y se filtró a través de un filtro estéril de 0.2 µm. Esta línea celular se pasó durante 1 mes y luego un nuevo vial se descongeló y cultivó.

- 25 3.1.3 - Inmunización utilizando proteína de fusión de tallo OGTA004

El anticuerpo se generó a partir de una fusión de bazo/ganglios linfáticos de un ratón (HCo7 (J/K)/Balb/c) inmunizado con tallo OGTA004 - proteína hFcG1 en dosis de 20 ug en adyuvante de Ribi por footpad/ip/sc en intervalos de 2-4 días para un total de 5 inmunizaciones.

3.2 Resultados

- 30 El clon Medarex del anticuerpo 1432.896.13B4 se generó a partir el protocolo anterior.

Ejemplo 4: Inmunohistoquímica utilizando anticuerpo para el tallo de matriptasa

Utilizando el siguiente protocolo de referencia, se realizó la inmunohistoquímica en los tejidos de tumor FFPE y normales utilizando un anticuerpo policlonal de conejo para la región de tallo extracelular de matriptasa (AbCAM, UK, ab28267).

- 35 4.1 Materiales y métodos

4.1.1 - Determinación de la especificidad del anticuerpo

- 40 La especificidad del anticuerpo del tallo de anti-matriptasa (Abcam # 28267) se determinó por ELISA. Las placas se recubrieron con ya sea 2 mg/mL de tallo-proteína de fusión (Medarex) o dominio catalítico de matriptasa (matriptasa) (Biosite). Los anticuerpos anti-matriptasa se ensayaron a 10 mg/mL y la unión se detectó con anticuerpos anti-conejo de cabra conjugados con peroxidasa de rábano (HRP).

Los resultados muestran que el anticuerpo de tallo de anti-matriptasa, Ab 28267, es altamente específico al tallo-proteína de fusión y no se une al dominio catalítico de matriptasa.

Protocolo para la tinción de portaobjetos de tejido FFPE

4.1.2 - desparafinización y rehidratación

Los portaobjetos se colocaron en un baño de xileno y se incubaron durante 5 minutos. El baño se cambió y el proceso se repitió una vez. El exceso de líquido se eliminó y los portaobjetos se colocaron en etanol absoluto durante 5 minutos. El exceso de líquido se eliminó y los portaobjetos se colocaron en etanol al 90% durante 5 minutos. El exceso de líquido se eliminó y los portaobjetos se colocaron en etanol al 80% durante 5 minutos. El exceso de líquido se eliminó y los portaobjetos se colocaron en etanol al 70% durante 5 minutos. El exceso de líquido se eliminó y los portaobjetos se colocaron en agua destilada o desionizada durante un mínimo de 30 segundos.

Si es necesario, los tejidos rehidratados se pueden mantener en solución reguladora entre 2-8 °C, durante un máximo de 18 horas antes de su uso. Permitir que los tejidos alcancen la temperatura ambiente antes de la tinción.

4.1.3 - Recuperación del antígeno

Los portaobjetos se enjuagan en agua desionizada. Los portaobjetos se colocan entonces en un soporte de portaobjetos Tissue Tek gris con las ranuras vacías llenas de portaobjetos en blanco. El soporte se colocó en un baño Tissue Tek blanco que contiene 250 mL de la solución de recuperación de antígeno de potencia de trabajo. La tapa se colocó libremente en el baño y se centra dentro de un horno de microondas en una toalla de papel para absorber cualquier líquido que se riega. El horno se puso en funcionamiento a alta potencia y la solución se siguió de cerca hasta que llegó a un hervor rápido, y luego de inmediato se apagó el horno (unos 2 minutos). La potencia del horno se establece en aproximadamente el 10% de nivel y se calentó, durante 10-15 minutos. Los baño/portaobjetos se sacaron de la estufa y se dejaron enfriar en el baño durante 20-30 minutos hasta alcanzar la temperatura ambiente. Luego se enjuagaron con varios cambios de agua desionizada. Los portaobjetos se colocaron en PBS.

4.1.4 - Tinción

Bloqueo de peroxidasa: El exceso de solución reguladora se eliminó. A continuación, utilizando un Kimwipe, se limpió cuidadosamente al rededor de la muestra para eliminar cualquier líquido restante y mantener los reactivos dentro de la zona prescrita. La región se marcó con lápiz PAP. Se aplicó suficiente reactivo de bloqueo de peroxidasa de la botella 1, para cubrir la muestra. Se incubó durante 5 minutos. A continuación, se enjuagó suavemente con agua destilada o PBS de una botella de lavado y se colocó en un baño de PBS fresco. El tejido se bloqueó con 10% de suero (de especies de anticuerpo secundario), durante 20-30 minutos. La solución reguladora de bloqueo se vertió y se aplicó la tinción primaria.

Reactivo de control primario o negativo: El exceso de solución reguladora se eliminó. Se aplicó suficiente anticuerpo primario o control negativo para cubrir la muestra. Se incubó durante 30 minutos. La solución de anticuerpo se eliminó y se guarda si es necesario. Se enjuagó suavemente con PBS de una botella de lavado y se colocó en un baño de PBS fresco, durante 5 minutos. Esto se repitió una vez. Nota: Si el procedimiento de tinción debe ser interrumpido, los portaobjetos se pueden mantener en PBS después de la incubación del anticuerpo primario durante un máximo de una hora a temperatura ambiente sin afectar a la tinción.

Polímero marcado con peroxidasa: El exceso de solución reguladora se eliminó. Suficientes gotas de la botella 3 (polímero marcado), fueron aplicadas a la muestra cubierta. Se incubó durante 30 minutos. Los portaobjetos se enjuagaron como anteriormente.

Sustrato-cromógeno: El exceso de solución reguladora se eliminó y se aplicó suficiente de la solución lista para su uso de sustrato-cromógeno, para cubrir la muestra. Se incubó durante 5-10 minutos y luego se enjuagó suavemente con agua destilada de una botella de lavado. Los residuos de sustrato-cromógeno se recogieron en un recipiente de materiales peligrosos para su apropiada eliminación.

Contador de tinción con hematoxilina: Los portaobjetos se sumergieron en un baño de hematoxilina acuosa al 0.1% y se incubaron durante 2-5 minutos, dependiendo de la potencia. Se enjuagaron suavemente con agua del grifo en un baño.

Montaje: El exceso de agua se eliminó y se aplicaron 1-2 gotas de medio de montaje y el portaobjeto se cubrió.

4.2 Resultados

La inmunohistoquímica utilizando un anticuerpo policlonal de conejo para la región de tallo extracelular de matriptasa (AbCAM, UK, ab28267) demostró tinción homogénea de células tumorales en muestras de cáncer de esófago, uterino, gástrico y de mama consistente con la hipótesis de que los anticuerpos dirigidos a la región del tallo de matriptasa se pueden utilizar para las células de cáncer diana de origen epitelial en un entorno terapéutico. La especificidad de este anticuerpo se demuestra mediante IHC en otro múltiples tejidos de cáncer y normales. No se observó tinción en los tejidos de esófago normal, hígado normal, mama normal, y ovario normal. Se observó tinción esporádica en las células epiteliales en muestras de estómago normal y de colon normal.

Ejemplo 5: Ensayo para detectar el dominio catalítico soluble de matriptasa utilizando ELISA sándwich

Utilizando el siguiente Protocolo de referencia, se realizaron los ELISA sándwich con anticuerpos para el dominio catalítico de matriptasa.

5.1 Materiales y métodos

- 5 Los anticuerpos para el dominio catalítico de matriptasa (tal como se define por la SEQ ID No: 14, véase la figura 3) para los ELISA sándwich se desarrollaron en Biosite. El anticuerpo biotinilado (anticuerpo primario) se diluyó en solución reguladora de ensayo (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, 1% de BSA) a 2 ug/mL y se añade a la placa de 384 pozos recubierta con neutravidina (Pierce Chemical Company, Rockford IL) y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 1 hora. Los pozos se lavaron entonces con solución reguladora de lavado (borato 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 al 0.2%). Se
- 10 adicionaron muestras y estándares y se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 1 hora. Los pozos se lavaron de nuevo. Un anticuerpo conjugado con fluoresceína (anticuerpo secundario) se diluyó en solución reguladora de ensayo hasta 2 ug/mL y después se adicionó a la placa y se dejó incubar a temperatura ambiente durante 1 hora. Los pozos se lavaron de nuevo. Un anticuerpo anti-fluoresceína conjugado con fosfatasa alcalina, diluido 1/2338 en solución reguladora de ensayo, se adicionó y se dejó incubar a temperatura ambiente, durante 1 hora. A continuación, se realizó
- 15 el lavado final. Finalmente se adicionó el sustrato (Promega Attophos Product#S1011, Promega Corporation, Madison, WI) y la placa se leyó inmediatamente. Todas las adiciones fueron de 10 ul/pozo. La placa se lavó 3 veces entre cada adición y lavado final fue 9 veces antes de la adición de sustrato. Los estándares fueron preparados por adición del antígeno específico en una mezcla de paciente suero normal. La lectura se realizó con un Spectrafluor Tecan plus (Tecan Inc, Mannedorf, Switzerland) en el modo de cinética durante 6 ciclos de lectura con filtro de excitación de 430 nm y un filtro de emisión de 570 nm. Se determinó la pendiente de la RFU/segundo.
- 20

Los resultados finales de Box y ROC fueron analizados utilizando Analyse-it General + Clinical Laboratory 1.73 (Analyse-it Software Ltd., Leeds England).

5.2 Resultados

- 25 Estos experimentos detectaron el dominio catalítico soluble de matriptasa en muestras de cáncer de mama, cáncer colorrectal y cáncer de próstata en concentraciones más altas que las encontradas en muestras normales. El dominio catalítico se libera después de la escisión de matriptasa por lo que estos experimentos demuestran que la matriptasa que se escinde en el cáncer de mama, cáncer colorrectal y cáncer de próstata e indican la disponibilidad del tallo de matriptasa como una diana terapéutica para estos tipos de cáncer.

- 30 La figura 5 muestra los datos del diagrama de caja para el dominio catalítico de matriptasa en muestras de cáncer de próstata. El eje vertical en este gráfico es la concentración del dominio catalítico de matriptasa en ng/mL. Estos datos muestran mayor concentración del dominio catalítico de matriptasa en muestras de cáncer de próstata en comparación con las muestras normales, con un valor de p significativo, lo que indica la disponibilidad del tallo de matriptasa como una diana terapéutica en el cáncer de próstata.

Ejemplo 6: Ensayo multiplex para detectar el dominio catalítico soluble de matriptasa utilizando tecnología Luminex

- 35 Utilizando el siguiente protocolo de referencia, ensayos multiplex utilizando la tecnología Luminex se realizaron con anticuerpos para el dominio catalítico de matriptasa.

6.1 Materiales y métodos

- 40 Cada anticuerpo primario para el dominio catalítico de matriptasa (como se define por la SEQ ID No: 14, véase la figura 3) se conjugó con una microesfera magnética Luminex única ((Mug beads, Luminex Corporation, Austin, TX). Se adicionó cóctel de cuentas Mag (50 ul) a una placa de fondo redondo de 96 pozos negros Costar (Corning Incorporated, Corning NY). Utilizando una plataforma de anillo magnético de 96 pozos, las cuentas Mag fueron derribadas durante 1 minuto y se lavaron con solución reguladora de lavado/ensayo (PBS con 1% de BSA y Tween 20 al 0.02%). Se adicionaron 50 ul de muestra o estándar junto con un adicional de 50 ul de solución reguladora de lavado/ensayo y se dejó incubar en un agitador durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se colocó en la plataforma de anillo
- 45 magnético y se deja reposar durante 1 minuto. A continuación, las cuentas Mag se lavaron de nuevo. Luego, el anticuerpo marcado con biotina se adicionó a 50 ul por pozo con un adicional de 50 ul de solución reguladora de lavado/ensayo y se dejó incubar en un agitador, durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se colocó de nuevo en una plataforma magnética y las cuentas Mag se lavaron. La estreptavidina-RPE (Prozyme, San Leandro, CA, Phycolin, Código # PJ31S) se diluyó a 1 ug/mL en solución reguladora de lavado/ensayo y 50 ul se adicionaron a cada pozo junto
- 50 con un adicional de 50 ul de solución reguladora de lavado/ensayo y se dejó incubar en un agitador durante 1 hora a temperatura ambiente. El lavado final se llevó a cabo y las cuentas se volvieron a suspender con 100 ul de solución reguladora de lavado/ensayo y después cada pozo se leyó en un lector de Luminex 200 utilizando el software Xponent

3.0. Todas las diluciones de reactivos se realizaron en solución reguladora de lavado/ensayo. La biotina-anticuerpo variada para cada ensayo a la concentración óptima. Las cantidades de cuentas Mag iniciales adicionadas fueron aproximadamente 50,000 para cada ensayo. Se permitió 1 minuto cronometrado que las cuentas magnéticas se derribaran antes de cada lavado. Cada etapa de lavado, se lavó 3 veces con 100 μ L de solución reguladora de lavado/ensayo. Las curvas de calibración del ensayo se realizaron en una mezcla de suero del paciente donante normal. El lector Luminex y cuentas Mag se utilizaron y prepararon de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las curvas de calibración se calcularon utilizando un ajuste log-logística de 5 parámetros y cada concentración de la muestra se determinó a partir de esta curva de ajuste.

Se analizaron los resultados Box y ROC Finales utilizando Analyse-it General + Clinical Laboratory 1.73 (Analyse-it Software Ltd., Leeds England).

6.2 Resultados

Los experimentos utilizando 61 muestras normales, 43 muestras de cáncer de mama, 65 muestras de cáncer colorrectal y 14 muestras de cáncer de próstata resultaron en mayor evidencia de que el dominio catalítico soluble de matriptasa se puede detectar en muestras de cáncer de mama, cáncer colorrectal y cáncer de próstata es y también que la concentración del dominio catalítico es mayor en el cáncer de mama, cáncer colorrectal y cáncer de próstata que en las muestras normales. Esto demuestra que matriptasa se escinde en el cáncer de mama, cáncer colorrectal y cáncer de próstata, lo que indica la disponibilidad del tallo como una diana terapéutica

Las figuras 6a y 6b muestran datos de la curva ROC para matriptasa para el cáncer de mama y cáncer colorrectal, respectivamente. La sensibilidad del registro de curvas ROC (verdaderos positivos) contra 1-especificidad (falsos positivos). Un área bajo la curva ROC superior a 0.5 indica una buena discriminación entre la enfermedad y normal. Este es el caso en los datos mostrados en las figuras 6a y 6b, los cuales, junto con los bajos valores de p, indican que la concentración del dominio catalítico es significativamente mayor en el cáncer de mama y cáncer colorrectal que en las muestras normales.

Ejemplo 7: Selección de anticuerpo específico al antígeno utilizando ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

Utilizando el siguiente protocolo de referencia, la especificidad del anticuerpo policlonal de conejo para la región del tallo extracelular de matriptasa (AbCAM, UK, ab28267) se determinó mediante el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

7.1 Materiales y métodos

La placa fue recubierta durante la noche con el péptido del tallo de matriptasa (o hFc del tallo de matriptasa de la casa o HlgG irrelevante o proteína hFc) 1-2 μ g/mL en 1XPBS, 50 μ L/pozo. Se almacenó en el refrigerador. La placa se vació y se bloqueó en 1XPBST + 5% de suero de pollo, durante 30 min - 1 hora a temperatura ambiente (200 μ L/pozo). La placa se vació y se lavó manualmente con una botella de lavado (3x) o lavador de placas (3x) utilizando 1XPBST. Si se utilizó una botella de lavado, las placas fueron drenadas en toallas de papel.

Se adicionaron 50 μ L/pozo de solución reguladora de bloqueo a la placa y después se adicionaron 50 μ L/pozo de sobrenadante de hibridoma. Se incubó a temperatura ambiente, durante 1 hora. Se utilizó un control positivo cuando esté disponible. La placa se vació y se lavó a mano con una botella de lavado (3x) o lavador de placas (3x) utilizando 1XPBST. Si se utilizó una botella de lavado, las placas se drenaron en toallas de papel.

La HRP Fc de IgG anti-humana- (1: 3000) o HRP anti-humana κ (1: 2000), secundaria, se diluyó en 1XPBST + 5% de suero de pollo. Se adicionaron 100 μ L/pozo y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. La placa se vació y se lavó a mano con una botella de lavado (3x) o lavador de placas (3x) utilizando 1XPBST. Si se utilizó una botella de lavado, las placas se drenaron en toallas de papel.

La placa fue desarrollada utilizando 10 mL de sustrato ABTS. Se incubó durante 15-30 minutos a temperatura ambiente. La placa se leyó con el software de Molecular Devices (415-490 nM).

Reactivos y Equipos:

La solución salina reguladora de fosfato (PBS), DPBS sin Ca y Mg (Hyclone SH30013.03 o Sigma P 3813).

PBS-T (solución reguladora de lavado), PBS que contenía 0.05% de Tween 20 (Sigma P-1379).

PBS-T más 1% de BSA (Sigma A 9647) o 5% de suero de pollo. Esto sirve como la solución reguladora de bloqueo y solución reguladora de muestra.

Placas de ELISA (Nunc, Imuno-plate F96 Maxisorp 442404 o placas flexibles Falcon, 353912 o Placas Costar EIA/RIA, de fondo plano de 96 pozos, # 9018).

- 5 Péptido de tallo matriptasa, hFc del tallo de matriptasa de la casa, HlgG irrelevante y anticuerpo específico de cadena-g anti-humana HRP de la proteína hFc (Jackson, 109-036-098), k HRP anti-humana (Bethyl, A80-115P).

Sustrato ABTS (Moss Inc, Producto: ABTS-1000).

Lector de placas ELISA con filtro de 405 nm

Lavador automático de placas ELISA.

10 7.2 Resultados

- 15 Las figuras 7 (a) y 7 (b) muestran los gráficos de los análisis de ELISA con la densidad óptica a 405 nm en el eje vertical y los anticuerpos y controles en el eje horizontal. La figura 7 (a) muestra los resultados para anti-hk-hrp solo, HlgG irrelevante y el anticuerpo policlonal de conejo para el tallo de matriptasa (AbCAM, UK, ab28267) que demuestran que el anticuerpo policlonal de conejo es altamente específico para el tallo de matriptasa. La figura 7 (b) muestra los resultados para HlgG irrelevante (5 µg/mL), el anticuerpo policlonal de conejo para el tallo de matriptasa (AbCAM, UK, ab28267) y anti-HlgGFc-hrp para la proteína hFc del tallo de la casa, el péptido del tallo de conejo y hFc irrelevante. Este gráfico muestra que el anticuerpo policlonal de conejo es altamente específico para el tallo de matriptasa (proteína hFc del tallo de la casa y el péptido del tallo de conejo).

Ejemplo 8: Selección del anticuerpo utilizando clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS)

- 20 Utilizando el siguiente protocolo de referencia, el anticuerpo policlonal de conejo para la región del tallo extracelular de matriptasa (AbCAM, UK, ab28267) se seleccionó en las células de cáncer de colon HT-29, utilizando clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).

8.1 Materiales y métodos

- 25 Las células se prepararon mediante el recuento de las células HT-29 y el cálculo de la viabilidad para cada línea celular. Se transfirieron suficientes células para un 0.25×10^5 /muestra a un tubo de 50 mL y se lavaron dos veces con PBS.

Las células se volvieron a suspender en solución reguladora FACS fría (2% de FBS en PBS con azida al 0.02%) a 2.5×10^5 células/mL. Se adicionaron 100 µL/pozo a una placa de 96 pozos de fondo en U (Falcon Non-Tissue Culture Treated #35-1177) y se centrifugó a 2500 RPM durante 1 minuto. La solución reguladora se descartó en un movimiento rápido y a la placa se le dieron golpecitos suavemente sobre papel absorbente para eliminar el exceso de amortiguación.

- 30 100 µL de muestras de sobrenadantes y controles se adicionaron a los pozos y los pellets se volvieron a suspender. Se incubó durante 30- 40 min en hielo. A continuación se lavó una vez con 200 µL/pozo de la solución reguladora FACS y se centrifugó a 2500 rpm a 4 °C, durante 1 minuto. La solución reguladora se desechó.

- 35 50 µL/pozo de IgG Fc específica anti-humana de cabra marcada con FITC secundaria (Jackson, # 109-095-098) se adicionó a una dilución 1: 100. Se incubó durante 20-30 min a 4 °C en la oscuridad y después se lavó dos veces con 200 µL/pozo de la solución reguladora FACS y se centrifugó a 2500 rpm a 4 °C, durante 1 minuto.

Las muestras se volvieron a suspender en 80 µL/pozo de solución reguladora FACS que contenía yoduro de propidio (Roche, Cat.1 348 639) diluido 1: 100. La placa de 96 pozos se leyó directamente en FACS Caliber. Los datos fueron analizados mediante el software CellQuest.

Reactivos FACS:

- 40 La solución reguladora FACS: Solución reguladora salina de fosfato (PBS) más 2% de FBS (Hyclone, # SH30071.03) y 0.02% de NaN₃ (Sigma # S-8032). Esto sirvió como la solución reguladora de bloqueo, así como la solución reguladora de lavado.

Placas de ELISA (Becton Dickinson, Falcon, placa de fondo en U de 96 pozos, # 351 177).

Tubos FACS (Becton Dickinson, Falcon, # 352052).

Anticuerpo específico de γ -cadena anti-humana marcada con FITC (Jackson, #109-095-098).

Yoduro de propidio (Roche # 1348639)

FACScalibur (Becton Dickinson)

Eppendorf de centrífuga (Eppendorf # 581012)

5 8.2 Resultados

La figura 8 muestra un gráfico del análisis FACS en células de cáncer de colon HT-29 con % del valor máximo en el eje vertical y altura del canal 2 fluorescente en el eje horizontal. Este gráfico muestra que el anticuerpo policlonal de conejo para la región de tallo extracelular de matriptasa (AbCAM, UK, ab28267) se une bien a las células de cáncer de colon HT-29.

10 Ejemplo 9: Detección de proteínas de tallo de matriptasa utilizando transferencia Western

Utilizando el siguiente protocolo de referencia, el anticuerpo policlonal de conejo para la región de tallo extracelular de matriptasa (AbCAM, UK, ab28267) se utilizó para detectar la matriptasa en células CHO-S que expresan la proteína de fusión FcG1de tallo de matriptasa recombinante utilizando transferencia Western.

9.1 Materiales y métodos

15 Las células que crecen en monocapa se lisaron *in situ* con solución reguladora de muestra Laemmli 2x que contiene 4% de SDS, 20% de glicerol, 10% de 2-mercaptoetanol, 0.004% azul de bromofenol, Tris-HCl 0.125 M, pH 6.8, inhibidores de proteinasa, e inmediatamente se congelaron rápidamente. Después de ebullición a 95 °C, durante 5 min, las muestras se enfriaron, se trataron con benzonasa (> 1000 unidades por 1 mL de muestra) durante 30 min, y se sometieron a una serie de sonicación en un baño de agua de ultrasonido (5-10 veces, 10-15 min cada vez) con el ADN genómico puro.

20 Las proteínas a partir de 20-30 μ L de lisado por carril se separaron por electroforesis en mini-gel en mini-geles prefabricados Novex y NuPAGE/Novex (Invitrogen, UK). Los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa con el Sistema iBlot Dry Blotting (Invitrogen, UK). La cantidad de lisados cargados se estimó por la presencia de GAPDH (anticuerpo anti-GAPDH: cat. n. CB1001, Calbiochem; a 1:10000) como un marcador de carga.

25 La membrana se incubó con bloqueador libre de animales (Vector) y se probaron con anticuerpo policlonal de conejo para la región de tallo extracelular de matriptasa (AbCAM, UK, ab28267) en bloqueador libre de animales en dilución 1: 500, en 4 °C, durante 14-18 h, giratorio. El anticuerpo secundario fue conjugado DyLight 488 anti-ratón (Pierce).

9.2 Resultados

30 La figura 9 muestra los resultados de dos transferencias Western en las células CHO-S que expresan la proteína de fusión recombinante FcG1 del tallo de matriptasa, se probaron con el anticuerpo policlonal de conejo para la región de tallo extracelular de matriptasa (AbCAM, UK, ab28267). Estos resultados muestran que hay una señal en un tamaño que corresponde al peso molecular predicho de la proteína de fusión FcG1 del tallo de matriptasa.

35 A lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen el término "matriptasa" se ha utilizado para sustituir la frase "la proteína de la invención" y sustituir referencia interna del solicitante OGTA004 como el expuesto en la solicitud provisional US 60/963,837, de la que esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad. Todos estos términos se deben entender como una referencia al polipéptido matriptasa, el "tallo" de la cual es la parte que permanece en la superficie celular después de autoescisión del sitio de activación.

40 A lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto indique lo contrario, la palabra "comprenden" y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", se entenderá que implica la inclusión de un número entero, paso, grupo de números enteros o grupo de etapas, pero no a la exclusión de cualquier otro número entero, etapa, grupo de números enteros o grupo de pasos.

Las realizaciones de la invención se describen en el presente documento, que comprenden ciertos elementos. La invención se extiende también a realizaciones separadas que consisten en, o que consisten esencialmente de los mismos elementos, y viceversa.

LISTADO DE SECUENCIAS

Secuencia	ID Secuencia
MGSDRARKGGGGPKDFGAGLKYNSRHEKVNGLLEEGVEFLPVNNVKKVEKHGPGRW VVLA AVLIGLLL VLLGIGFLVWHLQYRDVRVQKVFNQYMRITNENFVDAYENSNSTEFV SLASKVKDALKLLYSGVPFLGPYHKESAVTAFSEGSVIAYYWSEFSIPQHLVEEAERV MAEERVVMLPPRARSLKSFVVTSVVAFPTDSKTQRTQDNCSFGLHARGVELMRFT TPGFPDSPYPAHARCQWALRGDADSVLSLTFRSFDLASCDERGS DLVTYNTLSPME PHALVQLCGTYPSPSYNLTFHSSQNVLLITLITNTERRHPGFEATFFQLPRMSSCGGRL RKAQGTFNSPYYPGHYPNIDCTWNIEVPNNQHVVRKFFYLLEPGVPAGTCPKDY VEINGEKYCGERSQFVVTNSNSKITVRFHSDQSYTDTGFLAEYLSYDSSDPCPGQFTC RTGRCIRKELRCDGWADCTDHSDELNCSCDAGHQFTCKNKFCPLFWVCDVND GDNSDEQGCSCPAQTRCSNGKCLSKSQQCNGKDDCGDGSDEASCPKVNVTCTK HTYRCLNGLCLSKGNPECDGKEDCDGSDGSDCGLRSFTRQARVVGTDADG EWPWQVSLHALGQGHICGASLISPNWLVSAAHCYIDDRGFYSDPTQWTAFLGLHD QSQRSAPGVQERRLKRIISHPFFNDFTFDYDIALLELEKPAEYSSMVRPICLPDASHVF PAGKAIWVTGWGHTQYGGTGALILQKGEIRVINQTTCE NLLPQQITPRMMCVGFLSG GVDSCQDGGGLSSVEADGRIFQAGVVS WGDGCAQRNKPGVYTRLPLFRDWIKEN TGV	1
FTTPGFPDSPYPAHAR	2
GDADSVLSLTFR	3
HPGFEATFFQLPR	4
IFQAGVVS WGDGCAQR	5
SAPGVQERR	6
SFVVTSVVAFPTDSK	7
SQFVVTNSNK	8
TQDNCSFGLHAR	9
VQKVFNQYMRITNENFVDAYENSNSTEFVSLASKVKDALKLLYSGVPFLGPYHKESAV TAFSEGSVIAYYWSEFSIPQHLVEEAERVMAEERVVMLPPRARSLKSFVVTSVVAFPT	10
VQKVFNQYMRITNENFVDAYENSNSTEFVSLASKVKDALKLLYSGVPFLGPYHKESAV TAFSEG	11
VQKVFNQYMRITNENFVDAYENSNSTEFVSLASKVKDALKLLYSGVPFLGPYHKESAV TAFSEGSVIAYYWSEFSIPQHLVEEAERVMAEERVVMLPPRARSLK	12
VQKVFNQYMRITNENFVDAYENSNSTEFVSLASKVKDALKLLYSGVPFLGPYHKESAV TAFSEGSVIAYYWSEFSIPQHLVEEAERVMAEERVVMLPPRARSLKSFVVTSVVAFPT DSK	13
VVGTDADGEGEWPWQVSLHALGQGHICGASLISPNWLVSAAHCYIDDRGFYSDPT QWTAFLGLHDQSQRSAPGVQERRLKRIISHPFFNDFTFDYDIALLELEKPAEYSSMVR PICLPDASHVFPAGKAIWVTGWGHTQYGGTGALILQKGEIRVINQTTCE NLLPQQITPR MMCVGFLSGGVDSCQDGGGLSSVEADGRIFQAGVVS WGDGCAQRNKPGVYTRL PLFRDWIKENTGV	14
VQKVFNQYMRITNENFVDAYENSNSTEFVSLASKVKDALKLLYSGVPFLGPYHKESAV TAFSEGSVIAYYWSEFSIPQHLVEEAERVMAEERVVMLPPRARSLKSFVVTSVVAFPT ASGSGIEGRGLEPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK	15

Reivindicaciones

- 5 1. Un reactivo de afinidad capaz de unirse específicamente al tallo de matriptasa situado en la superficie de la célula en donde el tallo de matriptasa tiene la secuencia definida en una cualquiera de las SEQ ID NOS: 10-13 o una secuencia que tiene al menos 80% de identidad con cualquiera de las SEQ ID NOS: 10-13, y en donde el reactivo de afinidad está conjugado con una unidad estructural terapéutica, opcionalmente en donde la unidad estructural terapéutica es una unidad estructural citotóxica o una unidad estructural radioactiva.
- 10 2. Un reactivo de afinidad de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el tallo de matriptasa se define por una cualquiera de las SEQ ID NOS: 10-13 o un polipéptido que tiene 90% o 95% de identidad con una cualquiera de SEQ ID NOS: 10-13.
- 15 3. Un reactivo de afinidad que se une específicamente a un polipéptido que tiene la secuencia de cualquiera de SEQ ID NOS: 10-13, o un polipéptido que tiene 90% o 95% de identidad con una cualquiera de las SEQ ID NOS: 10-13, en donde dicho polipéptido se encuentra sobre una superficie de una célula y en donde dicho reactivo de afinidad no se une específicamente a SEQ ID No: 1, y en donde el reactivo de afinidad está conjugado con una unidad estructural terapéutica, opcionalmente en donde la unidad estructural terapéutica es una unidad estructural citotóxica o una unidad estructural radiactiva.
- 20 4. Un reactivo de afinidad de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que es un anticuerpo, fragmento de anticuerpo del mismo, o un derivado del anticuerpo del mismo.
- 25 5. Un reactivo de afinidad de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el reactivo de afinidad es un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción de unión de antígeno del mismo, o un mimético de anticuerpo, y en donde el anticuerpo monoclonal aislado se selecciona opcionalmente del grupo que consiste de un anticuerpo de longitud completa de una IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 o isotipo, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo monocatenario, un inmunoconjugado, un anticuerpo defucosilado, y un anticuerpo biespecífico.
- 30 6. Un reactivo de afinidad de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el reactivo de afinidad es un fragmento de anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en un unicuerpo, un anticuerpo de dominio y un nanocuerpo.
- 35 7. Un reactivo de afinidad de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el reactivo de afinidad es un mimético de anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en un Afficuerpo, un DARPin, una anticalina, un Avimer, un versacuerpo, y una duocalina.
- 40 8. Un reactivo de afinidad de acuerdo con la reivindicación 4, que es un anticuerpo monoclonal que tiene citotoxicidad contra las células que expresan el antígeno de la matriptasa en presencia de un complemento humano o en presencia de células efectoras inmunes humanas.
9. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más reactivos de afinidad como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.
10. Un reactivo de afinidad tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o una composición como se define en la reivindicación 9 para uso en el tratamiento o prevención de enfermedades, tales como el cáncer, siendo seleccionado opcionalmente dicho cáncer del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, cáncer gástrico, cáncer de próstata o cáncer de útero.
11. Un kit que contiene uno o más reactivos de afinidad de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o que contiene una composición como se define en la reivindicación 9, en donde dicho reactivo de afinidad es apropiado para uso en tratamiento y/o diagnóstico.

Figura 1

Matriptasa (SEQ ID No:1)

Fuente de péptido: 1D-GE, Cáncer de mama

MGSDRARKGGGGPKDFGAGLKYNRSRHEKVNGLEEGVEFLPVNNVKKVEKHGPGRWVLA AVLIGLLLVLGIG
FLVWHLQYRDVRVQKVFNGYMRITNENFVDAYENSNSTEFVSLASKVKDALKLLYSGVPFLGPHYKESAVTAF
SEGSVIAYYWSEFSIPOHLVEEAERVM AEERVVMLPPRARSLKSFVVT SVVAFPTDSKTVQRTQDNCSFGLH
ARGVELMR **FTTPGFPDSPYPAHAR** CQWALRGDADSVLSLTFRSFDLASC DERGSDLVTVYNTLSPMEPHALVQ
LCGTYPSPSYNLTFHSSQNVLLITLITNTERR **HPGF EATFFQLPR** MSSCGGRLRKAQGT FNSPYYPGHYPPNID
CTWNI EVPNNQHV KVRFKFFYLLEPGVPAGTC PKDYVEINGEKYCGERSQFVVT SNSNKITVRFHSDQSYTDT
GFLAEYLSYDSSDPCPGQFTCRTGRCIRKELRCDGWADCTDHSDELNCSCDAGHQFTCKNKFKCPLFWVCD SV
NDCGDN SDEQGCSCPAQTFRC SNGKCLSKSQQCNGKDDCGDGSDEASC PKVNVVTCTKH TYRCLNGLCLSKGN
PECDGKEDCSDGSDEKDCDCGLRSFTRQARVVG GTDADEGEWPQVSLHALGQGHICGASLISPNWLVSAAHC
YIDDRGFRYSDPTQWTAFLGLHDQSQR **SAPGVQERR** LKRIISHPFFNDFTFDYDIALLELEKPAEYSSMVRPI
CLPDASHVFPAGKAIWVTGWGHTQYGGTGALILQKGEIRVINQTT CENLLPQOITPRMCMVGFLSGGVDSCQG
DSGGPLSSVEADGRIFQAGV VSWGDGCAQRNKPGVYTRLPLFRDWIKENTGV

Péptidos coincidentes de masa (negrilla):

FTTPGFPDSPYPAHAR [2]
GDADSVLSLTFR [3]
HPGF EATFFQLPR [4]
SAPGVQERR [6]

Péptidos en tándem (subrayados):

FTTPGFPDSPYPAHAR [2]
GDADSVLSLTFR [3]
SQFVVT SNSNK [8]

Fuente de péptido: 1D-GE, Cáncer colorrectal

MGSDRARKGGGGPKDFGAGLKYNRSRHEKVNGLEEGVEFLPVNNVKKVEKHGPGRWVLA AVLIGLLLVLGIG
FLVWHLQYRDVRVQKVFNGYMRITNENFVDAYENSNSTEFVSLASKVKDALKLLYSGVPFLGPHYKESAVTAF
SEGSVIAYYWSEFSIPOHLVEEAERVM AEERVVMLPPRARSLK **SFVVT SVVAFPTDSK** TVQRTQDNCSFGLH
ARGVELMR **FTTPGFPDSPYPAHAR** CQWALRGDADSVLSLTFRSFDLASC DERGSDLVTVYNTLSPMEPHALVQ
LCGTYPSPSYNLTFHSSQNVLLITLITNTERR **HPGF EATFFQLPR** MSSCGGRLRKAQGT FNSPYYPGHYPPNID
CTWNI EVPNNQHV KVRFKFFYLLEPGVPAGTC PKDYVEINGEKYCGERSQFVVT SNSNKITVRFHSDQSYTDT
GFLAEYLSYDSSDPCPGQFTCRTGRCIRKELRCDGWADCTDHSDELNCSCDAGHQFTCKNKFKCPLFWVCD SV
NDCGDN SDEQGCSCPAQTFRC SNGKCLSKSQQCNGKDDCGDGSDEASC PKVNVVTCTKH TYRCLNGLCLSKGN
PECDGKEDCSDGSDEKDCDCGLRSFTRQARVVG GTDADEGEWPQVSLHALGQGHICGASLISPNWLVSAAHC
YIDDRGFRYSDPTQWTAFLGLHDQSQR **SAPGVQERR** LKRIISHPFFNDFTFDYDIALLELEKPAEYSSMVRPI
CLPDASHVFPAGKAIWVTGWGHTQYGGTGALILQKGEIRVINQTT CENLLPQOITPRMCMVGFLSGGVDSCQG
DSGGPLSSVEADGR **IFQAGV VSWGDGCAQR** NKPGVYTRLPLFRDWIKENTGV

Péptidos coincidentes de masa (negrilla):

FTTPGFPDSPYPAHAR [2]
HPGF EATFFQLPR [4]
IFQAGV VSWGDGCAQR [5]
SFVVT SVVAFPTDSK [7]

Péptidos en tándem (subrayados):

FTTPGFPDSPYPAHAR [2]
GDADSVLSLTFR [3]
SFVVT SVVAFPTDSK [7]

Fuente de péptido: ICAT, Cáncer de próstata

MGSDRARKGGGGPKDFGAGLKYNRHEKVNGLEEGVEFLPVNNVKKVEKHGPGRWVLA AVLIGLLLVLLGIG
 FLVWHLQYRDVRVQKVFNGYMRITNENFVDAYENSNSTEFVSLASKVKDALKLLYSGVPFLGPYHKESAVTAF
 SEGSVIAYYWSEFSIPQHLVEEAERVMAEERVVMLPPRARSLKSFVVT SVVAFPTDSKTVQRTQDN^{SC}SFGLH
 ARGVELMRFTTPGF^{PD}SPYPAHARCQWALRGDADSVLSLTFRSFDLASCDERGS^{DL}VTVYNTLSPMEPHALVQ
 LCGTYPPSYNLTFHSSQNVLLITLITNERRHPGFEATFFQLPRMSSCGGRLRKAQGT^{FNS}PYPGHPYPPNID
 CTWNI EVPNNQHVKVRKFFYLLEPGVPAGTCPKDYVEINGEKYCGERSQFVVT^{SNS}KNITVRFHSDQSYTDT
 GFLAEYLSYDSSDPCPGQFTC^{RT}GR CIRKELRCGWADCTDHSDELNCSCDAGHQFTCKNKFC^{KPL}FWVCD^{SV}
 ND^{CG}DNSDEQGCSCPAQTFRC^{SNG}KCLSKSQQCNGKDDCGDGSDEASC^{PKV}NVVTCTKHTYRCLNGLCLSKGN
 PEC^{DG}KEDCSDGSDEKDCDCGLRSFTRQARVVG^{TD}DADEGEWPQVSLHALGQGHICGASLISP^{NWL}VSAHC
 YIDDRGFRYSDPTQWTAFLGLHDQSQRSAPGVQERRLKRIISHPFFNDFTFDYDIALLELEKPAEYSSMRPI
 CLPDASHVFPAGKAIWVTGWGHTQYGGTGALILQKGEIRVINQTT^{CEN}LLPQQITPRM^{MC}VGFLSGGVDSCQ^G
 DSGGPLSSVEADGRIFQAGV^{SW}GDGCAQRNKP^{GV}YTRLPLFRDWIKENTGV

Péptidos coincidentes de masa (negrilla):

Péptidos en tándem (subrayados)

TQDN^{SC}SFGLHAR [9]

Figura 2

Figura 2(a)

Secuencia de Tallo de Matriptasa A

MGSDRARKGGGGPKDFGAGLKYSRHEKVNLEEGVEFLPVNNVKKVEKHGPGRWVLA AVLIGLLLVLLGIG
FLVWHLQYRDVVRVQKVFNGMYRITNENFVDAYENSNSTEFVSLASKVKDALKLLYSGVPFLGPYHKESAVTAF
SEGSVIAIYYWSEFSIPQHLVEEAERVMAEERVVMLPPRARSLSFVVTSVVAFPTDSKTQVQRTQDNCSFGLH
ARGVELMRFTTPGFPDSPYPAHARCQWALRGDADSVLSLTFRSFDLASCDERGSDLVTVYNTLSPMEPHALVQ
LCGTYPSPSYNLTFHSSQNVLLITLITNTERRHPGFEATFFQLPRMSSCGGRLRKAQGTFSNPPYPGHYPNID
CTWNIIEVPNNQHVKVRKFFYLLEPGVPAGTCPKDYVEINGEKYCGERSQFVVTSSNSKITVRFHSDQSYTDT
GFLAEYLSYDSSDPCPGQFTCRTCGRIRKELRCDGWADCTDHSDELNCS CDAGHQFTCKNKFCCKPLFWVCDV
NDCGDNDSDEQGCSCPAQTFRC SNGKCLSKSQQCNGKDDCGDGSDEASC PKVNVVTCTKHTYRCLNGLCLSKGN
PEC DGKEDCSDGSDEKDCDGLRSFTRQARVVGTDADGEWQPQVSLHALGQGHICGASLISPNWLVSAAHC
YIDDRGFRYS DPTQWTAFLGLHDQSQRSA PGVQERRLKRIISHPFFNDFTFDYDIALLELEKPAEYSSMVRPI
CLPDASHVFPAGKAIWVTGWGHTQYGGTGALILQKGEIRVINQTT CENLLPQQITPRMMC VGFLSGGVDS CQG
DSGGPLSSVEADGRIFQAGVVS WGDGCAQRNKPGVYTRLPLFRDWIKENTGV

Secuencia Tallo (negrilla)	Amino ácidos	Sec ID
VQKVFNGMYRITNENFVDAYENSNSTEFVSLASKVKDALKLLYSGVPFLGPYHKESAVTAFSEGSVIAIYYWSEFSIPQHLVEEAERVMAEERVVMLPPRARSLSFVVTSVVAFPT	86-201	10

Figura 2(b)

Secuencia de Tallo de Matriptasa B

MGSDRARKGGGGPKDFGAGLKYSRHEKVNLEEGVEFLPVNNVKKVEKHGPGRWVLA AVLIGLLLVLLGIG
FLVWHLQYRDVVRVQKVFNGMYRITNENFVDAYENSNSTEFVSLASKVKDALKLLYSGVPFLGPYHKESAVTAF
SEGSVIAIYYWSEFSIPQHLVEEAERVMAEERVVMLPPRARSLSFVVTSVVAFPTDSKTQVQRTQDNCSFGLH
ARGVELMRFTTPGFPDSPYPAHARCQWALRGDADSVLSLTFRSFDLASCDERGSDLVTVYNTLSPMEPHALVQ
LCGTYPSPSYNLTFHSSQNVLLITLITNTERRHPGFEATFFQLPRMSSCGGRLRKAQGTFSNPPYPGHYPNID
CTWNIIEVPNNQHVKVRKFFYLLEPGVPAGTCPKDYVEINGEKYCGERSQFVVTSSNSKITVRFHSDQSYTDT
GFLAEYLSYDSSDPCPGQFTCRTCGRIRKELRCDGWADCTDHSDELNCS CDAGHQFTCKNKFCCKPLFWVCDV
NDCGDNDSDEQGCSCPAQTFRC SNGKCLSKSQQCNGKDDCGDGSDEASC PKVNVVTCTKHTYRCLNGLCLSKGN
PEC DGKEDCSDGSDEKDCDGLRSFTRQARVVGTDADGEWQPQVSLHALGQGHICGASLISPNWLVSAAHC
YIDDRGFRYS DPTQWTAFLGLHDQSQRSA PGVQERRLKRIISHPFFNDFTFDYDIALLELEKPAEYSSMVRPI
CLPDASHVFPAGKAIWVTGWGHTQYGGTGALILQKGEIRVINQTT CENLLPQQITPRMMC VGFLSGGVDS CQG
DSGGPLSSVEADGRIFQAGVVS WGDGCAQRNKPGVYTRLPLFRDWIKENTGV

Secuencia Tallo (negrilla)	Amino ácidos	Sec ID	Sitio de escisión (subrayado)
VQKVFNGMYRITNENFVDAYENSNSTEFVSLASKVKDALKLLYSGVPFLGPYHKESAVTAFSEG	86-149	11	G149

Figura 2(c)

Secuencia del Tallo de Matriptasa C

MGSDRARKGGGGPKDFGAGLKYNRSRHEKVNGLEEGVEFLPVNNVKKVEKHGPGRWVLA AVLIGLLLVLLGIG
 FLVWHLQYRDVRVQKVFNGYMRITNENFVDAYENSNSTEFVSLASKVKDALKLLYSGVPFLGPYHKESAVTAF
SEGSVIAYYWSEFSIPQHLVEEAERVMAEERVVMLPPRARSLSKSFVVTSVVAFPTDSKTQRTQDNCSFGLH
 ARGVELMRFTTPGFPDSPYPAHARCQWALRGDADSVLSLTFRSFDLASC DERGSDLVTVYNTLSPMEPHALVQ
 LCGTYPPSYNLTFHSSQNVLITLITNTERRHPGFEATFFQLPRMSSCGGRLRKAQGTFNSPYPGHYPPNID
 CTWNIIEVPNNQHVKVRKFFYLLEPGVPAGTCKPKDYVEINGEKYCGERSQFVVTSSNSKITVRFHSDQSYTDT
 GFLAEYLSYDSSDPCPGQFTCRGTGR CIRKELRCDGWADCTDHSDELNCSCDAGHQFTCKNKFCPLFWVCD SV
 NDCGDN SDEQGCSCPAQTFRC SNGKCLSKSQQCNGKDDCGDGSDEASC PKVNVVTCTKHTYRCLNGLCLSKGN
 PECDGKEDCSDGSDEKDCDGLRSFTRQARVVGGTDADEGEWPQVSLHALGQGHICGASLISPNWLVSAAHC
 YIDDRGFRYSDPTQWTAFLGLHDQSQRSA PGVQERRLKRIISHPFFNDFTFDYDIALLELEKPAEYSSMVRPI
 CLPDASHVFPAGKAIWVTGWGHTQYGGTGALILQKGEIRVINQTTCE NLLPQQITPRMCMVGFLSGGV DSCQG
 DSGGPLSSVEADGRIFQAGVVS WGDGCAQRNKG VYTRLPLFRDWIKENTGV

Secuencia Tallo (negrilla)	Amino ácidos	Sec ID	Sitio de escisión (subrayado)
VQKVFNGYMRITNENFVDAYENSNSTEFVSLASKVKDALKLLYSGVPFLGPYHKESAVTAFSEGSVIAYYWSEFSIPQHLVEEAERVMAEERVVMLPPRARSLSK	86-189	12	K189

Figura 2(d)

Secuencia de Tallo de Matriptasa D

MGSDRARKGGGGPKDFGAGLKYNRSRHEKVNGLEEGVEFLPVNNVKKVEKHGPGRWVLA AVLIGLLLVLLGIG
 FLVWHLQYRDVRVQKVFNGYMRITNENFVDAYENSNSTEFVSLASKVKDALKLLYSGVPFLGPYHKESAVTAF
SEGSVIAYYWSEFSIPQHLVEEAERVMAEERVVMLPPRARSLSKSFVVTSVVAFPTDSKTQRTQDNCSFGLH
 ARGVELMRFTTPGFPDSPYPAHARCQWALRGDADSVLSLTFRSFDLASC DERGSDLVTVYNTLSPMEPHALVQ
 LCGTYPPSYNLTFHSSQNVLITLITNTERRHPGFEATFFQLPRMSSCGGRLRKAQGTFNSPYPGHYPPNID
 CTWNIIEVPNNQHVKVRKFFYLLEPGVPAGTCKPKDYVEINGEKYCGERSQFVVTSSNSKITVRFHSDQSYTDT
 GFLAEYLSYDSSDPCPGQFTCRGTGR CIRKELRCDGWADCTDHSDELNCSCDAGHQFTCKNKFCPLFWVCD SV
 NDCGDN SDEQGCSCPAQTFRC SNGKCLSKSQQCNGKDDCGDGSDEASC PKVNVVTCTKHTYRCLNGLCLSKGN
 PECDGKEDCSDGSDEKDCDGLRSFTRQARVVGGTDADEGEWPQVSLHALGQGHICGASLISPNWLVSAAHC
 YIDDRGFRYSDPTQWTAFLGLHDQSQRSA PGVQERRLKRIISHPFFNDFTFDYDIALLELEKPAEYSSMVRPI
 CLPDASHVFPAGKAIWVTGWGHTQYGGTGALILQKGEIRVINQTTCE NLLPQQITPRMCMVGFLSGGV DSCQG
 DSGGPLSSVEADGRIFQAGVVS WGDGCAQRNKG VYTRLPLFRDWIKENTGV

Secuencia Tallo (negrilla)	Amino ácidos	Sec ID	Sitio de escisión (subrayado)
VQKVFNGYMRITNENFVDAYENSNSTEFVSLASKVKDALKLLYSGVPFLGPYHKESAVTAFSEGSVIAYYWSEFSIPQHLVEEAERVMAEERVVMLPPRARSLSKSFVVTSVVAFPTDSK	86-204	13	K204

Figura 3**Dominio catalítico de Matriptasa**

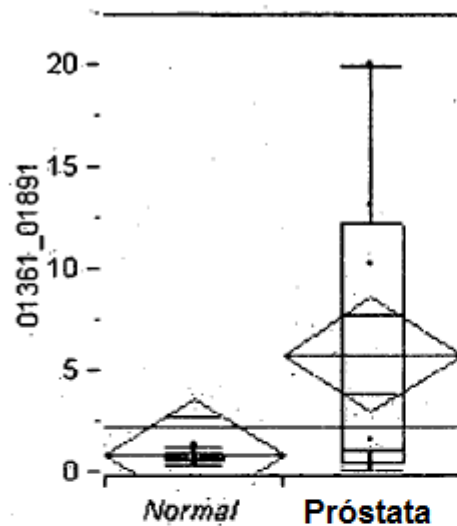
MGSDRARKGGGGPKDFGAGLKYNRHEKVNGLEEGVEFLPVNNVKKVEKHGPGRWVLA AVLIGLLLVLLGIG
 FLVWHLQYRDVRVQKVFNGYMRITNENFVDAYENSNSTEFVSLASKVKDALKLLYSGVPFLGPYHKESAVTAF
 SEGSVIAYYWSEFSIPQHLVEEAERVMAEERVVMLPPRARSLKSFVVTSVVAFPTDSKTVQRTQDNSCSFGLH
 ARGVELMRFTTPGFDPSPYPAHARCQWALRGDADSVLSLTFRSFDLASC DERGSDLVTVYNTLSPMEPHALVQ
 LCGTYPPSYNLTFHSSQNVLLITLITNTERRHPGFEATFFQLPRMSSCGGRLRKAQGTFNSPYYPGHYPPNID
 CTWNIEVPNNQHVVRFKFFYLLEPGVPAGTCPKDYVEINGEKYCGERSQFVVTSNSNKITVRFHSDQSYTDT
 GFLAEYLSYDSSDPCPGQFTCRTCIRKELRCDGWADCTDHSDELNCS CDAGHQFTCKNKFCPLFWCDSV
 NDCGDNSEQGCSCPAQTFRC SNGKCLSKSQQCNGKDDCGDGSDEASC PKVNVVTCTKHTYRCLNGLCLSKGN
 PECDGKEDCSDGSDEKDCDGLRSFTRQAR**VVGGTDADEGEWPQVSLHALGQGHICGASLISPNWLVSAAH**
YIDDRGFRYSDPQTQWTAFLGLHDQSQRSAPGVQERRLKRIISHPFFNDFTFDYDIALLELEKPAEYSSMVRPI
 CLPDASHVFPAGKAIWVTGWGHTQYGGTGALILQKGEIRVINQTT**CENLLPQQITPRM**CVGFLSGGVDSCQG
 DSGGPLSSVEADGRIFQAGVVS**WGDGCAQRNKPGVYTRLPLFRDWIKENTGV**

Secuencia dominio catalítico (negrilla)	Amino ácidos	Sec ID	Sitio de escisión (subrayado)
VVGGTDADEGEWPQVSLHALGQGHICGASLISPNWLVSAAH CYIDDRGFRYSDPQTQWTAFLGLHDQSQRSAPGVQERRLKRII SHPFFNDFTFDYDIALLELEKPAEYSSMVRPICLPDASHVFP AGKAIWVTGWGHTQYGGTGALILQKGEIRVINQTT CENLLP QITPRM CVGFLSGGVDSCQ DSGGPLSSVEADGRIFQAGVV SWGDGCAQRNKPGVYTRLPLFRDWIKENTGV	615-855	14	R614

Figura 4

Proteína de fusión hFcG1- tallo de Matriptasa (SEQ ID No:15)

vqkvfngymritnenfvdayensnstefvslaskvkdalkllysgvpflgpyhkesavtafsegsviayywsefsip
qhlveeaervmaeervvmlpprarslksfvvtsvvafptasgsgiegrglepkssdkthtcppcpapellggpsvflfpk
pkdtlmsrtpcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkai
papiektiskakgqprepqvylppsrdeitknqvslclvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdk
srwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslsispkg

Figura 5**Cuartiles**

Nivel	Mínimo	10%	25%	Median	75%	90%	Máximo
Normal	0.440286	0.440286	0.769704	0.936737	1.169809	1.383672	1.383672
Próstata	0.312288	0.312288	0.651666	1.270108	12.38386	19.98669	19.98669

Medias para Anova Una vía

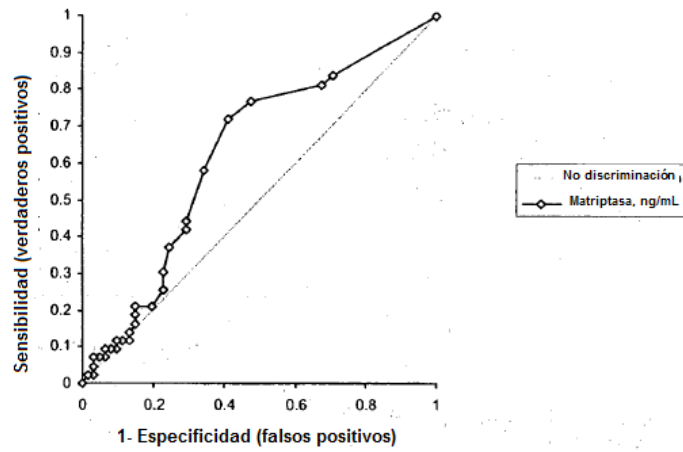
Nivel	Número	Media	Error Std	Inferior 95%	superior 95%
Normal	8	0.94982	1.3446	-1.806	3.7032
Próstata	8	5.93560	1.3446	-3.181	8.6900

Medias de comparación**Comparaciones para cada par usando t de Student**

Nivel	Nivel	Diferencia	CL Inferior	CL Superior	Valor-p
Próstata	Normal	4.985780	1.08150	8.890056	0.0140

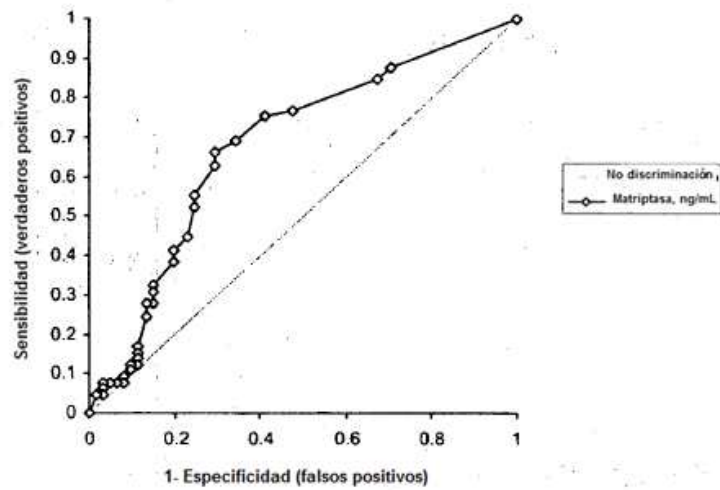
Figura 6

Figura 6(a)



Curva	Área	SE	p	95% CI de Área	Mama vs Normal = cáncer de mama
Matriptasa, ng/mL	0.625	0.0558	0.0123	0.516 a 0.735	tienen valores más altos

Figura 6(b)



Curva	Área	SE	p	95% CI de Área	Colon vs Normal = Cáncer de colon
Matriptasa, ng/mL	0.680	0.0487	0.0001	0.584 to 0.775	tienen valores más altos

Figura 7(a)

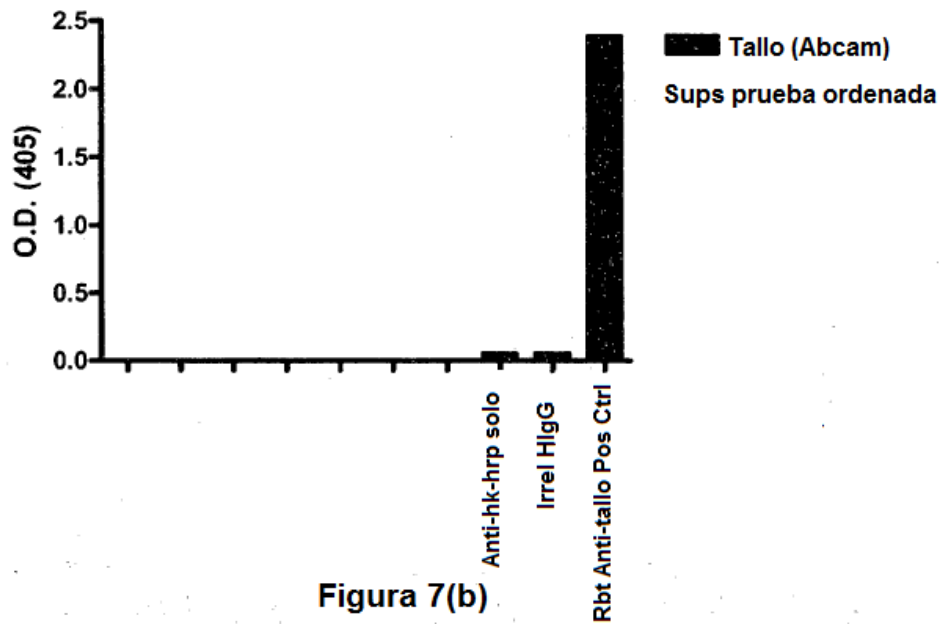


Figura 7(b)

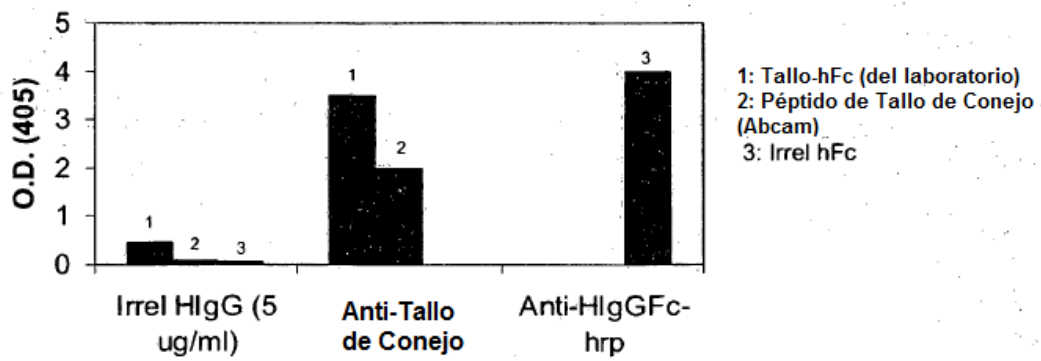


Figura 8

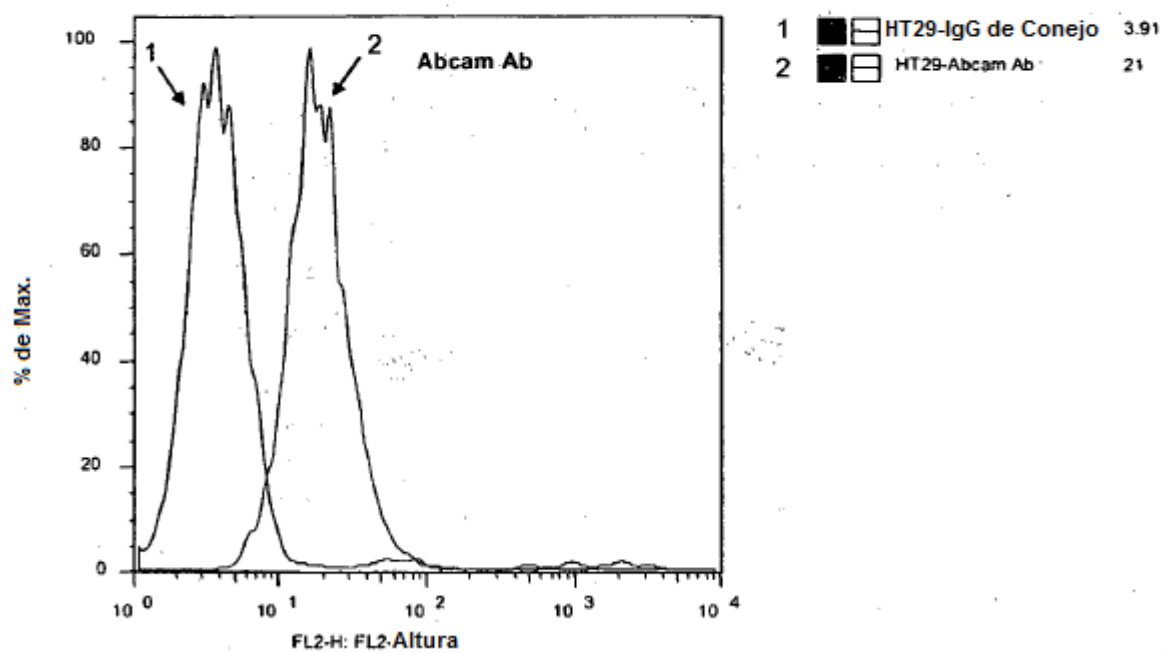


Figura 9

