

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 055**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/47** (2006.01)

**C12N 15/12** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**C07K 16/22** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2009 E 09755823 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.12.2015 EP 2294197**

54 Título: **Variante de la proteína Hhip1 y métodos y usos de la misma**

30 Prioridad:

**30.05.2008 US 57762 P**

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

**17.03.2016**

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (50.0%)**  
**1 DNA Way**  
**South San Francisco, CA 94080, US y**  
**CURIS, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BOSANAC, IVAN;**  
**HYMOWITZ, SARAH G.;**  
**LAZARUS, ROBERT A.;**  
**MAUN, HENRY R.;**  
**SCALES, SUZANNA J.;**  
**WEN, XIAOHUI;**  
**DE SAUVAGE, FREDERIC J. y**  
**BAZAN, JOSE F.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 564 055 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

Variante de la proteína Hhip1 y métodos y usos de la misma.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones químicas útiles para el diagnóstico y tratamiento de tumores en mamíferos y a métodos de uso de estas composiciones químicas para los mismos.

10 **Antecedentes de la invención**

La homología muy conservada del morfógeno secretado Hedgehog (Hh) es la responsable de la diferenciación celular adecuada durante la embriogénesis tanto de invertebrados como vertebrados (revisado en Ingham and McMahon (2001) *Genes Dev.* 15:3059-30R7). En los mamíferos, se han identificado tres genes Hedgehog que codifican para las proteínas Sonic Hedgehog (Shh), Indian Hedgehog (Ihh) y proteínas Desert Hedgehog (Dhh). Sus funciones van desde la asimetría izquierda-derecha, el desarrollo del patrón del tubo neural, el desarrollo del patrón de las extremidades y la morfogénesis de la ramificación hasta la formación del hueso y la espermatogénesis. Las mutaciones de los componentes de la vía pueden conducir a trastornos drásticos del desarrollo. Aunque la señalización de Hh está principalmente inactiva en adultos, esta se ha implicado en muchos tipos de cáncer, lo que sugiere que la inhibición de esta vía puede tener un beneficio terapéutico (revisado en Beachy, P.A. *et al.* (2004) *Nature* 432:324-331; Pasca di Magliano y Hebrok (2003) *Nat. Rev. Cancer* 3:903-911; Rubin y de Sauvage (2006) *Nat Rev Drug Discov.* 5(12): 1026-33).

La activación de la vía Hedgehog a través de la sobreexpresión de Hedgehog es una característica de muchos tipos de cáncer. En la literatura se describe que la sobreexpresión de Hedgehog se ha detectado en muchas biopsias de tumores humanos y líneas de células de diferentes tipos, incluyendo, por ejemplo, el cáncer de pulmón microcítico (CPM), el cáncer gástrico y el cáncer del tracto gastrointestinal superior, cáncer de páncreas y cáncer de próstata.

El dominio amino terminal de Hh maduro, responsable de la señalización de corto y largo alcance apropiada de Shh (a veces referido como Shh-N), se produce por escisión autoproteolítica del dominio de tipo inteína C-terminal (Lee, J.J. *et al.* (1994) *Science* 266:1528-1537; Porter, J.A. *et al.* (1995) *Nature* 374:363-366; Porter, J. A. *et al.* (1996) *Cell* 86:21-34) seguido de la adición de colesterol en el extremo C-terminal y palmitoilación en el extremo N-terminal (Pepinsky *et al.* (1998) *J. Biol. Chem.* 273:14037-14045; Porter, J.A. *et al.* (1996) *Science* 274:255-259). La estructura cristalina de la Shh murina reveló un catión  $Zn^{2+}$  coordinado tetraédricamente Hall, T.M. *et al.* (1995) *Nature* 378:212-216) con una topología general similar a las del clan MD de metaloproteasas (Rawlings, N.D. *et al.* (2008) *Nucleic Acids Res.* 36:D320-325), que incluye lisostatinas bacterianas (Bochtler, M. *et al.* (2004) *Protein Sci.* 13: 54-861) y la dipeptidasa VanX (Bussiere, D.E. *et al.* (1998) *Mol. Cell* 2:75-84). Aunque Shh contiene un sitio de metaloproteasa pseudo-activo, las mutaciones en el sitio activo no afectan negativamente a la actividad de señalización de los ensayos biológicos, lo que sugiere que Shh actúa como socio de unión para los receptores unidos a la membrana en lugar de como una proteasa enzimáticamente activa (Fuse, N. *et al.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:10992-10999).

En la superficie de la célula, la señal de Hh se transmite por dos proteínas multi-transmembrana. La proteína transmembrana de 12 pasos Patched (Ptch) es un regulador negativo de la vía, que en ausencia de ligando impide la señalización mediante la represión de la proteína transmembrana de 7 pasos Smoothed (Smo) (Chen y Struhl (1996) *Cell* 87:553-563; Marigo, V. *et al.* (1996) *Nature* 384:176-179; Stone, D.M. *et al.* (1996) *Nature* 384:129-134). La unión de Shh a Ptch mitiga la inhibición de Smo, permitiendo que su translocación al cilio primario (Rohatgi y Scott (2007) *Nat. Cell Biol.* 9:1005-1009), donde una serie de acontecimientos de señalización en etapas posteriores de la vía aún poco conocidos, conducen en última instancia a la activación de una familia de factores de transcripción con dedo de Zn denominada Gli (Ingham and McMahon (2001) *Genes Devel.* 15:3059-3087).

La regulación de la señal de Hh en la superficie celular por Ptch está precisamente ajustada por diversas moléculas de superficie celular adicionales tales como las proteínas de invertebrados Ihog (Hedgehog de interferencia) (Lum, L. *et al.* (2003), *Science* 299: 2039-2045; Yao, S. *et al.* (2006) *Cell* 125: 343-357) y Boi (hermano de Ihog) (Yao, S. *et al.* (2006) *Cell* 125:343-357) y sus correspondientes homólogos de vertebrados Cdon (Kang, J. S. *et al.* (1997) *J. Cell. Biol.* 138: 203-213; Zhang, W. *et al.* (2006) *Dev. Cell* 10:657-65) y Boc (proteína de unión a Cdon biorregional) (Kang, J. S. *et al.* (2002) *EMBO J.* 21:114-124; Tenzen, T. *et al.* (2006) *Dev. Cell* 10: 647-656). Los co-receptores Ihog/Boi Cdon/Boc y GAS1 (proteína específica de la detención del crecimiento 1), que carece de un homólogo conocido en *Drosophila*, son agonistas de la vía que mejoran la recepción de la señal (Allen, B.L. *et al.* (2007) *Genes Dev.* 21:1244-57).

Al igual que Ptch, la proteína de interacción con Hedgehog (Hhip1, también conocida como Hip) es un regulador negativo de la vía y su transcripción está regulada positivamente en respuesta a la señalización de Hh (Chuang, P.T. *et al.* (2003) *Genes Dev.* 17:342-347; Chuang, P.T. *et al.* (1999) *Nature* 397:617-621). Las afinidades de unión de Shh a Hhip1 y Ptch en las células son similares, con valores  $K_D$  de 5 nM para Hhip1 y 4 nM para Ptch (Chuang y McMahon (1999) *Nature* 397:617-621). En varios tipos de tejidos de tumores humanos se ha observado una

disminución de los niveles de expresión de Hhip1, lo que sugiere un papel importante para Hhip1 en la supresión del desarrollo del tumor (Olsen, C.L. *et al.* (2004) BMC Cáncer 4:43).

Hhip1 es una proteína de 700 restos con un péptido señal N-terminal y una gran región extracelular que termina con un tramo hidrófobo C-terminal (Chuang y McMahon (1999) Nature 397:617-621). Además de la forma predominantemente asociada a la membrana, también se ha detectado una forma soluble de Hhip1 en cerebros maduros de roedores adultos (Coulombe, J. *et al.* (2004) Mol. Cell. Neurosci. 25:323-333). Aparte de la probable presencia de dos dominios del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y cuatro sitios potenciales de N-glicosilación (Chuang y McMahon (1999) Nature 397:617-621), no se sabe nada acerca de la disposición estructural del dominio extracelular (DEC) de Hhip1.

Aunque la estructura de Shh se conoce desde hace algún tiempo, no se ha logrado conocer con precisión las interacciones moleculares con sus receptores asociados a la membrana. Recientemente, una comparación de las estructuras del dominio 1 de fibronectina tipo III (FNIII) de Ihog y del dominio 3 de FNIII de Cdon en el complejo con la Hh de *Drosophila* y la Shh de vertebrados, respectivamente, han revelado modos de unión completamente diferentes (McLellan, J. S. *et al.* (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103:17208-17213).

Hasta ahora, la estructura cristalina de Hhip1 ha quedado sin resolver y no se sabía cómo Hhip1 interactuaba con Hh para ejercer su efecto. De modo similar, Ptch no se había cristalizado, por lo que también se desconocía cómo Ptch interactuaba con Hh.

Por lo tanto, con el fin de luchar eficazmente contra los tumores asociados a la vía de Hedgehog, existe una necesidad urgente en la técnica de comprender mejor la interacción precisa de Hh con moléculas controladoras de Hh como Hhip1 y Ptch. Un conocimiento más completo de la relación estructural/funcional de los miembros de la vía de señalización de Hedgehog y más específicamente, un mayor conocimiento de la interacción molecular entre Ptch y Hhip1 con Hh proporcionaría la información necesaria para el diseño racional de inhibidores de molécula pequeña y molécula grande de Hh y terapias para los cánceres y trastornos relacionados con Hh.

### Sumario de la invención

Con el fin de entender mejor la regulación de Shh por Hhip1, determinamos las estructuras cristalinas de una forma truncada del ectodominio de Hhip1 tanto solo como en el complejo con Shh. La compleja estructura revela una interacción fundamental entre un bucle en la hélice 1 $\beta$  de Hhip y la hendidura que contiene Zn<sup>2+</sup> del sitio de pseudo-activo de Shh. Sorprendentemente, en Ptch se encuentra un motivo similar, lo que sugiere que Ptch y Hhip 1 compiten por la unión al sitio pseudo-activo de Shh. Esto explicaría la regulación negativa por Hhip1 como señuelo estructural para Shh, evitando la unión de Ptch y la activación de la vía. Los datos también ayudan a comprender el efecto de las mutaciones en y alrededor del sitio pseudo-activo en las proteínas Hh que están asociadas a patologías humanas (Dubourg *et al.* (2004); Gao and He (2004)). Tomados en conjunto, los datos nos permiten proponer un modelo para la regulación de la actividad de Hh a través de las interacciones con el receptor y sugieren nuevos enfoques para el desarrollo de antagonistas de la señalización de Hh.

Por lo tanto, esta memoria descriptiva describe una variante de la proteína de interacción con Hedgehog (Hhip1) que carece de un supuesto dominio frizzled, a la que se hace referencia en la presente memoria como "Hhip1 $\beta_{12}$ " y la estructura cristalina de la misma. Se ha descubierto sorprendentemente que la proteína Hhip1 $\beta_{12}$  representa una proteína Hhip1 $\beta_{12}$  con una mayor estabilidad a la vez que mantiene completamente la actividad inhibitoria de Hh. Por lo tanto, se ha resuelto la estructura cristalina de Hhip1 $\beta_{12}$  y se ha analizado la interacción con Hh y otras proteínas, tales como Ptch. Hhip1 $\beta_{12}$  contiene aminoácidos críticos que interactúan con Hh y Ptch, lo que permite el diseño de moléculas de interacción tales como, por ejemplo, agonistas y antagonistas de polipéptidos, inmunoadhesinas, anticuerpos e inhibidores de molécula pequeña y agonistas.

La invención es como se define en las reivindicaciones.

En una realización, la invención proporciona un anticuerpo como se reivindica. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, fragmento de anticuerpo, anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado, anticuerpo de cadena única o anticuerpo que inhibe competitivamente la unión de un anticuerpo anti-polipéptido Hhip1 $\beta_{12}$  a su respectivo epítipo antigénico. Los anticuerpos de la presente invención pueden estar opcionalmente conjugados con un agente inhibidor del crecimiento o un agente citotóxico, tal como una toxina, incluyendo, por ejemplo, un maitansinoide o calicheamicina, un antibiótico, un isótopo radioactivo, una enzima nucleolítica o similar. Los anticuerpos de la presente invención se pueden producir opcionalmente en células CHO o células bacterianas y preferiblemente inhiben el crecimiento o la proliferación de o inducen la muerte de una célula a la que se unen. Para fines de diagnóstico, los anticuerpos de la presente invención pueden marcarse de manera detectable, unirse a un soporte sólido, o similar.

En algunas realizaciones, los anticuerpos de la invención interfieren con la interacción entre Hh y Hhip1 o Hh y Ptch. En algunas realizaciones, los anticuerpos son distintos de 5E1. En otras realizaciones, los anticuerpos estimulan la señalización de Hh.

En otras realizaciones de la presente invención, la invención proporciona vectores que comprenden ADN que codifica para cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente memoria. También se proporcionan células hospedadoras que comprenden cualquiera de dichos vectores. A modo de ejemplo, las células hospedadoras pueden ser células CHO, células de *E. coli* o células de levadura. Además, se proporciona un proceso para producir cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente memoria y comprende cultivar células hospedadoras en condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo deseado y recuperar el anticuerpo deseado del cultivo celular.

En algunas realizaciones los oligopéptidos interfieren con la interacción entre Hh y Hhip1 o Ptch. En otras realizaciones los oligopéptidos estimulan la señalización de Hh mediante la unión a Ptch.

En otra realización, la invención proporciona oligopéptidos (“oligopéptidos de unión a Hhip1<sub>β12</sub>”) como se reivindica. Opcionalmente, los oligopéptidos de unión a Hhip1<sub>β12</sub> de la presente invención se pueden conjugar con un agente inhibidor del crecimiento o agente citotóxico, tal como una toxina, incluyendo, por ejemplo, un maitansinoide o calicheamicina, un antibiótico, un isótopo radioactivo, una enzima nucleolítica o similar. El oligopéptido de unión a Hhip1<sub>β12</sub> de la presente invención se puede producir opcionalmente en células CHO o células bacterianas y preferiblemente inhibe el crecimiento o proliferación de o induce la muerte de una célula a la que se une. Para fines diagnósticos, los oligopéptidos de unión a Hhip1<sub>β12</sub> de la presente invención pueden marcarse de manera detectable, unirse a un soporte sólido, o similar.

En otra realización, la invención proporciona oligopéptidos (“oligopéptidos que imitan al bucle L2 de Hhip1”) que se unen, preferiblemente específicamente, a polipéptidos Hh. Opcionalmente, los oligopéptidos que imitan al bucle L2 de Hhip1 de la presente invención pueden conjugarse con un agente inhibidor del crecimiento o un agente citotóxico, tal como una toxina, incluyendo, por ejemplo, un maitansinoide o calicheamicina, un antibiótico, un isótopo radioactivo, una enzima nucleolítica, o similares. Los oligopéptidos que imitan al bucle L2 de Hhip1 de la presente invención se pueden producir opcionalmente en células CHO o células bacterianas y preferiblemente inhiben el crecimiento o la proliferación de o inducen la muerte de una célula a la que se unen. Para fines diagnósticos, los oligopéptidos que imitan al bucle L2 de Hhip1 de la presente invención pueden marcarse de manera detectable, unirse a un soporte sólido, o similar.

En otras realizaciones de la presente invención, la invención proporciona vectores que comprenden ADN que codifica para cualquiera de los oligopéptidos de unión a Hhip1<sub>β12</sub> y los oligopéptidos que imitan al bucle L2 de Hhip1 descritos en la presente memoria. También se proporcionan células hospedadoras que comprenden cualquiera de dichos vectores. A modo de ejemplo, las células hospedadoras pueden ser células CHO, células de *E. coli* o células de levadura. También se proporciona un proceso para producir cualquiera de los oligopéptidos de unión a Hhip1<sub>β12</sub> y los oligopéptidos que imitan al bucle L2 de Hhip1 descritos en la presente memoria y comprende cultivar células hospedadoras en condiciones adecuadas para la expresión del oligopéptido deseado y recuperar el oligopéptido deseado del cultivo celular.

Sin embargo, otras realizaciones de la presente invención serán evidentes para el experto en la materia tras una lectura de la presente memoria descriptiva.

### Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1 A-C** muestra un alineamiento de ADNc humano para Hhip1<sub>β12</sub> (SEC ID N°: 1) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEC ID N°: 2). **1B** muestra también el bucle L2 (sombreado) con restos de aminoácidos importantes marcados con † y \*.

La **Figura 2** muestra la supuesta ubicación de las regiones de Hip: **2A** muestra la secuencia de aminoácidos de Hhip1<sub>β12</sub> mostrando las supuestas ubicaciones del líder (SEC ID N°: 3); supuesto dominio Fz (SEC ID N°: 4); enlazador (SEC ID N°: 5); hélice β (SEC ID N°: 6); bucle L2 (SEC ID N°: 7); dominio EGF1 (SEC ID N°: 8); dominio EGF2 (SEC ID N°: 9) y supuesta secuencia señal GPI (SEC ID N°: 10). **2B** muestra las alineaciones de las regiones del bucle L2 de Hhip1<sub>β12</sub> humana (SEC ID N°: 7), Ptch humana (SEC ID N°: 17), Ptch de ratón (SEC ID N°: 18), Ptch de pollo (SEC ID N°: 19), Ptch de pez cebra (SEC ID N°: 20), Ptch de *Drosophila* (SEC ID N°: 21), Ptch de gusano (SEC ID N°: 22), Ptch2 humana (SEC ID N°: 23) y Ptch2 de ratón (SEC ID N°: 24).

La **Figura 3** muestra una caracterización de la región mínima de Hhip1<sub>ECD</sub> requerida para la inhibición de la vía de Hedgehog. Panel A: arquitectura del dominio de Hhip1 predicha a partir de análisis bioinformático. Se muestran los restos que definen los límites del dominio para las construcciones utilizadas en el estudio. Las líneas dentro de la membrana plasmática (MP) representan las colas de lípidos del anclaje de GPI. Las construcciones que contienen Hhip1<sub>ECD</sub> (SEC ID N°: 11), Hhip1<sub>β12</sub> (SEC ID N°: 12), Hip<sub>β1</sub> (SEC ID N°: 13), Hip<sub>β</sub> (SEC ID N°: 14) y Hhip1<sub>FZ</sub> (SEC ID N°: 16) abarcan los restos 20-667, 193-667, los restos 193-637 y 193-607 y 20-193 de la SEC ID N°: 2, respectivamente; Panel B: La inhibición de la señalización de Shh por diferentes dominios de Hhip1<sub>ECD</sub> en ensayos de señalización con cocultivo de Gli-luciferasa. En este ensayo, células HT-29 productoras de Shh fueron cultivadas junto con fibroblastos S12 que expresan de forma estable Gli-luciferasa, seguido de incubación con dominios Hhip1 y medición de la actividad luciferasa como se describe en los procedimientos experimentales. Los resultados se representan como la media de tres triplicados independientes ± desviación estándar; Panel C: Representación mediante dibujos de la estructura de Hhip1<sub>β12</sub>. Hhip1<sub>ECD</sub>

contiene seis hélices  $\beta$  en forma de pala y dos dominios EGF. Se muestran los extremos N-terminal y C-terminal; Panel D: Superposición de cinco modelos de Hhip1 $_{\beta 12}$  de estructuras cristalinas libres y unidas a Shh incluyendo el sistema trigonal y el sistema ortorrómbico. La flecha indica la región flexible entre los dos dominios EGF; Panel E: Vista de primer plano de la interacción entre la hélice  $\beta$  y EGF1 (inserto en óvalo) destacando el enlace disulfuro interdominio entre C402 y C624.

La **Figura 4** muestra la estructura y la función del complejo Hhip-Shh. Panel A: Representación mediante dibujos del complejo de Hhip1 $_{\beta 12}$  y Shh (inserto en óvalo). Los tres bucles de Hhip1 $_{\beta 12}$  que están en contacto con Shh se indican como L1-L3. Los cationes Zn $^{2+}$  y Ca $^{2+}$  se muestran con flechas. Sólo se muestra un catión Ca $^{2+}$ . También se muestra una vista girada 90°. Los extremos N-terminal y C-terminal de Shh, así como el extremo C-terminal de Hhip están todos en el mismo lado del complejo, lo que sugiere que ambos componentes podrían estar anclados a la misma membrana celular. El panel B muestra una representación de la superficie de Shh que pone en contacto los tres bucles de Hhip1 $_{\beta 12}$ ; Panel C: mutantes de alanina en bucles de Hhip en contacto con Shh. Los restos mutados a alanina en los tres bucles de Hhip se muestran como esferas, los que han suprimido la unión a Shh se muestran con un asterisco (\*), los que tenían un impacto significativo se muestran con un signo más (+) y los que tenían consecuencias mínimas se muestran con un signo de almohadilla (#). Panel D: Coordinación del catión Zn $^{2+}$  por restos de Shh y Hhip $_{\beta 12}$ . El Zn $^{2+}$  (esfera gris) es coordinado por los restos H140, D147 y H182 de Shh y D383 de Hhip $_{\beta 12}$ . Panel E: La hendidura que contiene Zn $^{2+}$  de Shh y el sitio de unión de Ca $^{2+}$  son diferentes. Shh y Hhip (inserto en cuadrado), con una superficie transparente se muestra para el bucle L2 de Hhip. Los cationes Zn $^{2+}$  y Ca $^{2+}$  se muestran con flechas. Los restos Shh, que en Hh están genéticamente asociados a braquidactilia de tipo A1, se muestran como resaltados y los átomos de carbono están numerados de acuerdo con la secuencia de Shh humana. Panel F: Inhibición de la señalización de Shh en ensayos de cultivo con Gli-luciferasa mediante mutantes de Hhip $_{\beta 12}$ . Los ensayos se llevaron a cabo como en la **Figura 3B**. Los resultados se representan como la media de tres triplicados independientes normalizados al 100 % para no inhibidor  $\pm$  desviación estándar.

La **Figura 5** muestra la presencia de un "bucle L2" en Ptch. Panel A: sitios de unión a Hhip1 y Ptch en Shh con sitio de unión a Ihog en Hh. Representación superficial de Shh y Hh con restos en 4,5 Å de Hhip1 (izquierda) e Ihog (centro) de color gris oscuro. El panel de la derecha representa la superficie de Shh, donde los grupos de restos mutados que afectaban a la actividad de Ptch son de color gris oscuro y los que no de color gris claro; la numeración se refiere a la Shh murina (Fuse *et al.*, 1999; Pepinsky *et al.*, 2000). Las mutaciones de los restos de Shh que tuvieron un impacto insignificante sobre la unión a Ptch y la señalización son de color amarillo. El panel B muestra una secuencia de alineación de Hhip1 y Ptch en la región correspondiente al bucle L2 de Hhip1. La conservación de los restos dentro del bucle L2 se representa a continuación. La gráfica se generó a partir de la alineación de 15 secuencias de Hhip1 de tipo 1 de vertebrados (Fig.11) y las secuencias de Ptch enumeradas; por razones de brevedad sólo se muestra Hhip1 humana. D383 de Hhip1 se eligió arbitrariamente como posición 0. Los restos de especial importancia se indican con un asterisco. La gráfica se creó usando WebLogo, que tiene la dirección URL [weblogo.berkeley.edu](http://weblogo.berkeley.edu). El panel C muestra un ELISA de competición del péptido Hhip1-L2 para la unión de Hhip1 a Shh. Los datos se ajustaron a una ecuación de 4 parámetros de la que se obtuvo la CI $_{50}$ . El panel D muestra un espectro de  $^1\text{H}$ -HSQC de Shh solo (gris) y en presencia de un exceso de péptido Hhip-L2 no marcado (negro). El panel E muestra lo mismo que el panel D excepto que se utilizó el péptido Ptch-L2.

La **Figura 6** muestra el modelo de complejos Shh-receptor que conducen a la regulación de la vía. Cuando la vía de Hh está activa, la Shh unida a la membrana forma un complejo multimérico con Cdon y Ptch que mitiga alivia la inhibición de Smo. Esto conduce a la translocación de la forma activa de Gli al núcleo iniciando la transcripción de los genes diana Hh. La unión de Ptch a Shh probablemente implique la interacción entre el bucle equivalente a L2 de Ptch y la hendidura que contiene Zn $^{2+}$  de Shh.

La **Figura 7** muestra la misma vía que la Figura 6, excepto cuando la señalización de Hh se inhibe por Hhip1, que actúa como un receptor señuelo estructural para Ptch mediante la ocupación de la hendidura que contiene Zn $^{2+}$  de Shh. Hhip1, Cdon y Shh forman un complejo ternario estable dejando que Ptch reprima a Smo e inhiba la señalización. En consecuencia, Gli se procesa en un represor transcripcional por el proteosoma, lo que tiene como resultado la inhibición de la transcripción del gen diana Hh. FN e Ig representan los dominios de fibronectina de tipo III (FNIII) y similar a Ig de Cdon, respectivamente.

La **Figura 8** muestra el ELISA de unión competitiva a Hhip1 $_{\beta 12}$  con Dhh, Ihh y Shh. Panel A: Unión competitiva entre Shh $_{N-cis}$  biotinilada y Dhh, Ihh y Shh no marcadas con Hhip $_{\beta 12}$  inmovilizada en formato ELISA, donde se muestran los ajustes de los datos y la curva para Dhh ( $\circ$ ), Ihh ( $\blacksquare$ ) y Shh ( $\diamond$ ) con valores CI $_{50}$  de 40 nm, 53 nm y 87 nm, respectivamente. Las líneas dibujadas representan el ajuste de los datos para una ecuación de 4 parámetros, de la que se obtuvo la CI $_{50}$ ; Panel B: alineamiento de secuencias de Shh, Dhh e Ihh. Los restos en contacto con Hhip 1 se indican con un asterisco. También se indican los restos que coordinan cationes de Ca $^{2+}$  ( $\blacktriangle$ ) y Zn $^{2+}$  ( $\blacksquare$ ), así como los implicados en la braquidactilia tipo A1 para Ihh ( $\blacklozenge$ ). Los mapas del epítipo 5E1 hasta Ser177 ( $\bullet$ ) de Shh $_{1,2}$  humana y el péptido Shh protegido por 5E1 de la digestión triptica están subrayados. La extensión discontinua indica el supuesto epítipo ampliado basado en la afinidad inferior de 5E1 por Dhh en comparación con Ihh o Shh.

La **Figura 9** muestra la naturaleza de la asociación entre la hélice  $\beta$  y EGF1. Panel A: la asociación entre la hélice  $\beta$  (mostrada como superficie con propiedades electrostáticas, positivas en gris claro y negativas en gris oscuro) y EGF1 (representación en dibujos) en forma de línea y cinta; Panel B: muestra la vista del Panel A girada 90°.

La **Figura 10** muestra la unión de la Hhip1 a Shh $_{N-Cys}$  biotinilada en ausencia y en presencia de EDTA medida por interferometría de bio-capta. Panel A: curvas de unión de un sensograma de cuatro concentraciones diferentes de

la Hhip<sub>β1</sub> (1,2, 1,0, 0,8 y 0,6 μM) en ausencia y en presencia de EDTA 10 mM; Panel B: espectro de <sup>15</sup>N, <sup>1</sup>H-HSQC de Shh solo y en presencia de EDTA 10 mM; Panel C: muestra la Shh humana (gris claro) de la estructura del complejo Hip-Shh superpuesta sobre la de Hh de *Drosophila* (gris oscuro, número de acceso PDB 2IBG, restos 49-196). El catión Zn<sup>2+</sup> sólo está presente en Shh y se muestra como una esfera gris. Para mayor claridad, se

omiten los cationes Ca<sup>2+</sup> de la estructura de Shh. El valor rmsd (raíz de la desviación cuadrática media) de la superposición es de 0,6 Å; Panel D: muestra una vista de cerca de las estructuras de Shh humana y de Hh de *Drosophila* destacando la coordinación de Zn<sup>2+</sup> en Shh. Se muestran los restos en Hh de *Drosophila* equivalentes las posiciones del resto de coordinación del Zn<sup>2+</sup> de Shh. La selección de color es la misma que la del Panel C. La **Figura 11** muestra un alineamiento de las secuencias de Hhip1 correspondientes al bucle L2 que muestras 15 especies de tipo Hhip1 de vertebrados. Se destacan los restos en las dos únicas posiciones que no son idénticas. Debajo de la alineación se muestra una gráfica de conservación, como la descrita en la **Fig. 5B**. La conservación de los restos se ha generado con ConSurf (consurf.tau.ac.il).

La **Figura 12** muestra un parche de superficie conservada en el complejo Hhip-Shh: El panel A muestra una conservación de secuencia de restos en la superficie determinada para Hhip1 (15 secuencias en la Figura 11) y Shh (25 secuencias de Swiss-Prot), ilustrado con un gradiente de color de gris oscuro (restos idénticos) a gris claro (restos conservados menos). Las áreas dentro del óvalo de líneas discontinuas se refieren al parche altamente conservado. El Panel B muestra que el parche de la superficie conservada contiene una región altamente ácida. El potencial electrostático superficial se representa con carga positiva en gris claro y con carga negativa en gris oscuro. Las áreas dentro del óvalo de líneas discontinuas se refieren al parche altamente conservado mostrado en el Panel A. La conservación de restos se generó con ConSurf (consurf.tau.ac.il).

La **Figura 13** muestra que la lhh mutante para la braquidactilia de tipo A1 T154I está afectado tanto en la unión a Ptch1 como en la activación de la señalización de Hh. El panel A muestra que lhh T154I es un competidor más débil que el tipo silvestre unión de Shh a Ptch1. Shh<sub>649</sub> (1 nM) preincubada con las proteínas indicadas se unió a células que expresan Ptch1, se lavó y se analizó por FACS. Se representó el promedio de la media de la intensidad de fluorescencia (MIF) de Shh<sub>649</sub> de dos series de dilución independientes frente a la concentración de inhibidor, donde las barras de error indican las desviaciones estándar. lhh y octil-lhh inhiben de manera similar (valores de CI<sub>50</sub> respectivos de 1,1 y 0,64 nM), mientras que la inhibición por T154I y octil-T154I (valores CI<sub>50</sub> de 140 nM y 10 nM, respectivamente) está afectada. El panel B muestra la activación de la señalización de Hh en ensayos de luciferasa S12 Gli. Los ensayos se llevaron a cabo utilizando proteínas lhh octilada silvestre y T154I. Las unidades de luciferasa relativas (ULR) dependientes de la concentración se representan como la media de cuatro series de dilución independientes ± desviación estándar y se normalizaron para la estimulación WT de lhh máxima en cada placa como 100 %. La curva dibujada representa el ajuste de los datos a una ecuación de 4 parámetros, de la que se obtuvieron los valores CE<sub>50</sub> de 16 y 330 nM para lhh e lhh T154I, respectivamente. Los datos son representativos de tres experimentos independientes.

La **Figura 14** muestra que el anticuerpo monoclonal 5E1 compete con Hhip1<sub>β12</sub> por la unión a Shh. El panel A muestra que el epítipo de 5E1 en Shh se solapa con los sitios de unión de Hhip y Ptch1. La representación superficial de Shh muestra los restos a una distancia de 4,5 Å de Hhip (gris claro) y los restos, donde la mutación altera la actividad de Ptch1 (gris oscuro). El resto crítico para la unión de 5E1, S177 que se muestra marcado con un asterisco (\*), reside en el área de Shh que interactúa tanto con Hhip como con Ptch1. La numeración se refiere a la Shh humana (Fuse, N. *et al.* (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96:10992-10999; Pepinsky R.B. *et al.* (2000) J. Biol. Chem. 275:10995-11001). El panel B muestra la unión competitiva entre la Shh<sub>N-CIS</sub> biotinilada y 5E1 para la Hhip1<sub>β12</sub> inmovilizada mediante ELISA. La curva dibujada representa el ajuste de los datos a una ecuación de 4 parámetros, de la que se obtuvo la CI<sub>50</sub> de 23 nM. El panel C muestra que a altas concentraciones, Hhip1<sub>β12</sub> (520 nM mostrados aquí) y Hhip1<sub>β12</sub>-Fc (datos no mostrados) se unen de forma no específica a las células 293 (barras gris claro), reclutando Shh<sub>649</sub> (15 nM) de una manera independiente de Ptch1. Hhip1<sub>β12</sub> estaba, por lo tanto, presente en un exceso de 35 veces en comparación con Shh<sub>649</sub>. Este reclutamiento tenía competencia por parte de 5E1 520 nM (pero no el control mlgG1), lo que demuestra que 5E1 compete con Hhip1<sub>β12</sub> por la unión a Shh<sub>649</sub>. Las barras negras muestran como comparación la unión a las células Ptch1. Los datos son el promedio de la media de la intensidad de fluorescencia media y las DE de dos experimentos independientes (por duplicado y triplicado) normalizados para la unión de Shh<sub>649</sub> a células Ptch1 en ausencia de otras proteínas ("Ctrl") de la misma manera que la Figura 15J. Shh<sub>649</sub> y Hhip1<sub>β12</sub> están presentes en concentraciones 45 y 10 veces mayores, respectivamente, que en la Figura 15J con el fin de detectar la unión independiente de Ptch1 de Shh<sub>649</sub> a Hhip1<sub>β12</sub>.

La **Figura 15** muestra cómo Hhip y Ptch1 se unen competitivamente a la hendidura del sitio pseudo-activo de Shh. El panel A muestra una representación en dibujos del complejo Hhip-Shh como se muestra en la Fig. 4A. El panel B muestra una representación en dibujos del complejo entre tercer dominio de FNIII de Cdon y Shh (número de acceso PDB 3D1M). Shh está en la misma orientación que en el complejo Hhip-Shh del Panel A. Se muestran los cationes Zn<sup>2+</sup> y Ca<sup>2+</sup>. El panel C muestra la superposición de los sitios de unión para Hhip y Cdon de Shh. Representación superficial de Shh con restos a una distancia de 4,5 Å de Hhip (sombreado en gris) y Cdon (áreas con trama). El área interior punteada más amplia indica los límites de la huella de Cdon, que se superpone a la superficie de unión de Hhip. El Panel D muestra cinco restos de histidina en el sitio pseudo-activo de Shh próximos al bucle L2 de Hhip. Los restos de histidina de Shh se muestran como resaltados con átomos de nitrógeno con sombras oscuras. El bucle L2 de Hhip se muestra en la superficie transparente y se muestra el catión Zn<sup>2+</sup>. La histidina 35 no se muestra puesto que la parte ordenada de la estructura de Shh comienza en L40. El Panel E muestra el espectro de <sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H-HSQC de Shh sola (gris) y en presencia de EDTA 10 mM (negro). Se muestra la región espectral de las cadenas laterales de histidina. El Panel F muestra lo mismo que en el

Panel E, excepto en la presencia de péptido L2 de Hhip 2 mM en lugar de EDTA. El Panel G muestra lo mismo que en el panel E excepto en la presencia de péptido de tipo L2 de Ptch1 2 mM en lugar de EDTA. El Panel H muestra cómo el péptido L2 de Hhip desplaza el péptido de tipo L2 de Ptch1 de Shh, lo que indica que compiten por Shh (se añadió péptido L2 de Hhip 2 mM a una muestra que contiene Shh y péptido de tipo L2 de Ptch1 2 mM (negro) dando como resultado el desplazamiento del péptido de tipo L2 de Ptch1 de Shh, como se muestra por la aparición de otro espectro (comparar Panel G con el Panel H que muestra la presencia de nuevas manchas), que es indicativo de la unión del péptido L2 de Hhip a Shh. El Panel I muestra que Hhip y Ptch1 compiten por la unión de Shh. Después de la preincubación de Shh<sub>649</sub> 1 nM con varias proteínas, se incubaron las células que expresan Ptch1, se lavaron y se analizaron por FACS. Se representó la media de la intensidad de fluorescencia (MFI) de Shh<sub>649</sub> de dos series de dilución independientes frente a la concentración de proteína, indicando las barras de error las desviaciones estándar. Ctrl se refiere a la proteína  $\beta$  de HGF etiquetada con His-6. El Panel J muestra que la competición de Hhip por la unión de Shh a Ptch1 es específica. Se preincubó Shh<sub>649</sub> (0,33 nM) con 56 nM (exceso de 170 veces) de proteínas de tipo silvestre Hhip $\beta_{12}$  o mutantes para L2, 5E1 o controles, a continuación se unió a células Ptch1 (negro) o células 293 (gris), se lavó y se analizó por FACS. La unión de Shh<sub>649</sub> a células Ptch1 en ausencia de inhibidores se normalizó al 100 % y los datos se expresaron como un porcentaje de esta señal (promedio de dos duplicados independientes con desviaciones estándar). Ctrl y CtrlFc se refieren al control HGF  $\beta$  y al control del isotipo de IgG1 trastuzumab, respectivamente. Los datos son representativos de al menos tres experimentos independientes.

## 20 Descripción detallada de la invención

### I. Definiciones

Los términos “Hhip1”, “Hhip” y “Hip” se pueden utilizar indistintamente en la presente memoria.

Las expresiones “polipéptidos Hhip1 $\beta_{12}$ ” y “derivados de Hhip1 $\beta_{12}$ ” o Hip $\beta_{12}$  se refieren a varios polipéptidos, derivados de Hhip1 $\beta_{12}$  de longitud completa (SEC ID N°: 83) que carece del supuesto dominio Frizzled de Hhip1. El término abarca fragmentos específicamente definidos en la presente memoria por las SEC ID N° y por designaciones como Hhip1 $\beta_{12}$ DEC (SEC ID N°: 12), Hip $\beta_1$  (SEC ID N°: 13) y Hip $\beta$  (SEC ID N°: 14), por ejemplo. Además, cuando el término aparece con aminoácidos específicos (por ejemplo, Hhip1 14-67) esto se refiere a los aminoácidos designados específicamente con referencia al polipéptido Hhip1 de longitud completa (SEC ID N°: 2). Los polipéptidos Hhip1 $\beta_{12}$  descritos en la presente memoria pueden ser aislados de varias fuentes, tales como tipos de tejido humano o de otra fuente, o prepararse mediante métodos recombinantes o sintéticos. La expresión “polipéptido Hhip1 $\beta_{12}$ ” se refiere a cada polipéptido Hhip1 $\beta_{12}$ /número individual divulgado en la presente memoria. Todas las divulgaciones de esta descripción que se refieren a “derivados del polipéptido Hhip1 $\beta_{12}$ ” se refieren a cada uno de los polipéptidos individualmente, así como de manera conjunta. Por ejemplo, las descripciones de la preparación de, purificación de, derivación de, formación de anticuerpos para o contra, la formación de oligopéptidos de unión a Hhip1 $\beta_{12}$  o para o contra la formación de moléculas orgánicas de unión a Hhip1 $\beta_{12}$  o contra la administración de composiciones que contienen, el tratamiento de una enfermedad con, etc., pertenecen a cada polipéptido de la invención individualmente. El término “variantes del polipéptido Hhip1 $\beta_{12}$ ” se refiere a variantes del polipéptido Hhip1 $\beta_{12}$  y derivados divulgados en la presente memoria. La secuencia del polipéptido Hhip1 de longitud completa se proporciona en la SEC ID N°: 2. La secuencia del polipéptido Hhip1 $\beta_{12}$  de longitud completa se proporciona como SEC ID N°: 83.

Un “polipéptido Hhip1 de secuencia nativa” comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido Hhip1 correspondiente derivado de la naturaleza. Tales polipéptidos Hhip1 de secuencia nativa se pueden aislar de la naturaleza o pueden producirse por medios recombinantes o sintéticos. El término “polipéptido Hhip1 de secuencia nativa” abarca específicamente las formas de origen natural truncadas o secretadas del polipéptido Hhip1 específico (por ejemplo, una secuencia de dominio extracelular), las formas variantes de origen natural (por ejemplo, las formas alternativas de corte y empalme) y las variantes alélicas de origen natural del polipéptido.

El “dominio extracelular” o “DEC” del polipéptido Hhip1 se refiere a una forma del polipéptido Hhip1 que está esencialmente libre de la supuesta secuencia señal GPI que se elimina cuando el polipéptido se ancla a través de un enlace GPI (abreviado en la presente memoria como “Hhip1<sub>DEC</sub>”). Se entenderá que cualquier supuesta secuencia señal GPI identificada para los polipéptidos Hhip1 de la presente invención se identifica siguiendo los criterios empleados rutinariamente en la técnica para identificar ese tipo de dominio. Los límites exactos de una secuencia señal GPI pueden variar, pero más probablemente en no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquier extremo del dominio tal como se identificó inicialmente en la presente memoria. En un ejemplo específico, Hhip1<sub>DEC</sub> tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 11. Opcionalmente, por lo tanto, un dominio extracelular de un polipéptido Hhip1 puede contener desde aproximadamente 5 o menos aminoácidos a ambos lados del dominio/límite del dominio extracelular de la supuesta secuencia señal GPI tal como se identifica en los Ejemplos o en la memoria y dichos polipéptidos, con o sin el péptido señal asociado y el ácido nucleico que los codifica, se contemplan en la presente invención. Del mismo modo, Hhip1 $\beta_{12}$ DEC se refiere al polipéptido Hhip1 $\beta_{12}$  esencialmente libre de la supuesta secuencia señal GPI (en adelante abreviado como “Hhip1 $\beta_{12}$ DEC”).

La localización aproximada de los “péptidos señal”, “secuencia de señal” o “secuencia líder”, usado como sinónimos en la presente memoria, de los diversos polipéptidos Hhip1 divulgados en la presente memoria se puede mostrar en la presente memoria y/o las figuras adjuntas. Hay que señalar, sin embargo, que el límite C-terminal de un péptido señal puede variar, pero lo más probablemente en no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquier lado del límite C-terminal del péptido señal como inicialmente se identificó en la presente memoria, en el que el límite C-terminal del péptido señal puede identificarse siguiendo los criterios empleados rutinariamente en la técnica para identificar ese tipo de elemento de secuencia de aminoácidos (por ejemplo, Nielsen *et al.*, Prot. Eng.10:1-6 (1997) y von Heinje *et al.*, Nucl. Acids. Res. 14:4683-4690 (1986)). Por otra parte, también se reconoce que, en algunos casos, la escisión de una secuencia señal de un polipéptido secretado no es completamente uniforme, dando lugar a más de una especie secretada. Estos polipéptidos maduros, donde el péptido señal se escinde dentro de no más de aproximadamente 5 aminoácidos a cualquier lado del límite C-terminal del péptido señal como se identifica en la presente memoria, y los polinucleótidos que los codifican, están contemplados en la presente invención.

“Variante del polipéptido Hhip1<sub>β12</sub>” significa un polipéptido Hhip1<sub>β12</sub>, preferiblemente un polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> activo, como se define en la presente memoria que tiene al menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con un polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> de secuencia nativa de longitud completa como se divulga en la presente memoria, un dominio extracelular de un polipéptido Hhip1<sub>β12</sub>, o cualquier otro fragmento de una secuencia de polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> de longitud completa como se divulga en la presente memoria (tales como las codificadas por un ácido nucleico que representa sólo una parte de la secuencia codificante completa de un polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> de longitud completa). Tales variantes de polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> incluyen, por ejemplo, polipéptidos Hhip1<sub>β12</sub> en los que se añaden o se eliminan uno o más restos de aminoácidos en el extremo N-terminal o C-terminal de la secuencia de aminoácidos nativa de longitud completa. Generalmente, una variante de polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> tendrá al menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos, alternativamente al menos aproximadamente 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos, con una secuencia de polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> de secuencia nativa de longitud completa como se divulga en la presente memoria, un dominio extracelular de un polipéptido Hhip1<sub>β12</sub>, como se divulga en la presente memoria o cualquier otro fragmento específicamente definido de una secuencia de polipéptido Hhip1 de longitud completa tal como se describe en la presente memoria. Generalmente, las variantes de polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> son de al menos aproximadamente 10 aminoácidos de longitud, alternativamente al menos aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600 aminoácidos de longitud, o más. Opcionalmente, las variantes de polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> no tendrán más de una sustitución de aminoácido conservadora en comparación con la secuencia del polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> nativa, alternativamente no más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 sustituciones de aminoácidos conservadoras en comparación con la secuencia del polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> nativa.

“Porcentaje (%) de identidad en la secuencia de aminoácidos” con respecto a las secuencias del polipéptido Hhip1 identificadas en la presente memoria se define como el porcentaje de restos de aminoácidos de una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos de la secuencia del polipéptido Hhip1 específica, después de alinear las secuencias y de introducir huecos, si es necesario, para lograr el máximo de porcentaje de identidad de la secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de la secuencia. La alineación con fines de determinar el porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos puede conseguirse de diversas maneras que están dentro de la experiencia en la técnica, por ejemplo, utilizando un software informático disponible públicamente, tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir el máximo alineamiento sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Para fines de la presente memoria, sin embargo, los valores de porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos se generan utilizando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue creado por Genentech, Inc. y el código fuente se describe en la Patente US-7.361.732 y se ha presentado con la documentación de usuario en la Oficina de Derechos de Autor de los EE.UU., Washington DC, 20559, donde se encuentra registrado bajo el Número de Registro de Derechos de autor de los EE.UU. TXU510087. El programa ALIGN-2 está disponible públicamente a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California, o puede compilarse a partir del código fuente proporcionado en la Patente US-7.361.732. El programa ALIGN-2 debería compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, preferiblemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias están establecidos en el programa ALIGN-2 y no varían.

En situaciones donde se utiliza ALIGN-2 para las comparaciones de secuencias de aminoácidos, el porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A, con, o frente a una secuencia de aminoácidos dada B (que alternativamente puede expresarse como una secuencia de aminoácidos dada A que tiene o comprende un determinado porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos con, o frente a una secuencia de aminoácidos dada B) se calcula como sigue:

100 veces la fracción X/Y

donde X es el número de restos de aminoácidos identificados como coincidencias idénticas por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en esa alineación del programa de A y B y donde Y es el número total de restos de aminoácidos en B. Se apreciará que, cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos entre A y B no será igual al porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos entre B y A. Como ejemplos de cálculos de identidad de la secuencia de aminoácidos utilizando este método, las Tablas 2 y 3 demuestran cómo calcular el porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos denominada "proteína de comparación" con la secuencia de aminoácidos denominada "Hhip1<sub>β12</sub>", en la que "Hhip1<sub>β12</sub>" representa la secuencia de aminoácidos de un hipotético polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> de interés, "proteína de comparación" representa la secuencia de aminoácidos de un polipéptido con el que se está comparando el polipéptido "Hhip1<sub>β12</sub>" de interés y "X", "Y" y "Z" representan cada uno diferentes restos de aminoácidos hipotéticos. Salvo que se indique específicamente lo contrario, todos los valores de porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos utilizados en la presente memoria se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente anterior utilizando el programa informático ALIGN-2.

"Polinucleótido variante Hhip1<sub>β12</sub>" o "secuencia de ácido nucleico variante Hhip1<sub>β12</sub>" significa una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido Hhip1<sub>β12</sub>, preferiblemente un polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> activo, tal como se define en la presente memoria y que tiene al menos una identidad de secuencia de ácido nucleico de aproximadamente el 80 % con una secuencia de nucleótidos que codifica para una secuencia de polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> de longitud completa como se divulga en la presente memoria, un dominio extracelular de un polipéptido Hhip1<sub>β12</sub>, o cualquier otro fragmento de una secuencia del polipéptido Hhip1 de longitud completa como se divulga en la presente memoria (tales como las codificadas por un ácido nucleico que representa sólo una parte de la secuencia codificante completa para un polipéptido Hhip1 de longitud completa). Generalmente, un polinucleótido variante Hhip1<sub>β12</sub> tendrá al menos aproximadamente 80 % de identidad de secuencia de ácido nucleico, alternativamente al menos aproximadamente 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad de secuencia de ácido nucleico con una secuencia de ácido nucleico que codifica para una secuencia de polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> de longitud completa como se divulga en la presente memoria, un dominio extracelular de un polipéptido Hhip1<sub>β12</sub>, o cualquier otro fragmento de una secuencia de polipéptido Hhip1 de longitud completa tal como se divulga en la presente memoria. Tales variantes abarcan variantes Hhip1<sub>β12</sub>. Las variantes no abarcan la secuencia de nucleótidos nativa.

Generalmente, los polinucleótidos variantes Hhip1<sub>β12</sub> son al menos aproximadamente de 5 nucleótidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990 o 1000 nucleótidos de longitud, en el que en este contexto, el término "aproximadamente" significa la longitud de la secuencia de nucleótidos de referencia más o menos 10 % de esa longitud de referencia.

"Porcentaje (%) de identidad de secuencia de ácido nucleico" con respecto a secuencias de ácido nucleico que codifican para Hhip1<sub>β12</sub> identificadas en la presente memoria se define como el porcentaje de nucleótidos de una secuencia candidata que son idénticos con los nucleótidos de la secuencia de ácido nucleico de Hhip1<sub>β12</sub> de interés, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de la secuencia. La alineación con fines de determinar el porcentaje de identidad de la secuencia de ácido nucleico puede conseguirse de diversas maneras que están dentro de la experiencia en la técnica, por ejemplo, utilizando software informático disponible públicamente, tales como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Para fines de la presente memoria, sin embargo, los valores del porcentaje de identidad de la secuencia de ácido nucleico se generan usando la secuencia de programa informático de comparación ALIGN-2, en el que el código fuente completo del programa ALIGN-2 es como el descrito anteriormente.

En situaciones donde se utiliza ALIGN-2 para las comparaciones de secuencias de ácido nucleico, el porcentaje de identidad de la secuencia de ácido nucleico de una secuencia de ácido nucleico dada C, con, o frente a una secuencia de ácido nucleico dada D (que alternativamente puede expresarse como una secuencia de ácido nucleico dada C que tiene o comprende un determinado porcentaje de identidad de la secuencia de ácido nucleico con, o frente a una secuencia de ácido nucleico dada D) se calcula como sigue:

$$100 \text{ veces la fracción } X/Y$$

donde W es el número de nucleótidos identificados como coincidencias idénticas por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en esa alineación del programa de C y D y donde Z es el número total de restos de nucleótidos en D. Se apreciará que, cuando la longitud de la secuencia de ácido nucleico C no es igual a la longitud de la secuencia de ácido nucleico D, el porcentaje de identidad de la secuencia de ácido nucleico entre C y D no será igual al porcentaje de identidad de la secuencia de ácido nucleico entre D y C. Como ejemplos de cálculos del porcentaje de identidad de la secuencia de ácido nucleico, las Tablas 3 y 4 muestran cómo calcular el porcentaje de

- identidad de la secuencia de ácido nucleico de la secuencia de ácido nucleico denominada “ADN de comparación” con la secuencia de ácido nucleico denominada “ADN de Hhip1<sub>β12</sub>”, en la que “ADN de Hhip1<sub>β12</sub>” representa una secuencia hipotética de ácido nucleico que codifica para Hip de interés, “ADN de comparación” representa la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácido nucleico con la que se está comparando la molécula de ácido nucleico “ADN de Hhip1<sub>β12</sub>” de interés y “N”, “L” y “V” representan cada uno diferentes nucleótidos hipotéticos. Salvo que se indique específicamente lo contrario, todos los valores de porcentaje de identidad de la secuencia de ácido nucleico utilizados en la presente memoria se obtienen como se describe en el párrafo inmediatamente anterior utilizando el programa informático ALIGN-2.
- En otras realizaciones, los polinucleótidos variantes Hhip1<sub>β12</sub> son moléculas de ácido nucleico que codifican para un polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> y que son capaces de hibridarse, preferiblemente en condiciones rigurosas de hibridación y lavado, con secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido Hhip1 de longitud completa como se divulga en la presente memoria. Los polipéptidos variantes Hhip1<sub>β12</sub> pueden ser aquellos que son codificados por un polinucleótido variante Hhip1<sub>β12</sub>.
- El término “región codificante de longitud completa” cuando se utiliza en referencia a un ácido nucleico que codifica para un polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> se refiere a la secuencia de nucleótidos que codifica para el polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> de longitud completa de la invención (que a menudo se muestra entre los codones de inicio parada, inclusive mismos, en las figuras adjuntas).
- “Aislado”, cuando se utiliza para describir los diversos polipéptidos divulgados en la presente memoria, significa polipéptido que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que generalmente interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos del polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, se purificará el polipéptido (1) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de la secuencia N-terminal o de la secuencia de aminoácidos interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria, o (2) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción de plata. El polipéptido aislado incluye polipéptido *in situ* dentro de las células recombinantes, ya que al menos un componente del entorno natural del polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> no estará presente. Generalmente, sin embargo, el polipéptido aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.
- Un ácido nucleico que codifica para el polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> u otro ácido nucleico que codifica el polipéptido “aislado” es una molécula de ácido nucleico que se identifica y separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante a la que está asociada normalmente en el medio natural del ácido nucleico que codifica para el polipéptido. Una molécula de ácido nucleico que codifica para el polipéptido aislado es distinta de la forma o configuración en la que se encuentra en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico que codifican para el polipéptido aislado se distinguen de la molécula de ácido nucleico que codifica para el polipéptido específico, tal como existe en las células naturales. Sin embargo, una molécula de ácido nucleico que codifica para el polipéptido aislado incluye moléculas de ácido nucleico que codifican para el polipéptido contenidas en células que expresan normalmente el polipéptido cuando, por ejemplo, la molécula de ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente a la de las células naturales.
- El término “secuencias de control” se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo hospedador particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariontes, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora y un sitio de unión al ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.
- El ácido nucleico está “unido operativamente” cuando está situado en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o líder secretor está unido operativamente al ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está unido operativamente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está unido operativamente a una secuencia codificante si está situado de manera que facilita la traducción. Generalmente, “unido operativamente” significa que las secuencias de ADN que están unidas son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. La unión se consigue mediante ligación en sitios de restricción convenientes. Si no existen tales sitios, los adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos se utilizan de acuerdo con la práctica convencional.
- La “rigurosidad” de las reacciones de hibridación es fácilmente determinable por alguien con experiencia ordinaria en la técnica, y generalmente es un cálculo empírico dependiente de la longitud de la sonda, temperatura de lavado y concentración de sal. En general, las sondas más largas requieren temperaturas más elevadas para una hibridación apropiada, mientras que las sondas más cortas necesitan temperaturas más bajas. La hibridación depende generalmente de la capacidad del ADN desnaturalizado para rehibridarse cuando las cadenas complementarias están presentes en un entorno por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor sea el grado de homología

deseada entre la sonda y la secuencia hibridable, mayor será la temperatura relativa que puede usarse. Como resultado, se deduce que temperaturas relativas más altas tenderían a hacer las condiciones de reacción más rigurosas, mientras que temperaturas más bajas las harían menos rigurosas. Para detalles adicionales y explicación de la rigurosidad de las reacciones de hibridación, véase Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

“Condiciones rigurosas” o “condiciones de alta rigurosidad”, como se define en la presente memoria, pueden identificarse por aquellas que: (1) emplean baja fuerza iónica y alta temperatura para el lavado, por ejemplo cloruro sódico 0,015 M/citrato sódico 0,0015 M/dodecil sulfato sódico 0,1 % a 50 °C; (2) emplean durante la hibridación un agente desnaturizante, tal como formamida, por ejemplo, formamida 50 % (v/v) con seroalbúmina bovina 0,1 %/Ficoll 0,1 %/polivinilpirrolidona 0,1 %/tampón fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42 °C; o (3) hibridación durante la noche en una solución que emplea formamida 50 %, 5 x SSC (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico 0,1 %, 5 x solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonicated (50 µg/ml), SDS 0,1 % y dextransulfato 10 % a 42 °C, con un lavado de 10 minutos a 42 °C en 0,2 x SSC (cloruro sódico/citrato sódico) seguido de un lavado de alta rigurosidad de 10 minutos consistente en 0,1 x SSC que contiene EDTA a 55 °C.

Las “condiciones moderadamente rigurosas” pueden identificarse como se describe por Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen el uso de solución de lavado y condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica y % de SDS) menos rigurosas que las descritas anteriormente. Un ejemplo de condiciones moderadamente rigurosas es la incubación durante la noche a 37 °C en una solución que comprende: formamida 20 %, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), 5 x solución de Denhardt, sulfato de dextrano 10 % y ADN desnaturizado de esperma de salmón, seguido de lavado de los filtros en 1 x SSC a aproximadamente 37 a 50 °C. El experto en la materia sabrá cómo ajustar la temperatura, fuerza iónica, etc. según sea necesario para acomodar factores tales como longitud de la sonda y similares.

El término “epítipo etiquetado” cuando se utiliza en la presente memoria, se refiere a un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> o anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> fusionado con un “polipéptido etiqueta”. El polipéptido etiqueta tiene suficientes restos como para proporcionar un epítipo contra el que se puede producir un anticuerpo, sin embargo, es lo suficientemente corto como para que no interfiera con la actividad del polipéptido al que se fusiona. El polipéptido etiqueta también es preferiblemente lo suficientemente único como para que el anticuerpo sustancialmente no reaccione de forma cruzada con otros epítipos. Los polipéptidos etiqueta adecuados tienen generalmente al menos seis restos de aminoácidos y habitualmente entre aproximadamente 8 y 50 restos de aminoácidos (preferiblemente, entre aproximadamente 10 y 20 restos de aminoácidos).

“Activo” o “actividad” para los propósitos de la presente memoria se refiere a la forma(s) de un polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> que retiene una actividad biológica y/o inmunológica del Hhip1 nativo o de origen natural, en el que la actividad “biológica” se refiere a una función biológica de un Hhip1 nativo o de origen natural distinta de la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico poseído por un Hhip1 nativo o de origen natural y una actividad “inmunológica” se refiere a la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo contra un epítipo antigénico poseído por un Hhip nativo o de origen natural.

El término “antagonista” se utiliza en el sentido más amplio, e incluye cualquier molécula que parcial o totalmente bloquea, inhibe o neutraliza una actividad biológica de un polipéptido nativo Hhip1 divulgado en la presente memoria. De una manera similar, el término “agonista” se utiliza en el sentido más amplio e incluye cualquier molécula que imita una actividad biológica de un polipéptido nativo divulgado en la presente memoria. Moléculas agonistas o antagonistas adecuadas incluyen específicamente anticuerpos agonistas o antagonistas o fragmentos de anticuerpos, fragmentos o variantes de la secuencia de aminoácidos de polipéptidos Hhip1 nativos, péptidos, oligonucleótidos antisentido, moléculas orgánicas pequeñas, etc. Los métodos para identificar agonistas o antagonistas de un polipéptido Hhip1 1 pueden comprender poner en contacto un polipéptido Hhip 1 con una molécula agonista o antagonista adecuada y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas normalmente asociadas al polipéptido Hhip1.

“Tratar” o “tratamiento” o “alivio” se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en el que el objeto es prevenir o ralentizar (reducir) el estado o trastorno patológico objetivo. Los que están que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya tienen el trastorno, así como aquellos propensos a tener el trastorno o aquellos en los que el trastorno debe prevenirse. Un sujeto o mamífero es “tratado” con éxito de un cáncer, por ejemplo, si, después de recibir una cantidad terapéutica de un oligopéptido Hhip1<sub>β12</sub> o inmunoadhesina Hhip1<sub>β12</sub>, el paciente muestra una reducción observable y/o medible o ausencia de uno o más de los siguientes: reducción en el número de células cancerosas o ausencia de células cancerosas; reducción en el tamaño del tumor; inhibición (es decir, ralentizar en cierto grado y preferiblemente detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos incluyendo la extensión del cáncer en el tejido blando y el hueso; inhibición (es decir, ralentizar en cierto grado y preferiblemente detener) la metástasis tumoral; inhibición, en cierta medida, del crecimiento del tumor; inhibición de la señalización de Hedgehog y/o alivio hasta cierto punto, de uno o más de los síntomas asociados al cáncer específico; reducción de la morbilidad y la mortalidad y la mejora en la calidad de vida. En la

medida en la que el anticuerpo-anti-Hhip1<sub>β</sub>12 o el oligopéptido Hhip1<sub>β</sub>12 puede prevenir el crecimiento y/o destrucción de las células cancerosas existentes, este puede ser citostático y/o citotóxico. La reducción de estos signos o síntomas también puede ser sentida por el paciente.

5 Los parámetros anteriores para evaluar el éxito del tratamiento y la mejoría de la enfermedad son fácilmente medibles mediante los procedimientos de rutina familiares para un médico. Para la terapia del cáncer, la eficacia se puede medir, por ejemplo, mediante la evaluación del tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TPE) y/o la determinación de la tasa de respuesta (TR). Las metástasis se pueden determinar mediante pruebas de estadificación y por gammagrafía ósea y pruebas para medir la concentración de calcio y otras enzimas para  
10 determinar la diseminación al hueso. También se pueden realizar tomografías computarizadas para buscar metástasis en la pelvis y los ganglios locales. Las radiografías de tórax y la medición de los niveles de enzimas hepáticas mediante métodos conocidos se utilizan para buscar metástasis en los pulmones y el hígado, respectivamente. Otros métodos de rutina para el control de la enfermedad incluyen la ecografía transrectal (ETR) y la biopsia transrectal con aguja (BTRA).

15 Para el cáncer de la vejiga, que es un cáncer más localizado, los métodos para determinar el progreso de la enfermedad incluyen la evaluación citológica urinaria mediante cistoscopia, la vigilancia para detectar la presencia de sangre en la orina, la visualización del tracto urotelial mediante ecografía o una pielografía intravenosa, la tomografía computarizada (TC) y la resonancia magnética (RM). La presencia de metástasis a distancia puede ser  
20 evaluada por TC del abdomen, radiografías de tórax o estudios de imagen con radionúclidos del esqueleto.

La administración "crónica" se refiere a la administración del agente(s) en un modo continuo en oposición a un modo agudo, para mantener el efecto terapéutico inicial (actividad) durante un período prolongado de tiempo. La administración "intermitente" es el tratamiento que no se realiza consecutivamente sin interrupción, sino que es de  
25 naturaleza cíclica.

"Mamífero" para los fines del tratamiento de, aliviar los síntomas de o el diagnóstico de un cáncer se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, animales para deporte o animales de compañía, tales como perros, gatos, ganado, caballos,  
30 ovejas, cerdos, cabras, conejos, etc. Preferiblemente, el mamífero es humano.

La administración "en combinación con" uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

35 "Vehículos" como se usa en la presente memoria incluyen vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos para la célula o el mamífero expuesto a los mismos a las dosis y concentraciones empleadas. A menudo, el vehículo fisiológicamente aceptable es una solución acuosa con pH tamponado. Ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo el ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10  
40 restos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio y/o tensoactivos no iónicos tales como TWEEN<sup>®</sup>, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS<sup>®</sup>.

45 Por "fase sólida" o "soporte sólido" se entiende una matriz no acuosa a la cual se puede adherir o unir un anticuerpo, oligopéptido Hhip1<sub>β</sub>12 o molécula orgánica que imita el L2 de Hhip1<sub>β</sub>12 de la presente invención. Ejemplos de fases sólidas abarcadas en la presente memoria incluyen las formadas parcial o totalmente por vidrio (por ejemplo, vidrio de poro controlado), polisacáridos (por ejemplo, agarosa), poliácridamidas, poliestireno, alcohol polivinílico y siliconas. En ciertas realizaciones, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una  
50 placa de ensayo; en otras es una columna de purificación (por ejemplo, una columna de cromatografía de afinidad). Este término también incluye una fase sólida discontinua de partículas discretas, tal como la descrita en la Patente US-4.275.149.

55 Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta de varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensoactivo que es útil para la administración de un fármaco (tal como un polipéptido Hhip1<sub>β</sub>12, un anticuerpo contra el mismo o un oligopéptido Hhip1<sub>β</sub>12 a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen comúnmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de los lípidos de las membranas biológicas

60 Una molécula "pequeña" o molécula orgánica "pequeña" se define en la presente memoria como aquella que tiene un peso molecular inferior a aproximadamente 500 dalton.

Una "cantidad eficaz" de un polipéptido, anticuerpo, oligopéptido Hhip1<sub>β</sub>12, molécula orgánica que imita a Hip o un agonista o antagonista del mismo como se divulga en la presente memoria es una cantidad suficiente para llevar a  
65 cabo un propósito específicamente indicado. Una "cantidad eficaz" puede determinarse empíricamente y de una manera rutinaria, en relación con el propósito indicado.

El término “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad de un anticuerpo, polipéptido, oligopéptido Hhip1<sub>β12</sub>, molécula orgánica que imita a L2 de Hhip1<sub>β12</sub> u otro fármaco eficaz para “tratar” una enfermedad o trastorno en un sujeto o mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar en cierto grado y preferiblemente detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar en cierto grado y preferiblemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, en cierta medida, el crecimiento del tumor; inhibir la señalización de Hedgehog y/o aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados al cáncer. Véase la definición en la presente memoria de “tratar”. En la medida en la que el fármaco puede prevenir el crecimiento y/o destruir las células cancerosas existentes, este puede ser citostático y/o citotóxico.

Una “cantidad inhibidora del crecimiento” de un anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub>, polipéptido Hhip1<sub>β12</sub>, oligopéptido Hhip1<sub>β12</sub> o molécula orgánica que imita al L2 de Hhip1<sub>β12</sub> es una cantidad capaz de inhibir el crecimiento de una célula, especialmente de un tumor, por ejemplo, de células cancerosas, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Una “cantidad inhibidora del crecimiento” de un anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub>, polipéptido Hhip1, oligopéptido de unión a Hhip1 o molécula orgánica de unión a Hhip1 para los propósitos de inhibir el crecimiento celular neoplásico puede determinarse empíricamente y de una manera rutinaria.

Una “cantidad citotóxica” de un anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub>, polipéptido Hhip1<sub>β12</sub>, oligopéptido Hhip1<sub>β12</sub> o molécula orgánica que imita a L2 de Hhip1<sub>β12</sub> es una cantidad capaz de causar la destrucción de una célula, especialmente de un tumor, por ejemplo, de células cancerosas, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Una “cantidad citotóxica” de un anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub>, polipéptido Hhip1<sub>β12</sub>, oligopéptido Hhip1<sub>β12</sub> o molécula orgánica que imita a L2 de Hhip1<sub>β12</sub> para los propósitos de inhibir el crecimiento celular neoplásico puede determinarse empíricamente y de una manera rutinaria.

El término “anticuerpo” se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente, por ejemplo, anticuerpos monoclonales anti-Hhip1<sub>β12</sub> individuales (incluyendo anticuerpos agonistas, antagonistas y neutralizantes), composiciones de anticuerpos anti-Hhip1<sub>β12</sub> con especificidad poliepitópica, anticuerpos policlonales, anticuerpos anti-Hhip1<sub>β12</sub> de cadena sencilla y fragmentos de anticuerpos anti-Hhip1<sub>β12</sub> (véase a continuación), siempre y cuando muestren la actividad biológica o inmunológica deseada. El término “inmunoglobulina” (Ig) se utiliza en la presente memoria indistintamente con el término anticuerpo.

Un “anticuerpo aislado” es uno que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas, y otros solutos proteicos o no proteicos. En realizaciones preferidas, el anticuerpo se purificará (1) hasta más del 95 % en peso de anticuerpo según se determina por el método de Lowry y más preferiblemente más de 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de la secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de copa giratoria o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras utilizando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción de plata. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* dentro de las células recombinantes ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Generalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

La unidad básica de un anticuerpo de 4 cadenas es una glicoproteína heterotetramérica compuesta de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas (un anticuerpo IgM consiste en 5 de las unidades básicas de heterotetrámero junto con un polipéptido adicional denominado cadena J, y por lo tanto, contiene 10 sitios de unión a antígeno, mientras que los anticuerpos IgA secretados pueden polimerizar para formar ensamblajes polivalentes que comprenden 2-5 de las unidades básicas de 4 cadenas junto con la cadena J). En el caso de las IgG, la unidad de 4 cadenas es generalmente de aproximadamente 150.000 dalton. Cada cadena L está unida a una cadena H mediante un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H están unidas entre sí por uno o más enlaces disulfuro dependiendo del isotipo de la cadena H. Cada cadena H y L también tienen puentes disulfuro intracatenarios regularmente espaciados. Cada cadena H tiene en el extremo N-terminal, un dominio variable (VH) seguido de tres dominios constantes (CH) para cada una de las cadenas α y γ y cuatro dominios CH para los isotipos μ y ε. Cada cadena L tiene en el extremo N-terminal, un dominio variable (VL) seguido de un dominio constante (CL) en su otro extremo. El VL está alineado con el VH y el CL está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada (CH1). Se cree que una serie de restos de aminoácidos particulares forman una interfaz entre los dominios variables de la cadena ligera y la cadena pesada. El emparejamiento de un VH y VL juntos forma un único sitio de unión al antígeno. Para la estructura y las propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, véase, por ejemplo, Basic and Clinical Immunology, 8ª edición, Daniel P. Stites, Abba I. Terr y Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, página 71y el Capítulo 6.

La cadena L de cualquier especie de vertebrado se puede asignar a uno de dos tipos claramente distintos, denominados kappa y lambda, basados en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (CH), las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases o isotipos. Hay cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, que tienen cadenas pesadas designadas α, δ, ε, γ y μ, respectivamente. Las clases γ y α se dividen además en subclases basadas en diferencias relativamente menores en la secuencia de CH y función, por ejemplo,

los seres humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2.

El término "variable" se refiere al hecho de que determinados segmentos de los dominios variables difieren ampliamente en la secuencia entre anticuerpos. El dominio V media en la unión a antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente entre la variedad de los 110 aminoácidos de los dominios variables. En cambio, las regiones V consisten en tramos relativamente invariantes denominados regiones marco (FR) de 15-30 aminoácidos separadas por regiones más cortas de extrema variabilidad denominadas "regiones hipervariables" que tienen cada una de 9 a 12 aminoácidos de longitud. Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro FR, que en gran medida adoptan una configuración de lámina  $\beta$ , conectada por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de la lámina  $\beta$ . Las regiones hipervariables de cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (ver Kabat *et al.*, SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA).

El término "región hipervariable" cuando se usa en la presente memoria se refiere a los restos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende generalmente restos de aminoácidos de una "región determinante de complementariedad" o "RDC" (por ejemplo, alrededor de aproximadamente los restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el VL y alrededor de aproximadamente 1-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el VH; Kabat *et al.*, SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) y/o aquellos restos de un "bucle hipervariable" (por ejemplo, los restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el VL y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el VH; Chothia y Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917).

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

Los anticuerpos monoclonales de la presente invención incluyen anticuerpos "quiméricos" en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga a las secuencias correspondientes de anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena(s) es idéntica a u homóloga a las secuencias correspondientes de anticuerpos derivados de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (véase Patente US- 4.816.567 y Morrison *et al.*, (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81:6851 a 6855). Los anticuerpos quiméricos de interés de la presente memoria incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno del dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, monos del viejo mundo, simios superiores etc.) y secuencias de la región constante humanas.

Un anticuerpo "intacto" es aquel que comprende un sitio de unión al antígeno así como un CL y al menos los dominios constantes de cadena pesada, CH1, CH2 y CH3. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (por ejemplo, dominios constantes de secuencia humana nativa) o variante de la secuencia de aminoácidos de la misma. Preferiblemente, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región de unión al antígeno o variable del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y fragmentos Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (véase la Patente US-5.641.870, Ejemplo 2; Zapata *et al.*, (1995) Protein Eng. 8(10): 1057-62); moléculas de anticuerpo de cadena única y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos idénticos fragmentos de unión al antígeno, llamados "Fab" y un fragmento residual "Fc", una designación que refleja la capacidad de cristalizar fácilmente. El fragmento Fab consiste en una cadena L entera junto con el dominio de la región variable de la cadena H (VH) y el primer dominio constante de una cadena pesada (CH1). Cada fragmento Fab es monovalente con respecto a la unión al antígeno, es decir, que tiene un solo sitio de unión al antígeno. El tratamiento con pepsina de un anticuerpo produce un único fragmento grande F(ab')<sub>2</sub> que corresponde aproximadamente a dos fragmentos Fab unidos por disulfuro que tienen actividad de unión a antígeno divalente y aún son capaces de reticulación con el antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por tener unos pocos restos adicionales en el extremo carboxi del dominio CH1 incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en la presente memoria para Fab' en la que el resto(s) cisteína de los dominios constantes lleva un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')<sub>2</sub> se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

El fragmento Fc comprende las porciones carboxi terminales de ambas cadenas H mantenidas juntas por disulfuros. Las funciones efectoras de los anticuerpos se determinan mediante las secuencias en la región Fc, cuya región es también la parte reconocida por receptores Fc (FcR) que se encuentran en determinados tipos de células.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de reconocimiento del antígeno y el sitio de unión. Este fragmento consiste en un dímero de un dominio de la región variable de una cadena pesada y una cadena ligera en estrecha asociación no covalente. Del plegamiento de estos dos dominios surgen seis bucles hipervariables (3 bucles de la cadena H y 3 bucles de la L) que contribuyen a los restos de aminoácidos de unión al antígeno y que confieren al anticuerpo especificidad de unión al antígeno. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende sólo tres RDC específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión.

"Fv monocatenario" también abreviado como "sFv" o "scFv" son fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios de anticuerpo VH y VL conectados en una única cadena polipeptídica. Preferiblemente, el polipéptido sFv comprende además un polipéptido enlazador entre los dominios VH y VL que permite al sFv formar la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de sFv, véase Pluckthun en THE PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, *infra*.

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos preparados mediante la construcción de fragmentos sFv (véase el párrafo anterior) con enlazadores cortos (aproximadamente 5-10 restos) entre los dominios VH y VL de modo que se crea un emparejamiento inter-cadena pero no intra-cadena del dominio V, dando como resultado un fragmento bivalente, es decir, un fragmento que tiene dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos biespecíficos son heterodímeros de dos fragmentos sFv "transversales" en los cuales están presentes los dominios VH y VL de los dos anticuerpos en diferentes cadenas polipeptídicas. Los diacuerpos se describen más completamente en, por ejemplo, los documentos EP 404,097, WO 93/11161 y en Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 90:6444-6448 (1993).

Los anticuerpos anti-idiotípicos son anticuerpos que se unen a la región de unión al antígeno de un anticuerpo objeto. Tales anticuerpos anti-idiotípicos pueden imitar el epítipo que es unido por el anticuerpo objeto. Por ejemplo, un anticuerpo Hhip1<sub>β12</sub> que se une específicamente al bucle L2 de Hhip1, puede simular la porción de Hedgehog que se une a L2. Por lo tanto, un anticuerpo anti-idiotípico producido contra este anticuerpo objeto (y específicamente contra la porción de unión al antígeno puede, por lo tanto, reconocer y unir específicamente Hedgehog de manera que la porción L2 de Hhip1 une Hedgehog.

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

Un "anticuerpo dependiente de la especie", por ejemplo, un anticuerpo anti-IgE humana de mamífero, es un anticuerpo que tiene una afinidad de unión más fuerte por un antígeno de una primera especie de mamífero que la

que tiene por un homólogo de ese antígeno de una segunda especie de mamífero. Normalmente, el anticuerpo dependiente de especie "se une específicamente" a un antígeno humano (es decir, tiene un valor de afinidad de unión (Kd) de no más de aproximadamente  $1 \times 10^{-7}$  M, preferiblemente no más de aproximadamente  $1 \times 10^{-8}$  y lo más preferiblemente no más de aproximadamente  $1 \times 10^{-9}$  M) pero tiene una afinidad de unión por un homólogo del antígeno de una segunda especie de mamífero no humano que es al menos aproximadamente 50 veces, o al menos aproximadamente 500 veces, o al menos aproximadamente 1000 veces, más débil que su afinidad de unión por el antígeno humano. El anticuerpo dependiente de la especie puede ser de cualquiera de los diversos tipos de anticuerpos definidos anteriormente, pero preferiblemente es un anticuerpo humanizado o humano.

Un "oligopéptido Hhip1<sub>β12</sub>" es un oligopéptido que se une, preferiblemente específicamente, a un polipéptido Hedgehog. Los oligopéptidos de unión a Hhip1<sub>β12</sub> se pueden sintetizar químicamente usando metodologías de síntesis de oligopéptidos conocidas o se pueden preparar y purificar utilizando tecnología recombinante. Los oligopéptidos Hhip1<sub>β12</sub> son por lo general al menos aproximadamente de 5 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 aminoácidos de longitud o más, donde dichos oligopéptidos son capaces de unirse, preferiblemente específicamente, a un polipéptido Hedgehog como se divulga en la presente memoria. Algunos oligopéptidos Hhip1<sub>β12</sub> se describen en la presente memoria. Otros oligopéptidos Hhip1<sub>β12</sub> pueden ser identificados sin excesiva experimentación usando técnicas bien conocidas. En este sentido, hay que señalar que las técnicas para el cribado de bibliotecas de oligopéptidos en busca de oligopéptidos que son capaces de unirse específicamente a un polipéptido diana son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Patentes US-5.556.762; US-5.750.373; US-4.708.871; US-4.833.092; US-5.223.409; US-5.403.484; US-5.571.689; US-5.663.143; Publicaciones PCT N.º WO 84/03506 y N.º WO84/03564; Geysen *et al.*, (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002; Geysen *et al.*, (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:178-182 (1985); Geysen *et al.*, en SYNTHETIC PEPTIDES AS ANTIGENS, 130-149 (1986); Geysen *et al.*, (1987) J. Immunol. Meth. 102:259-274; Schoofs *et al.* (1988) J. Immunol. 140:611-616, Cwirla, S. E. *et al.* (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6378; Lowman, H.B. *et al.* (1991) Biochemistry 30:10832; Clackson, T. *et al.* (1991) Nature, 352:624; Marks, J.D. *et al.* (1991) J. Mol. Biol. 222:581; Kang, A.S. *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8363, and Smith, G.P. (1991) Current Opin. Biotechnol. 2:668).

Un "oligopéptido de unión al bucle L2 de Hhip1<sub>β12</sub>" es una forma de un oligopéptido Hhip1<sub>β12</sub> que se une, preferiblemente específicamente, a un polipéptido Hhip1 en la porción de Hhip 1 que interactúa con Hh en la naturaleza (es decir, el bucle L2) y/o a la porción análoga de Ptch. Los oligopéptidos de unión al bucle L2 de Hhip1<sub>β12</sub> pueden sintetizarse químicamente usando metodologías de síntesis de oligopéptidos conocidas o se pueden preparar y purificar utilizando tecnología recombinante. Los oligopéptidos de unión al bucle L2 de Hhip1<sub>β12</sub> son habitualmente al menos aproximadamente de 5 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos aproximadamente de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 aminoácidos de longitud o más, donde dichos oligopéptidos son capaces de unirse, preferiblemente específicamente, a un polipéptido Hhip1 y/o Ptch como se describe en la presente memoria.

Una "molécula orgánica de unión al bucle L2 de Hhip1<sub>β12</sub>" es una molécula orgánica diferente a un oligopéptido o anticuerpo tal como se define en la presente memoria que se une, preferiblemente específicamente, a un motivo del bucle L2 de Hhip1<sub>β12</sub> en una proteína, incluyendo motivos análogos en polipéptidos Ptch y Ptch2 como se describe en la presente memoria. Las moléculas orgánicas de unión al bucle L2 de Hhip1<sub>β12</sub> pueden identificarse y sintetizarse químicamente usando metodología conocida (véase, por ejemplo, las Publicaciones PCT N.º WO 00/00823 y N.º WO 00/39585). Las moléculas orgánicas de unión al bucle L2 de Hhip1<sub>β12</sub> son, por lo general, de al menos de aproximadamente 2000 dalton de tamaño, alternativamente menos de aproximadamente 1500, 750, 500, 250 o 200 dalton de tamaño, en el que dichas moléculas orgánicas capaces de unirse, preferiblemente específicamente, a un polipéptido Hhip1 y o Ptch como se divulga en la presente memoria se pueden identificar sin excesiva experimentación usando técnicas bien conocidas. En este sentido, hay que señalar que las técnicas para cribar bibliotecas de moléculas orgánicas para moléculas que son capaces de unirse a un polipéptido diana son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, las Publicaciones PCT N.º WO 00/00823 y N.º WO 00/39585). Tales moléculas pueden tener un efecto agonista o antagonista en Hhip1 y/o Ptch debido a la similitud estructural de los dominios Hhip1 L2 y Ptch L2.

"Oligopéptido que imita al bucle L2 de Hhip1<sub>β12</sub>" es un péptido que se une, preferiblemente específicamente, a un polipéptido Hh en la porción de Hh que interactúa con Hhip1 en la naturaleza. Los oligopéptidos que imitan al bucle L2 de Hhip1<sub>β12</sub> pueden sintetizarse químicamente usando metodología de síntesis de oligopéptidos conocida o se pueden preparar y purificar utilizando tecnología recombinante. Los oligopéptidos que imitan al bucle L2 de Hhip1<sub>β12</sub> son por lo general al menos aproximadamente de 5 aminoácidos de longitud, alternativamente por lo menos de aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94,

95, 96, 97, 98, 99 o 100 aminoácidos de longitud o más, donde dichos oligopéptidos son capaces de unirse, preferiblemente específicamente, a un polipéptido Hh como se describe en la presente memoria.

Una “molécula orgánica que imita el L2 de Hhip1<sub>β12</sub>” es una molécula orgánica diferente a un oligopéptido o anticuerpo tal como se define en la presente memoria que se une, preferiblemente específicamente, a un polipéptido Hedgehog como se describe en la presente memoria. Las moléculas orgánicas que imitan el L2 de Hhip1<sub>β12</sub> pueden identificarse y sintetizarse químicamente usando metodología conocida (véase, por ejemplo, las Publicaciones PCT N.º WO 00/00823 y N.º WO 00/39585). Las moléculas orgánicas que imitan el L2 de Hhip1<sub>β12</sub> son, por lo general, de al menos de aproximadamente 2000 dalton de tamaño, alternativamente menos de aproximadamente 1500, 750, 500, 250 o 200 dalton de tamaño, en el que dichas moléculas orgánicas capaces de unirse, preferiblemente específicamente, a un polipéptido Hedgehog como se describe en la presente memoria se pueden identificar sin excesiva experimentación usando técnicas bien conocidas. En este sentido, hay que señalar que las técnicas para cribar bibliotecas de moléculas orgánicas para moléculas que son capaces de unirse a un polipéptido diana son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, las Publicaciones PCT N.º WO 00/00823 y N.º WO 00/39585).

Un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica “que une” un antígeno de interés, por ejemplo, una diana de antígeno polipeptídico asociado a un tumor, es aquel que se une al antígeno con suficiente afinidad de tal modo que el anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica es útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico en la selección de una célula o tejido que expresa el antígeno y no experimenta una reacción cruzada significativa con otras proteínas. En tales realizaciones, el grado de unión del anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica a una proteína “no diana” será inferior a aproximadamente 10 % de la unión del anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica a su proteína diana particular tal como se determina por análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) o radioinmunoprecipitación (RIA). Con respecto a la unión de un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica a una molécula diana, el término “unión específica” o “se une específicamente a” o es “específico de” un polipéptido particular o un epítipo de un polipéptido diana particular, significa una unión que es mensurablemente diferente de una interacción no específica. La unión específica se puede medir, por ejemplo, mediante la determinación de la unión de una molécula en comparación con la unión de una molécula de control, que generalmente es una molécula de estructura similar que no tiene actividad de unión. Por ejemplo, la unión específica se puede determinar mediante competición con una molécula de control que es similar a la diana, por ejemplo, un exceso de diana no marcada. En este caso, la unión específica se indica si la unión de la diana marcada a una sonda es inhibida competitivamente por un exceso de diana no marcada. La expresión “unión específica” o “se une específicamente a” o es “específico de” un polipéptido particular o un epítipo de un polipéptido diana particular, tal como se utiliza en la presente memoria puede ser exhibida, por ejemplo, por una molécula que tiene una Kd para la diana de por lo menos aproximadamente 10<sup>-4</sup> M, alternativamente al menos aproximadamente 10<sup>-5</sup> M, alternativamente al menos aproximadamente 10<sup>-6</sup> M, alternativamente al menos aproximadamente 10<sup>-7</sup> M, alternativamente al menos aproximadamente 10<sup>-8</sup> M, alternativamente al menos aproximadamente 10<sup>-9</sup> M, alternativamente al menos aproximadamente 10<sup>-10</sup> M, alternativamente al menos aproximadamente 10<sup>-11</sup> M, alternativamente al menos aproximadamente 10<sup>-12</sup> M, o mayor. En una realización, el término “unión específica” se refiere a la unión donde una molécula se une a un polipéptido particular o epítipo de un polipéptido particular sin unirse sustancialmente a ningún otro polipéptido o epítipo de polipéptido.

La similitud estructural de los bucles L2 de Hhip1 y L2 de Ptch permite la reactividad cruzada de anticuerpos anti-Hhip1<sub>β12</sub> que se dirigen al bucle L2. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, los anticuerpos anti-Hhip1<sub>β12</sub> que se unen al bucle L2 de Hhip1<sub>β12</sub> también pueden unir específicamente el bucle L2 de Ptch. Del mismo modo, las moléculas orgánicas pequeñas diseñadas para unirse al bucle L2 de Hhip1<sub>β12</sub> o a la porción de Hedgehog que interactúa con el bucle L2 de Hhip1<sub>β12</sub> también pueden unirse a la parte de estructura análoga de L2 de Ptch.

“Patched” o “Ptch” como se usa en la presente memoria incluye tanto polipéptidos Ptch como Ptch2 cuando se hace referencia a los anticuerpos, oligopéptidos y moléculas orgánicas pequeñas y varios métodos de uso de los mismos se divulgan en la presente memoria.

Un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica que “inhibe el crecimiento de células tumorales” o un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica “inhibidores del crecimiento” es aquel que tiene como resultado una inhibición mensurable del crecimiento de las células cancerosas sensibles a la estimulación de Hedgehog. Anticuerpos anti-Hhip1<sub>β12</sub>, oligopéptidos u otras moléculas orgánicas “inhibidores del crecimiento” preferidos inhiben el crecimiento de las células tumorales sensibles a Hedgehog en más de un 20 %, preferiblemente de aproximadamente 20 % a aproximadamente 50 %, e incluso más preferiblemente, en más de un 50 % (por ejemplo, de aproximadamente 50 % a aproximadamente 100 %) en comparación con el control apropiado, no tratándose generalmente las células tumorales control con el anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica que se esté analizando. En una realización, la inhibición del crecimiento se puede medir a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,1 a 30 µg/ml o aproximadamente 0,5 nM a 200 nM en cultivo celular, donde se determina la inhibición del crecimiento 1-10 días después de la exposición de las células tumorales al anticuerpo. El anticuerpo es inhibidor del crecimiento *in vivo* si la administración del anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> a aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 100 µg/kg de peso tiene como resultado una reducción del tamaño del tumor o la proliferación de células tumorales en el plazo de aproximadamente 5 días a 3 meses desde la primera administración del anticuerpo, preferiblemente en el plazo de aproximadamente 5 a 30 días.

La célula tumoral es generalmente una que es sensible a la señalización Hedgehog. Preferiblemente, la célula tumoral, es, por ejemplo, una célula de un carcinoma de células basales, próstata, mama, ovario, estómago, endometrio, pulmón, riñón, colon, vejiga.

5 “Funciones efectoras” del anticuerpo se refiere a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia nativa o una región Fc variante de la secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo que varían con el isotipo de anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras del anticuerpo incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento; unión al receptor de Fc; citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA); fagocitosis; regulación a la baja de los receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de linfocitos B) y la activación de linfocitos B.

15 “Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos” o “CCDA” se refiere a una forma de citotoxicidad en la cual la Ig secretada unida a los receptores de Fc (FcR) presente en ciertas células citotóxicas (por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales (NK), neutrófilos, y macrófagos) permite que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana portadora del antígeno y posteriormente destruyan la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos “arman” a las células citotóxicas y son absolutamente necesarios para dicha destrucción. Las células primarias que intervienen en la CCDA, los linfocitos NK, expresan FcγRIII solamente, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet (1991) Annu. Rev. Immunol. 9:457-492. Se puede llevar a cabo un ensayo *in vitro* de CCDA, tal como el descrito en Patente US-5.500.362 o 5.821.337, para evaluar la actividad de CCDA de una molécula de interés. Células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad de CCDA de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes *et al.* (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95 (2):652-656.

25 “Receptor Fc” o “FcR” describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es una secuencia nativa del FcR humano. Además, un FcR preferido es aquel que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII and FcγRIII, incluidas las variantes alélicas y formas alternativas de corte y empalme de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un “receptor activador”) y FcγRIIB (un “receptor inhibidor”), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplasmáticos de los mismos. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo de activación de tirosina inmunorreceptor (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición de tirosina inmunorreceptor (ITIM) en su dominio citoplásmico. (ver revisión M. in Daëron, (1997) Annu. Rev. Immunol.15:203-234). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet (1991) Annu. Rev. Immunol. 9:457-492; Capel *et al.* (1994) Immunomethods 4:25-34 y de Haas *et al.* (1995) J. Lab. Clin. Med.126: 330-341. Otros FcR, incluyendo los que se identifican en el futuro, están abarcados por el término “FcR” en la presente memoria. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer *et al.* (1976) J. Immunol.117: 587 y Kim *et al.* (1994) J. Immunol.24: 249).

40 “Células efectoras humanas” son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. Preferiblemente, las células expresan al menos FcγRIII y realizan la función efectora de CCDA. Ejemplos de leucocitos humanos que median en la CCDA incluyen células mononucleares de sangre periférica (CMSP), linfocitos citolíticos naturales (NK), monocitos, linfocitos T citotóxicos y neutrófilos; prefiriéndose las CMSP y los linfocitos NK. Las células efectoras se pueden aislar de una fuente nativa, por ejemplo, a partir de sangre.

45 “Citotoxicidad dependiente del complemento” o “CDC” se refiere a la lisis de una célula diana en presencia del complemento. La activación de la vía clásica del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a anticuerpos (de la subclase apropiada) que están unidos a su antígeno afín. Para evaluar la activación del complemento, se puede llevar a cabo un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, (1996) J. Immunol. Methods: 202:163.

Los términos “cáncer” y “canceroso” se refieren o describen el estado fisiológico en mamíferos que se caracteriza generalmente por un crecimiento celular no regulado. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia o tumores malignos linfoides. Más ejemplos particulares de dichos cánceres incluyen cáncer de células escamosas (por ejemplo, cáncer de células escamosas epiteliales), cáncer de pulmón incluyendo el cáncer de pulmón microcítico, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma del pulmón y carcinoma escamoso del pulmón, cáncer del peritoneo, cáncer hepatocelular, cáncer gástrico o de estómago incluyendo cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándulas salivares, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, melanoma, mieloma múltiple y linfoma de linfocitos B, cáncer de cerebro, así como cáncer de cabeza y cuello, carcinoma de células basales (CCB) adenocarcinoma ductal pancreático (ADP) y las metástasis asociadas.

65 Las expresiones “trastorno proliferativo celular” y “trastorno proliferativo” se refieren a trastornos que están asociados a cierto grado de proliferación celular anormal. En una realización, el trastorno proliferativo celular es

cáncer.

“Tumor”, como se usa en la presente memoria, se refiere a todo crecimiento celular neoplásico y proliferación, ya sea maligno o benigno y todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos.

5 Un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica que “induce la muerte celular” es aquel que hace que una célula viable se convierta en no viable. La célula es una que es sensible a la señalización de Hedgehog, tal como aquella que expresa Hhip1 y/o Ptch, preferiblemente una célula que sobreexpresa el polipéptido Ptch en comparación con una célula normal del mismo tipo de tejido. Preferiblemente, la célula es una célula cancerosa, por ejemplo, una célula basal, pancreática, de mama, ovario, estómago, endometrio, glándula salivar, pulmón, riñón, colon, tiroides, o vejiga. La muerte celular *in vitro* puede ser determinada en ausencia de complemento y de células efectoras inmunes para distinguir la muerte celular inducida por la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). Por lo tanto, el ensayo para determinar la muerte celular se puede realizar utilizando suero inactivado por calor (es decir, en ausencia de complemento) y en ausencia de células efectoras inmunes. Para determinar si el anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica es capaz de inducir la muerte celular, se puede determinar la pérdida de integridad de la membrana evaluada por la absorción de yoduro de propidio (IP), azul de tripano (ver Moore *et al.* (1995) *Cytotechnology* 17: 1-11) o 7AAD en relación con las células no tratadas. Los anticuerpos, oligopéptidos u otras moléculas orgánicas inductoras de la muerte celular son aquellas que inducen la absorción de IP en el ensayo de absorción de IP en células BT474.

20 Una “célula que expresa Hhip1<sub>β12</sub>” es una célula que expresa un polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> endógeno ya sea en la superficie celular o en una forma secretada. Un “cáncer sensible a Hedgehog” es un cáncer que comprende células cancerosas que tienen un polipéptido Hhip1 y/o polipéptido Ptch presente en la superficie celular. Un “cáncer sensible a Hedgehog” produce niveles suficientes polipéptidos de receptor Hh en la superficie de células del mismo, de manera que un anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> (por ejemplo, un anticuerpo que se une a un bucle L2 de Hhip1 y Ptch e inhibe la unión de Hh), un oligopéptido u otra molécula orgánica puede unirse a la misma y tener un efecto terapéutico con respecto al cáncer.

30 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “inmuno adhesina” designa moléculas de tipo anticuerpo que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una “adhesina”) con las funciones efectoras de los dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmuno adhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es otra diferente a la del sitio de reconocimiento del antígeno y unión de un anticuerpo (es decir, es “heteróloga”) y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina. La parte adhesina de una molécula de inmuno adhesina generalmente es una secuencia de aminoácidos contigua que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia del dominio constante de la inmunoglobulina en la inmuno adhesina puede obtenerse de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3 o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM.

40 La palabra “marcador” cuando se usa en la presente memoria, se refiere a un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente al anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica a fin de generar un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica “marcado”. El marcador puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, marcadores de radioisótopos o marcadores fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición sustrato que es detectable.

45 El término “agente citotóxico” tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o causa la destrucción de las células. El término pretende incluir isótopos radioactivos (por ejemplo, At211, I131, I125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212, P32 y los isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, enzimas y fragmentos de los mismos tales como enzimas nucleolíticas, antibióticos y toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de los mismos y los diversos agentes antitumorales o anticancerosos descritos a continuación. Otros agentes citotóxicos se describen a continuación. Un agente tumoricida causa la destrucción de las células tumorales.

55 Un “agente quimioterapéutico” es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y CYTOXAN<sup>®</sup> ciclofosfamida; sulfonatos de alquilo, tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carboquona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo alretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenoformamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); delta-9-tetrahidrocannabinol (dronabinol, MARINOL<sup>®</sup>); beta-lapachona; lapachol; colchicina; ácido betulínico; una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán (HYCAMTIN<sup>®</sup>), CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR<sup>®</sup>), acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina); briostatina; calistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; tenipósido; criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos KW-2189 y CB1-TM1); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; esponjistatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas

tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos enedina (por ejemplo, calicheamicina, especialmente calicheamicina gamma11 y calicheamicina omega11 (véase, por ejemplo, Agnew (1994) Chem. Intl. Ed. Engl.33:183-186); dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina; así como cromóforo de neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos Enedina y cromoproteínas relacionadas), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, ADRIAMYCIN<sup>®</sup> doxorubicina (incluyendo morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterin, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxilfluridina, encitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitiostano, testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reponedores de ácido fólico tal como ácido frolnico; aceglatona; glucósido aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diaziquna; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinán; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK<sup>®</sup> complejo polisacárido (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirán; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-trichlorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (ELDISINE<sup>®</sup>, FILDESIN<sup>®</sup>); dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, por ejemplo, TAXOL<sup>®</sup> paclitaxel (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), ABRAXANE<sup>™</sup> sin Cremophor, formulación de nanopartículas de paclitaxel unido a albúmina (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois), y TAXOTERE<sup>®</sup> docetaxel (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); cloranbucilo; gemcitabina (GEMZAR<sup>®</sup>); 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina (Velban<sup>®</sup>); platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (ONCOVIN<sup>®</sup>); oxaliplatino; leucovorina; vinorelbina (NAVELBINE<sup>®</sup>); novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; capecitabina (XELODA<sup>®</sup>); sales, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente aceptables; así como combinaciones de dos o más de los anteriores como CHOP, una abreviación de una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona y FOLFOX, una abreviatura de un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN<sup>™</sup>) combinado con 5-FU y leucovorina.

También se incluyen en esta definición los agentes anti-hormonales que actúan para regular, reducir, bloquear o inhibir los efectos de hormonas que pueden promover el crecimiento del cáncer y que con frecuencia se presentan en forma de tratamiento sistémico, o dirigido a todo el cuerpo. Pueden ser las propias hormonas. Ejemplos incluyen anti-estrógenos y moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERM), incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno (incluyendo NOLVADEX<sup>®</sup> tamoxifeno), EVISTA<sup>®</sup> raloxifeno, droloxifeno, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y FARESTON<sup>®</sup> toremifeno; anti-progesterona; reguladores a la baja del receptor de estrógenos (ERD); agentes que actúan suprimiendo o inhibiendo la función ovárica, por ejemplo, los agonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) tales como LUPRON<sup>®</sup> y ELIGARD<sup>®</sup> acetato de leuprolida, acetato de goserelina, acetato de buserelina y tripterelins; otros anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida y los inhibidores de la aromatasas que inhiben la enzima aromatasas, que regula la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, tales como, por ejemplo, 4(5) imidazoles, aminoglutetimida, MEGASE<sup>®</sup> acetato de megestrol, AROMASIN<sup>®</sup> exemestano, formestano, fadrozol, RIVISOR<sup>®</sup> vorozol, FEMARA<sup>®</sup> letrozol y ARIMIDEX<sup>®</sup> anastrozol. Además, dicha definición de agentes quimioterapéuticos incluye bifosfonatos, tales como clodronato (por ejemplo, BONEFOS<sup>®</sup> u OSTAC<sup>®</sup>), DIDROCAL<sup>®</sup> etidronato, NE-58095, ZOMETA<sup>®</sup> ácido zoledrónico/zoledronato, FOSAMAX<sup>®</sup> alendronato, AREDIA<sup>®</sup> pamidronato, SKELID<sup>®</sup> tiludronato o ACTONEL<sup>®</sup> risedronato; así como troxacitabina (un análogo de nucleósido citosina de 1,3-dioxolano); oligonucleótidos antisentido, particularmente los que inhiben la expresión de genes en las vías de señalización implicadas en la proliferación de células aberrantes, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas tales como THERATOPE<sup>®</sup> vacuna y vacunas de terapia génica, por ejemplo, ALLOVECTIN<sup>®</sup> vacuna, LEUVECTIN<sup>®</sup> vacuna y VAXID<sup>®</sup> vacuna; LURTOTECAN<sup>®</sup> inhibidor de la topoisomerasa 1; ABARELIX<sup>®</sup> rmRH; lapatinib ditosilato (un inhibidor de la tirosina quinasa doble ErbB-2 y EGFR de molécula pequeña también conocido como GW572016); y sales, ácidos o derivados de cualquiera de los anteriores farmacéuticamente aceptables.

Un "agente inhibidor del crecimiento" cuando se usa en la presente memoria, se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente una célula cancerosa que expresa Hip o Ptch (es decir, una célula cancerosa sensible a Hedgehog), ya sea *in vitro* o *in vivo*. Por lo tanto, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduce significativamente el porcentaje de células que expresan Hip en fase S. Ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un momento distinto de la fase S), tales como agentes que inducen la detención de G1 y la fase M. Bloqueantes clásicos de la fase M incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), taxanos y los inhibidores de la topoisomerasa II,

tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Aquellos agentes que detienen G1 también afectan a la detención de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN, tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Se puede encontrar más información se puede encontrar en THE MOLECULAR BASIS OF CANCER, Mendelsohn and Israel, eds., Capítulo 1, titulado "La regulación del ciclo celular, oncogenes y fármacos antineoplásicos" por Murakami *et al.* (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente la p.13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos anticancerígenos derivados ambos del tejo. Docetaxel (TAXOTERE<sup>®</sup>, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo, es un análogo semisintético de paclitaxel (TAXOL<sup>®</sup>, Bristol-Myers Squibb). Paclitaxel y docetaxel promueven el ensamblaje de los microtúbulos a partir de dímeros de tubulina y estabilizan los microtúbulos mediante la prevención de la despolimerización, lo que resulta en la inhibición de la mitosis en las células.

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

El término "citocina" es un término genérico para las proteínas liberadas por una población de células que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Ejemplos de tales citocinas son linfocinas, monocinas y hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citocinas se incluyen hormonas de crecimiento tales como la hormona del crecimiento humano, hormona del crecimiento humano N-metionilo y hormona de crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorrelaxina; hormonas glicoproteínas, tales como hormona estimulante del foliculo (FSH), hormona estimulante del tiroides (TSH) y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor de necrosis tumoral  $\alpha$  y factor de necrosis tumoral  $\beta$ ; sustancia inhibidora de Müller; péptido asociado a la gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento vascular endotelial; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso, tales como NGF  $\beta$ ; factor de crecimiento de plaquetas; factores de crecimiento transformante (TGF) tales como TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ ; factor de crecimiento similar a la insulina I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores; interferones tales como interferón  $\alpha$ , interferón  $\beta$  e interferón  $\gamma$ ; factores estimulantes de las colonias (CSF) tales como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y CSF de granulocitos (G-CSF); interleucinas (IL) tales como IL-1, IL-1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; un factor de necrosis tumoral como el TNF- $\alpha$  o TNF- $\beta$ ; y otros factores de polipéptidos que incluyen LIF y el ligando kit (KL). Tal como se utiliza en la presente memoria, el término citocina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia nativa.

El término "prospecto" se utiliza para referirse a las instrucciones incluidas habitualmente en los envases comerciales de productos terapéuticos, que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosis, administración, contraindicaciones y/o advertencias sobre el uso de tales productos terapéuticos.

**Tabla 1**

Hhip1 $\beta$ <sub>12</sub>	XXXXXXXXXXXXXXXXXX	(Longitud = 15 aminoácidos)
Proteína de comparación	XXXXXXXXXXXXXX	(Longitud = 12 aminoácidos)

% de identidad de secuencia de aminoácidos =

(el número de restos de aminoácidos con coincidencia idéntica ente las dos secuencias de polipéptidos determinado por ALIGN-2) dividido por (el número total de restos de aminoácidos del polipéptido Hhip1 $\beta$ <sub>12</sub>) = 5 dividido por 15 = 33,3 %.

**Tabla 2**

Hhip1 $\beta$ <sub>12</sub>	XXXXXXXXXX	(Longitud = 10 aminoácidos)
Proteína de comparación	XXXXXXXXXXXXZZYZ	(Longitud = 15 aminoácidos)

% de identidad de secuencia de aminoácidos =

(el número de restos de aminoácidos con coincidencia idéntica ente las dos secuencias de polipéptidos determinado por ALIGN-2) dividido por (el número total de restos de aminoácidos del polipéptido Hhip1 $\beta$ <sub>12</sub>) = 5 dividido por 10 = 50 %.

**Tabla 3**

ADN de Hhip1 $\beta$ <sub>12</sub>	NNNNNNNNNNNNNN	(Longitud = 14 nucleótidos)
ADN de comparación	NNNNNNLLLLLLLLLL	(Longitud = 16 nucleótidos)

% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos =

(el número de nucleótidos con coincidencia idéntica ente las dos secuencias de ácido nucleico determinado por ALIGN-2) dividido por (el número total de restos de nucleótidos del ADN de Hip) = 6 dividido por 14 = 42,9 %.

**Tabla 4**

ADN de Hhip1 <sub>β12</sub>	NNNNNNNNNNNN	(Longitud = 12 nucleótidos)
ADN de comparación	NNNNLLLVV	(Longitud = 9 nucleótidos)

% de identidad de secuencia de ácidos nucleicos =

(el número de nucleótidos con coincidencia idéntica ente las dos secuencias de ácido nucleico determinado por ALIGN-2) dividido por (el número total de restos de nucleótidos del ADN de Hip) = 4 dividido por 12 = 33,3 %.

## II. Composiciones y métodos

5

### A. Polipéptidos Hhip1<sub>β12</sub>

Como se divulga en la presente memoria, opcionalmente los polipéptidos Hhip1<sub>β12</sub> son polipéptidos aislados que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID N°: 83, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9, SEC ID N°: 12, SEC ID N°: 13, SEC ID N°: 14, SEC ID N°: 15, y SEC ID N°: 16. También se describen polipéptidos derivados de Hhip1<sub>β12</sub>, tales como los dominios individuales que tienen las secuencias de aminoácidos de SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 8, SEC ID N°: 9 y SEC ID N°: 10.

Secuencias de ácidos nucleicos que codifican estos polipéptidos se pueden clonar en vectores de expresión apropiados y transfectarse en células hospedadoras apropiadas. Los polipéptidos expresados se pueden aislar usando varios métodos conocidos en la técnica y descritos en la presente memoria

### B. Anticuerpos anti-Hhip1<sub>β12</sub>

20

Se divulgan anticuerpos anti-Hhip1<sub>β12</sub> que se pueden usar en la presente memoria como agentes terapéuticos y/o de diagnóstico. En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-Hhip1<sub>β12</sub> se producen por inmunización de animales con polipéptidos Hhip1<sub>β12</sub> y tales anticuerpos se unen específicamente a epítopos en Hhip1 nativa que no pudo ser obtenida a través de la inmunización con proteína Hhip1 nativa (que contiene el supuesto dominio Frizzled). La invención proporciona anticuerpos contra el bucle L2 de Hhip1 y anticuerpos anti-idiotípicos de los mismos. Ejemplos de anticuerpos incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, biespecíficos, anti-idiotípicos y heteroconjugados

25

#### 1. Anticuerpos policlonales

30

Los anticuerpos policlonales se obtienen preferiblemente en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o (ip) intraperitoneales del antígeno relevante y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno relevante (especialmente cuando se utilizan péptidos sintéticos) con una proteína que es inmunogénica en la especie a inmunizar. Por ejemplo, el antígeno puede conjugarse con hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja, utilizando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de sulfosuccinimida y maleimidobenzoil (conjugación a través de restos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de restos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl<sub>2</sub> o R<sup>1</sup>N=C=NR donde R y R<sup>1</sup> son grupos alquilo diferentes.

35

Se inmunizan animales contra el antígeno, conjugados inmunogénicos o derivados mediante la combinación, por ejemplo, de 100 µg o 5 µg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución intradérmicamente en múltiples sitios. Un mes más tarde, los animales se refuerzan con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. De siete a 14 días más tarde, se sangran los animales y se analiza el suero para determinar el título de anticuerpos. Los animales se refuerzan hasta que el título se estabiliza. Los conjugados también se pueden hacer en cultivo de células recombinantes como proteínas de fusión. También, los agentes agregantes, tales como el alumbre se usan adecuadamente para mejorar la respuesta inmunitaria.

45

#### 2. Anticuerpos monoclonales

50

Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando el procedimiento del hibridoma descrito por primera vez por Kohler y Milstein (1975) Nature, 256:495 o se pueden preparar mediante métodos de ADN recombinante (Patente US-4.816.567).

55

En el método del hibridoma, un ratón u otro animal hospedador apropiado, tal como un hámster, se inmuniza como se describe anteriormente para obtener linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Como alternativa, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*. Después de la inmunización, los linfocitos se aíslan y a continuación se fusionan con una línea celular de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)).

Las células de hibridoma así preparadas se siembran y se hacen crecer en un medio de cultivo adecuado, medio que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas (también denominadas como compañero de fusión). Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo selectivo para los hibridomas incluirá generalmente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que impiden el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

Células de mieloma compañeros de fusión preferidas son aquellas que se fusionan eficientemente, soportan la producción de un alto nivel estable de anticuerpos por las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio selectivo que selecciona contra las células parentales no fusionadas. Líneas celulares de mieloma preferidas son líneas de mieloma murino, tales como las derivados de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles del Cell Distribution Center del Instituto Salk, San Diego, California EE.UU. y SP-2 y derivados, por ejemplo, células X63-Ag8-653 disponibles en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), Manassas, Virginia, EE.UU. También se han descrito líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor (1984) J. Immunol.133: 3001) y Brodeur *et al.*, MONOCLONAL ANTIBODY PRODUCTION TECHNIQUES AND APPLICATIONS, pp.51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

El medio de cultivo en el que las células de hibridoma crecen se ensaya para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede, por ejemplo, determinarse mediante el análisis Scatchard descrito en Munson *et al.*, (1980) Anal. Biochem. 107:220.

Una vez identificadas las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitante y cultivar mediante procedimientos estándar (Goding, Monoclonal Antibodies: PRINCIPLES AND PRACTICE, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)). Medios de cultivo adecuados para este propósito incluyen, por ejemplo, D-MEM o medio RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como tumores de ascitis en un animal, por ejemplo, mediante inyección i.p. inyección de las células en ratones.

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

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencia utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de tal ADN. Una vez aislado, el ADN podría colocarse en vectores de expresión, que luego son transfectedos en células hospedador tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otro modo no producen proteína anticuerpo, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. Los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica para el anticuerpo incluyen Skerra *et al.*, (1993) Curr. Opin. Immunol. 5:256-262 (1993) y Plückthun (1992) Immunol. Revs.130:151-188.

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

El ADN que codifica el anticuerpo puede modificarse para producir polipéptidos de anticuerpos quiméricos o de fusión, por ejemplo, mediante la sustitución de las secuencias del dominio constante de la cadena pesada y la cadena ligera (CH y CL) humanas por las secuencias murinas homólogas (Patente US-4.816.567 y Morrison, *et al.* (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851) o mediante la fusión de la secuencia codificante de inmunoglobulina con toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido que no es inmunoglobulina (polipéptido heterólogo). Las secuencias de polipéptido que no es inmunoglobulina pueden sustituirse por los dominios constantes de un anticuerpo, o se sustituyen por los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprende un sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación de antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente

### 3. Anticuerpos humanos y humanizados

Los anticuerpos anti-Hhip1 de la invención pueden comprender además anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> u otras subsecuencias de unión a antígeno de los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo del receptor) en las que restos de una región determinante de la complementariedad (RDC) del receptor se sustituyen por restos de una RDC de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo que tiene la deseada especificidad, afinidad y capacidad. En algunos casos, los restos del marco Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes restos no humanos. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender restos que no se encuentran ni en las secuencias del anticuerpo receptor ni de la RDC ni en las secuencias marco importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente la totalidad de al menos uno, y generalmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado óptimamente también comprenderá al menos una porción de una región constante (Fc) de una inmunoglobulina, generalmente la de una inmunoglobulina humana (Jones *et al.* (1986) Nature 321:522-525; Riechmann *et al.* (1988) Nature 332:323-329 y Presta (1992) Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596).

Los métodos para anticuerpos no humanos humanizantes son bien conocidos en la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en él de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se denominan frecuentemente como restos "importados", que generalmente se obtienen de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones *et al.* (1986) Nature 321:522-525; Riechmann *et al.* (1988) Nature 332:323-329; Verhoeven *et al.* (1988) Science 239:1534-1536), mediante la sustitución de RDC de roedor o secuencias RDC por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente US- 4.816.567), en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son generalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de la RDC y posiblemente algunos restos del FR se sustituyen por restos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, para ser usados en la obtención de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad y la respuesta HAMA (anticuerpo anti-ratón humano) cuando el anticuerpo es para uso terapéutico humano. Según el método denominado del "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba frente a toda la biblioteca de secuencias de dominios variables humanos conocidos. Se identifica la secuencia del dominio V humana que es la más cercana a la del roedor y se acepta la región (FR) humana en ella para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.* (1993) J. Immunol. 151: 2296; Chothia *et al.* (1987) J. Mol. Biol. 196:901). Otro método utiliza una región marco particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. El mismo marco se puede utilizar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285; Presta *et al.* (1993) J. Immunol. 151: 2623).

Es importante además que los anticuerpos se humanicen con retención de la alta afinidad de unión por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, según un método preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales están comúnmente disponibles y son familiares para los expertos en la técnica. Existen programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del probable papel de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los restos FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de las secuencias receptoras e importadas, de manera que, se consigue la característica deseada del anticuerpo, tal como una mayor afinidad por el antígeno(s) diana. En general, los restos de la región hipervariable están directamente y más

sustancialmente implicados en influir en la unión al antígeno.

Se contemplan varias formas de anticuerpos humanizados. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como un Fab, que está opcionalmente conjugado con uno o más agente(s) citotóxicos con el fin de generar un inmunoconjugado. Como alternativa, el anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo IgG1 intacto.

Como alternativa a la humanización, se pueden generar anticuerpos humanos. Por ejemplo, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión (JH) de la cadena pesada del anticuerpo en ratones quiméricos y mutantes de la línea germinal tiene como resultado la inhibición completa de la producción endógena de anticuerpos. La transferencia de una selección de genes de inmunoglobulina de la línea germinal humana en dichos ratones mutantes de línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno. Véase, por ejemplo., Jakobovits *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551; Jakobovits *et al.* (1993) Nature 362:255-258; Bruggemann *et al.* (1993) Year in Immuno. 7:33; Patentes US-5.545.806, US-5.569.825, US-5.591-669 (todas ellas de GenPharm); US-5.545.807 y el documento WO 97/17852.

Como alternativa, la tecnología de expresión en fagos (McCafferty *et al.* (1990) Nature 348:552-553) se puede utilizar para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro*, a partir de repertorios de genes del dominio variable (V) de la inmunoglobulina de donantes no inmunizados. Según esta técnica, los genes del dominio V del anticuerpo se clonan en marco un gen de la proteína de la cubierta mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd y se muestran como fragmentos de anticuerpo funcionales en la superficie de la partícula del fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta esas propiedades. Por lo tanto, el fago imita algunas de las propiedades de los linfocitos B. La expresión en fagos se puede realizar en varios formatos, revisada en, por ejemplo, Johnson, K. S., *et al.* (1993) Current Opinion in Structural Biology 3:564-571. Pueden utilizarse varias fuentes de segmentos de genes V para la expresión en fagos. Clackson *et al.* (1991) Nature 352:624-628 aisló una serie diversa de anticuerpos anti-oxazolona a partir de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes V derivados de los bazo de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V de donantes humanos no inmunizados y se pueden aislar anticuerpos frente a diversos antígenos (incluyendo auto-antígenos) esencialmente siguiendo las técnicas descritas por Marks *et al.* (1991) J. Mol. Biol. 222:581-597 o Griffith *et al.* (1993) EMBO J. 12:725-734. Véase también, las patentes US-5.565.332 y 5.573.905.

Como se ha discutido anteriormente, los anticuerpos humanos también pueden ser generados por linfocitos B activados *in vitro* (ver las Patentes US-5.567.610 y 5.229.275).

#### 4. Fragmentos de anticuerpo

En ciertas circunstancias, hay ventajas de usar fragmentos de anticuerpos, en lugar de anticuerpos completos. El menor tamaño de los fragmentos permite una eliminación rápida y puede conducir a un mejor acceso a los tumores sólidos.

Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaban mediante la digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto *et al.* (1992) J. Biochem. Biophys. Methods 24:107-117 y Brennan *et al.* (1985) Science 229:81). Sin embargo, estos fragmentos ahora pueden ser producidos directamente por células hospedadoras recombinantes. Los fragmentos de anticuerpos Fab, Fv y ScFv pueden expresarse todos ellos todos en y ser secretados de *E. coli*, permitiendo así la producción sencilla de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de las bibliotecas de fagos de anticuerpos descritas anteriormente. Como alternativa, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab') (Carter *et al.* (1992) Bio/Technology 10:163-167). Según otro enfoque, los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> se pueden aislar directamente del cultivo de células hospedadoras recombinantes. El fragmento Fab y F(ab')<sub>2</sub> con una mayor semivida *in vivo* que comprende restos del epítipo de unión al receptor silvestre se describe en la Patente US-5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el médico experto. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena única (scFv). Véase WO 93/16185; Patente US-5.571.894 y Patente US-5.587.458. Fv y sFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos que están desprovistos de regiones constantes; por lo tanto, son adecuadas para la unión no específica reducida durante el uso *in vivo*. Pueden construirse proteínas de fusión sFv para conseguir la fusión de una proteína efectora en el extremo amino o carboxi de un sFv (Véase ANTIBODY ENGINEERING, ed. Borrebaeck, *supra*). El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la Patente US-5.641.870. Dichos fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

## 5. Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión para al menos dos epítopos diferentes. Ejemplos de anticuerpos biespecíficos que pueden unirse a dos epítopos diferentes de un polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> son como los que se divulgan en la presente memoria. Otros de estos anticuerpos pueden combinar un sitio de unión a Hhip1<sub>β12</sub> con un sitio de unión para otra proteína. Como alternativa, un brazo específico de L2 puede combinarse con un brazo que se une a una molécula activadora en un leucocito tal como una molécula receptor de linfocitos T (por ejemplo, CD3) o receptores Fc para IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16), con el fin de centrar y localizar los mecanismos de defensa celular frente a la célula que expresa Hip o Ptch. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden utilizar para localizar agentes citotóxicos para las células que expresan Hhip1 y/o Ptch. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a Hip o Ptch y un brazo que se une al agente citotóxico (por ejemplo, saporina, anti-interferón-α, alcaloide de la vinca, la cadena A de la ricina, metotrexato o hapteno con isótopo radioactivo). Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')<sub>2</sub>).

El documento WO 96/16673 describe un anticuerpo anti-ErbB2/anti-FcγRIII biespecífico y la Patente US-5.837.234 divulga un anticuerpo anti-ErbB2/anti-FcγRI biespecífico. Un anticuerpo anti-ErbB2/Fcα biespecífico se muestra en el documento WO98/02463. La Patente US-5.821.337 enseña un anticuerpo anti-ErbB2/anti-CD3 biespecífico. Por lo tanto, se conocen métodos en la técnica para producir anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la co-expresión de dos pares de cadena de pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen especificidades diferentes (Millstein *et al.* (1983) Nature 305:537-539). Debido a la selección 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 divulgan en el documento WO 93/08829 y en Traunecker *et al.* (1991) EMBO J. 10:3655-3659.

De acuerdo con un enfoque diferente, los dominios variables del anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan a secuencias del dominio constante de la inmunoglobulina. Preferiblemente, la fusión es con un dominio constante de una cadena pesada de la Ig, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere tener la primera región constante de una 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 para las fusiones de la cadena pesada de la inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de la inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se co-transfectan en una célula hospedadora adecuada. Esto proporciona una mayor flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones donde se usan proporciones desiguales de las tres cadenas de polipéptido utilizadas en la, siempre que proporcione el rendimiento óptimo del anticuerpo biespecífico deseado. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas polipeptídicas en un solo vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales tiene como resultado rendimientos elevados o cuando las proporciones no tengan ningún efecto significativo sobre el rendimiento de la combinación de cadenas deseada.

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 proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se observó que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo una mitad de la molécula biespecífica proporciona un modo fácil de separación. Este enfoque se divulga en el documento WO 94/04690. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh *et al.* (1986) Meth. Enzymol.121:210.

Según otro enfoque descrito en la Patente US-5.731.168, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo puede diseñarse para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfaz preferida comprende al menos una parte del dominio CH3. En este método, una o más cadenas laterales pequeñas de aminoácidos de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo se sustituyen por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). En la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo se crean cavidades "compensatorias" de tamaño idéntico o similar a la cadena o cadenas laterales grandes mediante la sustitución de cadenas laterales de aminoácidos grandes con otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para incrementar el rendimiento del heterodímero respecto a otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede estar acoplado a avidina, el otro a biotina. Se ha propuesto que dichos anticuerpos vayan dirigidos, por ejemplo, a las células diana del sistema inmunitaria dirigidas a células no deseadas (Patente US-4.676.980) y para el tratamiento de la infección por VIH (documento WO 91/00360, WO 92/200373 y

EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados se pueden fabricar utilizando cualquier método de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados son bien conocidos en la técnica y se divulgan en la Patente US-4.676.980, junto con una serie de técnicas de reticulación.

- 5 Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también se han descrito en la literatura. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse usando la unión química. Brennan *et al.* (1985) Science 229: 81 describe un procedimiento en el que anticuerpos intactos se escinden proteolíticamente para generar fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente complejante de ditiol, arsenito sódico, para estabilizar los ditioles vecinales y evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten a continuación en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados Fab'-TNB se reconvierte a continuación en Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden utilizarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.
- 10
- 15 El progreso reciente ha facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH a partir de *E. coli*, los cuales se pueden acoplar químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.* (1992) J. Exp. Med. 175:217-225 describe la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico completamente humanizado F(ab')<sub>2</sub>. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico así formado fue capaz de unirse a células que sobreexpresan el receptor ErbB2 y linfocitos T humanos normales, así como desencadenar la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumores de mama humanos.
- 20

También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente de cultivos de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina (Kostelny *et al.* (1992) J. Immunol. 148(5):1547-53). Los péptidos cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y luego se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpo" descrita por Hollinger *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos. Los fragmentos comprenden un VH conectado a un VL mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios VH y VL de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios VL y VH de otro fragmento, formando de ese modo dos sitios de unión al antígeno. También se ha descrito otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecíficos mediante el uso de dímeros de cadena simple Fv (sFv). Véase Gruber *et al.* (1994) J. Immunol. 152:5368.

25

30

35

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos trispecíficos. Tutt *et al.* (1991) J. Immunol. 147:60.

## 40 6. Anticuerpos heteroconjugados

Los anticuerpos heteroconjugados están también dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos covalentemente. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigirse a células diana del sistema inmunitaria dirigidas a células no deseadas (Patente US-4.676.980) y para el tratamiento de la infección por VIH (WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089). Se contempla que los anticuerpos se pueden preparar *in vitro* usando métodos conocidos en la química de proteínas sintéticas, incluyendo aquellos que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, se pueden construir inmunotoxinas usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Ejemplos de reactivos adecuados para este propósito incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y los divulgados, por ejemplo, en la Patente US-4.676.980.

45

50

## 7. Anticuerpos multivalentes

Un anticuerpo multivalente puede ser internalizado (y/o catabolizado) más rápido que un anticuerpo bivalente por una célula que expresa un antígeno al que se unen los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos multivalentes (que son distintos a los de la clase IgM) con tres o más sitios de unión al antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetraivalentes), que se pueden producir fácilmente mediante expresión recombinante de ácido nucleico que codifica para las cadenas polipeptídicas del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión al antígeno. El dominio de dimerización preferido comprende (o consiste en) una región Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión al antígeno amino-terminales a la región Fc. El anticuerpo multivalente preferido de la presente memoria comprende (o consiste en) tres a aproximadamente ocho, pero preferiblemente cuatro, sitios de unión al antígeno. El anticuerpo multivalente comprende al menos una cadena polipeptídica (y preferiblemente dos cadenas polipeptídicas), en el que la cadena(s) de polipéptido comprende dos o más dominios variables. Por ejemplo, la cadena(s) de polipéptido puede comprender VD1-(X1)n-VD2-(X2)n-Fc, en el que VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena de polipéptido de

55

60

65

una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o polipéptido y n es 0 o 1. Por ejemplo, la cadena(s) de polipéptido puede comprender: cadena de la región VH-CH1-enlazador flexible-VH-CH1-Fc o cadena de la región VH-CH1-VH-CH1-Fc. El anticuerpo multivalente de la presente memoria comprende además preferiblemente al menos dos (y preferiblemente cuatro) polipéptidos del dominio variable de cadena ligera. El anticuerpo multivalente de la presente memoria puede comprender, por ejemplo, de aproximadamente dos a aproximadamente ocho polipéptidos del dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos del dominio variable de cadena ligera contemplados aquí comprenden un dominio variable de cadena ligera y, opcionalmente, comprenden además un dominio CL.

## 8. Diseño de la función efectora

Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, por ejemplo, con el fin de aumentar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA) y/o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. Esto puede conseguirse introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Alternativa o adicionalmente, se pueden introducir resto(s) de cisteína en la región Fc, permitiendo de ese modo la formación de enlaces disulfuro entre cadenas en esta región. El anticuerpo homodimérico así generado puede tener una capacidad de internalización mejorada y/o una mayor destrucción celular mediada por el complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA). Véase Caron *et al.* (1992) J. Exp Med. 176:1191-1195 y Shopes, B. J. (1992) Immunol. 148:2918-2922. Los anticuerpos homodiméricos con actividad antitumoral mejorada también pueden prepararse usando reticuladores heterobifuncionales tal como se describe en Wolff *et al.* (1993) Cancer Res. 53:2560-2565. Como alternativa, un anticuerpo puede diseñarse de modo que tenga regiones Fc duales y de ese modo tener unas capacidades mayores de lisis por el complemento y de CCDA. Véase Stevenson *et al.* (1989) Anti-Cancer Drug Design 3:219-230.

Para aumentar la semivida sérica del anticuerpo, se puede incorporar un epítipo de unión al receptor silvestre en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) como se describe, por ejemplo, en la Patente US-5.739.277. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "epítipo de unión al receptor silvestre" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) que es responsable de aumentar la semivida sérica *in vivo* de la molécula de IgG.

## 9. Inmunoconjugados

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

Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de dichos inmunoconjugados se han descrito anteriormente. Las toxinas enzimáticamente activas y los fragmentos de las mismas que se pueden utilizar incluyen la cadena A de la toxina de la difteria, fragmentos activos no enlazantes de la toxina de la difteria, cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena A de la ricina, cadena A de la abrina, cadena A de la modeccina, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina y los tricotecenos. Existen diversos radionucleidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Los ejemplos incluyen <sup>212</sup>Bi, <sup>131</sup>I, <sup>131</sup>In, <sup>90</sup>Y y <sup>186</sup>Re. Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se preparan usando varios agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo, HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)etilendiamina), diisocianatos (tales como toluen 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta *et al.* (1987) Science 238:1098. El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilen triaminopentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono-14 es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de radionucleótidos al anticuerpo (Véas el documento WO 94/11026).

Los conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como calicheamicina, maitansinoides, un tricoteno y CC1065 y los derivados de estas toxinas que tienen actividad toxina, también se contemplan en la presente memoria.

### i. Maitansina y maitansinoides

En una realización preferida, un anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> (longitud completa o fragmentos) de la invención se conjuga a una o más moléculas de maitansinoide.

Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de la tubulina. La maitansina se aisló por primera vez del arbusto del este de África *Maytenus serrata* (Patente US-3.896.111). Posteriormente, se

descubrió que ciertos microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres C-3 de maitansinol (Patente US-4.151.042). El maitansinol sintético y derivados y análogos del mismo se divulgan, por ejemplo, en las Patentes US-4.137.230; US-US-4.248.870; US-4.256.746; US-4.260.608; US-4.265.814; US-4.294.757; US-4.307.016; US-4.308.268; US-4.308.269; US-4.309.428; US-4.313.946; US-4.315.929; US-4.317.821; 5 US-4.322.348; US-4.331.598; US-4.361.650; US-4.364.866; US-4.424.219; US-4.450.254; US-4.362.663 y US-4.371.533.

En un intento por mejorar su índice terapéutico, la maitansina y los maitansinoides se han conjugado a anticuerpos que se unen específicamente a antígenos de células tumorales. Los inmunoconjugados que contienen 10 maitansinoides y su uso terapéutico se divulgan, por ejemplo, en las Patentes US-5.208.020, US-5.416.064 y en la Patente Europea EP 0 425 235 B1. Liu *et al.* (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93: 8618-8623 describieron inmunoconjugados que comprenden un maitansinoide denominado DM1 vinculado al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra el cáncer colorrectal humano. Se observó que el conjugado era altamente citotóxico hacia las células del cáncer de colon cultivadas y mostró actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento tumoral *in vivo*. Chari *et al.* (1992) Cancer Res. 52:127-131 describe inmunoconjugados en los que un maitansinoide se conjugaba a través 15 de un enlazador disulfuro al anticuerpo murino A7 que une un antígeno en líneas celulares de cáncer de colon humano, o a otro anticuerpo monoclonal murino TA.1 que se une al oncogén HER-2/neu. La citotoxicidad del conjugado TA.1-maitansinoide se ensayó *in vitro* en la línea celular de cáncer de mama humano SK-BR-3, que expresa  $3 \times 10^5$  de antígenos de superficie HER-2 por célula. El conjugado del fármaco lograba un grado de citotoxicidad similar al del fármaco maitansinoide libre, la cual se podía aumentar aumentando el número de 20 moléculas de maitansinoide por molécula de anticuerpo. El conjugado A7-maitansinoide mostró baja citotoxicidad sistémica en ratones.

Los conjugados de anticuerpo anti-Hhip1<sub>812</sub>-maitansinoide se preparan mediante la unión química de un anticuerpo anti-Hhip1<sub>812</sub> a una molécula maitansinoide sin disminuir significativamente la actividad biológica ni del anticuerpo ni de la molécula maitansinoide. Se ha demostrado que un promedio de 3-4 moléculas de maitansinoide conjugadas por molécula de anticuerpo es eficaz para mejorar la citotoxicidad de células diana sin afectar negativamente a la función o solubilidad del anticuerpo, aunque incluso cabría esperar que una molécula de toxina/anticuerpo mejorase la citotoxicidad respecto al uso del anticuerpo desnudo. Los maitansinoides son bien conocidos en la técnica y se 30 pueden sintetizar mediante técnicas conocidas o aislarse de fuentes naturales. Maitansinoides adecuados se divulgan, por ejemplo, en la Patente US-5.208.020 y en las otras patentes y publicaciones que no son patentes referidas anteriormente en la presente memoria. Maitansinoides preferidos son maitansinol y análogos de maitansinol modificados en el anillo aromático o en otras posiciones de la molécula de maitansinol, tales como diversos ésteres de maitansinol.

Existen muchos grupos de enlace conocidos en la técnica para la fabricación de conjugados anticuerpo-maitansinoide, incluyendo, por ejemplo, los divulgados en la Patente US-5.208.020 o en la Patente EP 0425235B1, Chari *et al.* (1992) Cancer Res. 52:127-131 y la Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.º 10/960.602, presentada el 8 de octubre de 2004. Los conjugados anticuerpo-maitansinoide que comprenden el componente 40 enlazador SMCC se pueden preparar como se divulga en Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.º 10/960,602, presentada el 8 de octubre de 2004. Los grupos de enlace incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles de peptidasa o grupos lábiles de esterasa, como se divulga en las patentes identificadas anteriormente, siendo preferidos los grupos disulfuro y tioéter. Grupos de unión adicionales se describen y se ilustran en la presente memoria.

Los conjugados del anticuerpo y el maitansinoide se pueden fabricar utilizando varios agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de etilo, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como dimetil adipimidato HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5 difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Agentes de acoplamiento particularmente preferidos incluyen propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio) (SPDP) (Carlsson *et al.* (1978) Biochem. J. 173:723-737) y N-succinimidil-4-(2-piridilditio)-pentanoato (SPP) para proporcionar un enlace disulfuro. 55

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

## ii. Auristatinas y dolastatinas

En algunas realizaciones, el inmunoconjugado comprende un anticuerpo de la invención conjugado con dolastatinas o análogos peptídicos y derivados de dolastatina, las auristatinas (Patentes US-5.635.483 y US- 5.780.588). Las 65

dolastatinas y las auristatinas han demostrado interferir con la dinámica de los microtúbulos, la hidrólisis del GTP y la división nuclear y celular (Woyke *et al* (2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12): 3580-3584) y tienen contra el cáncer (Patente US-5.663.149) y actividad antifúngica (Pettit *et al.* (1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 2961-2965). La fracción farmacológica dolastatina o auristatina puede estar unida al anticuerpo a través del extremo N (amino) terminal o el extremo C terminal (carboxilo) de la fracción farmacológica peptídica (WO 02/088172).

Ejemplos de realizaciones de auristatina incluyen los restos del fármaco monometilauristatina DE y DF unidos al extremo N-terminal (es decir, MMAE y MMAF), divulgado en Senter *et al.*, *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, Volumen 45, Número 623 Resumen, presentado 28 de marzo de 2004.

Generalmente, los restos de fármacos basados en péptidos se pueden preparar mediante la formación de un enlace peptídico entre dos o más aminoácidos y/o fragmentos de péptidos. Tales enlaces peptídicos pueden prepararse, por ejemplo, de acuerdo con el método de síntesis en fase líquida (véase E. Schröder y K. Lübke, *THE PEPTIDES*, volumen I, pp 76-136, 1965, Academic Press) que es bien conocido en el campo de la química de péptidos. Los restos del fármaco auristatina/dolastatina pueden prepararse según los métodos de: Patente US-5635.483; Patente US- 5.780.588; Pettit *et al.* (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:5463-5465; Pettit *et al.* (1998) *Anticancer Drug Design* 13:243-277; Pettit, G. R., *et al.* (1996) *Synthesis* 6:719-725; Pettit *et al* (1996) *J. Chem. Soc. Perkin Trans.1* 5: 859-863 y Doronina (2003) *Nat. Biotechnol.* 21(7):778-784.

### iii. Calicheamicina

Otro inmunoconjugado de interés comprende un anticuerpo anti-Hhip<sub>1β12</sub> conjugado con una o más moléculas de calicheamicina. La familia de antibióticos de la calicheamicina son capaces de producir roturas en el ADN bicatenario en concentraciones sub-picomolar. Para la preparación de conjugados de la familia de la calicheamicina, véase las Patentes US-5.712.374; US-5.714.586, US-5.739.116; US-5.767.285; US-5.770.701; US-5.770.710; US-5.773.001; US-5.877.296 (todas ellas de American Cyanamid Company). Entre los análogos estructurales de calicheamicina que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, γ1I, α2I, α3I, N-acetil-γ1I, PSAG y θ11 (Hinman *et al.* (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342; Lode *et al.* (1998) *Cancer Res.* 58:2925-2928 y las patentes de Estados Unidos antes mencionadas concedidas a American Cyanamid). Otro fármaco antitumoral que se puede conjugar con el anticuerpo es QFA que es un antifolato. Tanto la calicheamicina como QFA tienen sitios de acción intracelulares y no atraviesan fácilmente la membrana plasmática. Por lo tanto, la absorción celular de estos agentes a través de la internalización mediada por anticuerpos mejora enormemente sus efectos citotóxicos.

### iv. Otros agentes citotóxicos

Otros agentes antitumorales que pueden conjugarse con los anticuerpos anti-Hhip<sub>1β12</sub> de la invención incluyen BCNU, estreptozoicina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocidos colectivamente como complejo LL-E33288 descrito en las Patentes US-5.053.394; US-5.770.710, así como esperamicinas (Patente US-5.877.296).

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

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

Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radioactivo. Existe varios isótopos radiactivos para la producción de anticuerpos anti-Hhip<sub>1β12</sub> radioconjugados. Ejemplos incluyen <sup>211</sup>At, <sup>131</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>90</sup>Y, <sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re, <sup>153</sup>Sm, <sup>212</sup>Bi, <sup>32</sup>P, <sup>212</sup>Pb y los isótopos radiactivos de Lu. Cuando se utiliza el conjugado para el diagnóstico, este puede comprender un átomo radioactivo para estudios de centelleo, por ejemplo <sup>99m</sup>Tc o <sup>123</sup>I o un marcador de espín para resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como imagen por resonancia magnética), tal como yodo-123 de nuevo, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno 15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

El marcador radiactivo u otros marcadores pueden incorporarse en el conjugado según los métodos conocidos. Por ejemplo, el péptido se puede biosintetizar o se puede sintetizar mediante síntesis química de aminoácidos usando precursores de aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Los marcadores tales como <sup>99m</sup>Tc o <sup>123</sup>I, <sup>156</sup>Re, <sup>188</sup>Re e <sup>111</sup>In pueden unirse a través de un resto de cisteína al péptido. El itrio-90 se puede unirse a través de un resto de lisina. El método IODOGEN (Fraker *et al.* (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80:49-57 se puede utilizar para incorporar yodo-123. MONOCLONAL ANTIBODIES IN IMMUNOSCINTIGRAPHY, Chatal, CRC Press, 1989 describe otros métodos en detalle.

Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se pueden preparar utilizando varios agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como adipimidato de dimetilo, HCl), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis-(p-azidobenzoil) hexanodiamina, derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como tolueno 2, 6-diisocianato) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Por ejemplo, se puede preparar una inmunotoxina de ricina como se describe en Vitetta *et al.*, (1987) Science, 238:1098. El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentiainpentaacético marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de un radionucleótido al anticuerpo. Véase el documento WO 94/11026. El enlazador puede ser un "enlazador escindible" que facilita la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, se puede usar un enlazador lábil a ácidos, un enlazador sensible a peptidasas, un enlazador fotolábil, un enlazador de dimetilo o un enlazador que contiene disulfuro (Chari *et al.*, Cancer Res. 52:127-131 (1992); Patente US-5.208.020.

Los compuestos de la invención contemplan expresamente, pero no se limitan a, ADC preparado con reactivos reticulantes: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC y sulfo-SMPB y SVSB (succinimidil-(4-vinilsulfona)benzoato) que están comercializados (por ejemplo, en Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., Estados Unidos, ver páginas 467-498 del Manual de Aplicaciones y Catálogo 2003-2004).

Como alternativa, se puede producir una proteína de fusión que comprende el anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> y el agente citotóxico, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o de síntesis de péptidos. La longitud del ADN puede comprender regiones respectivas que codifican las dos partes del conjugado ya sea adyacentes entre sí o separadas por una región que codifica un péptido enlazador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

En otra realización más, el anticuerpo se puede conjugar con un "receptor" (tal como estreptavidina) para la utilización en el tumor antes de la selección en el que el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de la eliminación del conjugado no unido de la circulación utilizando un agente de aclaramiento y la administración posterior de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

## 10. Inmunoliposomas

Los anticuerpos anti-Hhip1<sub>β12</sub> divulgados en la presente memoria también pueden formularse como inmunoliposomas. Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta de varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensoactivo que es útil para la administración de un fármaco a un mamífero. Los componentes del liposoma se disponen comúnmente en una formación de bicapa, similar a la disposición de los lípidos de las membranas biológicas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos en Epstein *et al.* (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688; Hwang *et al.* (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030; Patentes US-4.485.045 y US-4.544.545 y el documento WO 97/38731 publicado el 23 de octubre de 1997. Los liposomas con mayor tiempo de circulación se divulgan en Patente US-5.013.556.

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

## B. Oligopéptidos de unión a Hhip1

Los oligopéptidos de unión a Hhip1 pueden sintetizarse químicamente usando la metodología de síntesis de oligopéptidos conocida o se pueden preparar y purificar utilizando tecnología recombinante. Ciertos oligopéptidos Hhip1<sub>β12</sub> se describen en detalle en la presente memoria. Otros oligopéptidos Hhip1<sub>β12</sub> pueden ser identificados sin excesiva experimentación usando técnicas bien conocidas. En este sentido, se observa que las técnicas para el cribado de bibliotecas de oligopéptidos en busca de oligopéptidos que son capaces de unirse específicamente a un polipéptido diana son bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Patentes US-5.556.762; US-5.750.373; US-4.708.871; US-4.833.092; US-5.223.409; US-5.403.484; US-5.571.689; US-5.663.143; Publicaciones PCT WO 84/03506 y WO 84/03564; Geysen *et al.* (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3998-4002; Geysen *et al.* (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:178-182; Geysen *et al.*, en SYNTHETIC PEPTIDES AS ANTIGENS, Portland, R. and Whelan J., Eds., John Wiley, Chichester, 130-149 (1986); Geysen *et al.* (1987) J. Immunol. Meth. 102:259-274; Schoufs *et al.* (1988) J. Immunol, 140:611-616, Cwirla, S. E. *et al.* (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6378; Lowman, H.B. *et al.* (1991) Biochemistry 30:10832; Clackson, T. *et al.* (1991) Nature 352:624; Marks, J. D. *et al.* (1991) J. Mol. Biol. 222:581; Kang, A.S. *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8363 y Smith, G.P. (1991)

Current Opin. Biotechnol. 2:668).

En este sentido, la expresión en bacteriófagos (fagos) es una técnica bien conocida que permite cribar bibliotecas de oligopéptidos grandes para identificar miembro(s) de las bibliotecas que son capaces de unirse específicamente a un polipéptido diana. La expresión en fagos es una técnica mediante la cual los polipéptidos variantes se muestran como proteínas de fusión con la proteína de la cubierta en la superficie de las partículas de bacteriófago (Scott, J. K. y Smith, G.P. (1990) *Science* 249: 386). La utilidad de la expresión en fagos radica en el hecho de que grandes bibliotecas de variantes de proteínas selectivamente aleatorizadas (o ADNc clonados aleatoriamente) se pueden clasificar de manera rápida y eficiente para aquellas secuencias que se unen a una molécula diana con alta afinidad. La expresión de bibliotecas de péptidos (Cwirla, S.E. *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6378) o proteínas (Lowman, H.B. *et al.* (1991) *Biochemistry* 30:10832; Clackson, T. *et al.* (1991) *Nature*, 352:624; Marks, J.D. *et al.* (1991), *J. Mol. Biol.* 222:581; Kang, A.S. *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8363) en un fago se ha utilizado para el cribado de millones de polipéptidos u oligopéptidos en busca de aquellos con propiedades de unión específicas (Smith, G. P. (1991) *Current Opin. Biotechnol.* 2:668). La clasificación de bibliotecas de fagos de mutantes aleatorios requiere una estrategia para construir y propagar un gran número de variantes, un procedimiento para la purificación mediante afinidad utilizando el receptor diana y un medio de evaluación de los resultados de los enriquecimientos de la unión. Patentes US-5.223.409; US-5.403.484; US-5.571.689 y US-5.663.143.

Aunque la mayoría de los métodos de expresión en fagos han utilizado fagos filamentosos, también son conocidos los sistemas de expresión en fagos lambdaoides (WO 95/34683; Patente US-5.627.024), los sistemas de expresión en el fago T4 (Ren *et al.* (1998) *Gene* 215:439; Zhu *et al.* (1998) *Cancer Res.* 58(15):3209-3214; Jiang *et al.* (1997) *Inf. Immun.* 65(11):4770-4777; Ren *et al.* (1997) *Gene* 195(2):303-311; Ren (1996) *Protein Sci.* 5:1833; Efimov *et al.* (1995) *Virus Genes* 10:173) y los sistemas de expresión en el fago T7 (Smith and Scott (1993) *Meth. Enzymol.* 217:228-257 y en la Patente US-5.766.905).

Se han desarrollado muchas otras mejoras y variaciones del concepto básico de expresión en fagos. Estas mejoras aumentan la capacidad de los sistemas de expresión para cribar bibliotecas de péptidos para unirse a moléculas diana seleccionadas y para mostrar proteínas funcionales con el potencial de detectar estas proteínas en cuanto a las propiedades deseadas. Se han desarrollado dispositivos de reacción combinatoria para las reacciones de expresión en fagos (WO 98/14277) y las bibliotecas de expresión en fagos se han utilizado para analizar y controlar las interacciones bimoleculares (WO 98/20169; WO 98/20159) y las propiedades de péptidos helicoidales restringidos (WO 98/20036). El documento WO 97/35196 describe un método para aislar un ligando de afinidad en el que se pone en contacto una biblioteca de expresión en fagos con una solución en la que el ligando se unirá a una molécula diana y una segunda solución en la que el ligando de afinidad no se unirá a la molécula diana, para aislar selectivamente los ligandos de unión. El documento WO 97/46251 describe un método de bioadsorción de una biblioteca de expresión en fagos aleatoria con un anticuerpo purificado por afinidad y el aislamiento posterior del fago de unión, seguido de un proceso de microadsorción usando los pocillos de la microplaca para aislar el fago de unión de alta afinidad. También se ha descrito el uso de la proteína A de *Staphylococcus aureus* como etiqueta de la afinidad (Li *et al.* (1998) *Mol. Biotech.* 9:187). El documento WO 97/47314 describe el uso de bibliotecas de sustracción de sustrato para distinguir las especificidades de la enzima utilizando una biblioteca combinatoria que puede ser una biblioteca de expresión en fagos. Un método para seleccionar enzimas adecuadas para su uso en detergentes utilizando la expresión en fagos se describe en el documento WO 97/09446. Otros métodos de selección de proteínas de unión específicas se describen en las Patentes US-5.498.538; US-5.432.018 y en el documento WO 98/15833.

Los métodos para generar bibliotecas de péptidos y cribado de estas bibliotecas también se divulgan en las Patentes US-5.723.286; US-5.432.018; US-5.580.717; US-5.427.908; US-5.498.530; US-5.770.434; US-5.734.018; US-5.698.426; US-5.763.192 y 5.723.323.

### C. Oligopéptidos que imitan al bucle L2 de Hhip1<sub>β12</sub>

En ciertas realizaciones, los oligopéptidos Hhip1<sub>β12</sub> se basan en el bucle L2 de Hhip1. (SEC ID N°: 54). El bucle L2 de Hhip1<sub>β12</sub> es la porción que se une a Hedgehog y que contiene restos que se conservan con una parte análoga de Ptch que también se une a Hedgehog. Por lo tanto, la invención proporciona oligopéptidos basados en la secuencia de aminoácidos del bucle L2 del dominio de la hélice β de Hhip1 que interactúa con Hedgehog. Estos oligopéptidos se pueden expresar en sistemas recombinantes o sintetizarse químicamente por cualquier método conocido en la técnica. Los oligopéptidos pueden ser lineales o pueden hacerse cíclicos. Los oligopéptidos son generalmente de al menos 8 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, los oligopéptidos tienen entre 9 y 21 aminoácidos de longitud, incluyendo realizaciones que tienen 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 21 aminoácidos de longitud.

Los oligopéptidos de la invención comprenden al menos la siguiente secuencia de aminoácidos:

[1/I/V] XXXX [H/L] X [D/E/N] X [D/S/E] G [L/1] (SEC ID N°: 39)

En la que X puede ser cualquier aminoácido y el aminoácido entre paréntesis representa los aminoácidos alternativos para esa posición. Preferiblemente, el aminoácido en la posición X es uno que es o bien idéntico a, o es una sustitución conservadora del aminoácido en esa posición del bucle L2 de Hhip1. Ejemplos de algunos oligopéptidos incluyen:

5

IXXXX [H/L] X [D/E/N] X [D/S/E] G [L/I]	(SEC ID N°: 56)
LXXXX [H/L] X [D/E/N] X [D/S/E] G [L/I]	(SEC ID N°: 57)
IXXXXMX [D/E/N] X [D/S/E] G [L/I]	(SEC ID N°: 58)
LXXXXLX [D/E/N] X [D/S/E] G [L/I]	(SEC ID N°: 59)
IXXXXMXEX [D/S/E] G [L/I]	(SEC ID N°: 60)
LXXXXLXDX [D/S/E] G [L/I]	(SEC ID N°: 61)
IXXXXMXEXDG [L/I]	(SEC ID N°: 62)
LXXXXLXDXDG [L/I]	(SEC ID N°: 63)
LXXXXLXDXSG [L/I]	(SEC ID N°: 64)
LXXXXLXDXEG [L/I]	(SEC ID N°: 65)
IXXXXMXEXDGL	(SEC ID N°: 66)
LXXXXLXDXDGL	(SEC ID N°: 67)
LXXXXLXDXSGL	(SEC ID N°: 68)
LXXXXLXDXEGL	(SEC ID N°: 69)
LXXXXLXDXDGI	(SEC ID N°: 70)
LXXXXLXDXSGI	(SEC ID N°: 71)
LXXXXLXDXEGI	(SEC ID N°: 72)

En la que X puede ser cualquier aminoácido, pero preferiblemente uno que es o bien idéntico a, o es una sustitución conservadora del aminoácido en esa posición del bucle L2 de Hhip1 o Ptch. Ejemplos de algunos oligopéptidos incluyen:

10

ITLDDMEEMDGL	(SEC ID N°: 73)
LTKQRLVDADGI	(SEC ID N°: 74)
LTRKLVLDREGL	(SEC ID N°: 75)
LLTNRLVNSDGI	(SEC ID N°: 76)
LTRKLVLDKEGL	(SEC ID N°: 77)

En la que X puede ser cualquier aminoácido, pero preferiblemente es uno que es o bien idéntico a, o es una sustitución conservadora del aminoácido en esa posición del bucle L2 de Hhip1 o Ptch.

15

Ejemplos específicos de oligopéptidos de bucle L2 incluyen los siguientes (enumerados con su fuente y la región básica de la SEC ID N°: 39 sombreada), por ejemplo:

MITLDDMEEMDGLSDFTG	(Bucle L2 de Hhip1 humana) (SEC ID N°: 7)
MITLDDMEEMDGLSDFTG	(Bucle L2 de Hhip1 de macaco) (SEC ID N°: 25)
MITLDDMEEMDGLSDFTG	(Bucle L2 de Hhip1 de chimpancé) (SEC ID N°: 26)
MITLDDMEEMDGLSDFTG	(Bucle L2 de Hhip1 de caballo) (SEC ID N°: 27)
MITLDDMEEMDGLSDFTG	(Bucle L2 de Hhip1 de zarigüeya) (SEC ID N°: 28)
MITLDDMEEMDGLSDFTG	(Bucle L2 de Hhip1 de ratón) (SEC ID N°: 29)
MITLDDMEEMDGLSDFTG	(Bucle L2 de Hhip1 de ganado) (SEC ID N°: 30)
MITLDDMEEMDGLSDFTG	(Bucle L2 de Hhip1 de perro) (SEC ID N°: 31)
MITLDDMEEMDGLSDFTG	(Bucle L2 de Hhip1 de rata) (SEC ID N°: 32)
MITLDDMEEMDGLSDFTG	(Bucle L2 de Hhip1 de <i>Platypus</i> ) (SEC ID N°: 33)
MITLDDMEEMDGLSDFTG	(Bucle L2 de Hhip1 de <i>Fugu</i> ) (SEC ID N°: 34)
MITLDDMEEMDGLSDFTG	(Bucle L2 de Hhip1 de <i>Tetraodon</i> ) (SEC ID N°: 35)
MITLDDMEEMDGLSDFTG	(Bucle L2 de Hhip1 de pez cebra) (SEC ID N°: 36)
MITLDDMEEMDGLSDFTG	(Bucle L2 de Hhip1 de pollo) (SEC ID N°: 37)
MITLDDMEEMDGLSDFTG	(Bucle L2 de Hhip1 de rana) (SEC ID N°: 38)
ITLDDMEEMDGISD	(Bucle L2 de Hhip1 humana) (SEC ID N°: 55)
GCGMITLDDMEEMDGLSDFCG	(Péptido con puentes disulfuro derivado del Bucle L2 de Hhip1 humana) (SEC ID N°: 54)

En otras realizaciones, los oligopéptidos de la invención comprenden al menos la siguiente secuencia de aminoácidos:

LVXXXGXIX	(SEC ID N°: 78)
-----------	-----------------

En la que X puede ser cualquier aminoácido, pero preferiblemente es uno que es o bien idéntico a, o es una sustitución conservadora del aminoácido en esa posición del bucle L2 de Ptch. Ejemplos de algunos oligopéptidos

25

incluyen:

LVDXXGXIX	(SEC ID N°: 79)
LVDAXGXIN	(SEC ID N°: 80)
LVDAXGXINP	(SEC ID N°: 81)
LVDADGIINP	(SEC ID N°: 82)

5 Ejemplos específicos, pero no limitantes, de oligopéptidos de bucle L2 incluyen, por ejemplo, los siguientes (enumerados con su fuente y la secuencia de bases de la SEC ID N°: 78) sombreada).

QLTKQRLVDADGIINPSA	(Bucle L2 de Ptch humana) (SEC ID N°: 17)
QLTKQRLVDADGIINPSA	(Bucle L2 de Ptch de ratón) (SEC ID N°: 18)
QLTKQRLVDADGIINPNA	(Bucle L2 de Ptch de pollo) (SEC ID N°: 19)
QLTSRRLVDGDGLIPPEV	(Bucle L2 de Ptch de pez de cebra) (SEC ID N°: 20)
LVLNRLVNSDGIINQRA	(Bucle L2 de Ptch de <i>Drosophila</i> ) (SEC ID N°: 21)
RVGKIRLVDASGIINSDG	(Bucle L2 de Ptch de <i>C. elegans</i> ) (SEC ID N°: 22)
QLTTRKLV DREGLIPPEL	(Bucle L2 de Ptc2h humana) (SEC ID N°: 23)
QLTTRKLV DKEGLIPPEL	(Bucle L2 de Ptc2 de ratón) (SEC ID N°: 24)
GCQLTKQRLVDADGIINPCG	(Péptido con puentes disulfuro derivado del Bucle L2 de Ptc2 humana) (SEC ID N°: 53)

10 Aunque sin desear estar ligado por ninguna teoría particular de operabilidad, los oligopéptidos de la invención están diseñados para imitar el bucle L2 de Hhip1 y/o Ptch, y por lo tanto, interactúan con Hedgehog. Los oligopéptidos de la invención son útiles para la unión a Hedgehog y de ese modo inhiben la unión de Hedgehog a los receptores de Ptch y Hhip1 en la superficie de células, tales como las células cancerosas. Por lo tanto, inhiben o detienen el crecimiento de las células sensibles a Hedgehog (por ejemplo, las células cancerosas).

15 Los péptidos de la invención también son útiles como antígenos en la generación de anticuerpos específicos del bucle L2. Tales anticuerpos pueden unirse a Hhip1 y/o Ptch nativas y evitan la unión de Hedgehog a estos receptores (sin estimular los propios receptores) e inhiben o detienen el crecimiento de células sensibles a Hedgehog (por ejemplo, células cancerosas). Además, los anticuerpos anti-idiotípicos contra los anticuerpos anti-bucle L2 se pueden preparar de modo que imiten el bucle L2 de Hhip1 o Ptch y, por lo tanto, se unirían a Hedgehog. Tales anticuerpos también son útiles en la prevención de la unión de Hedgehog a Ptch o Hhip1 e inhiben o detienen el crecimiento de células sensibles a Hedgehog. Estos anticuerpos son útiles en el tratamiento de cánceres relacionados con Hedgehog.

25 Como alternativa, en algunas formas de realización, los anticuerpos anti-L2 específicos son útiles como agonistas de la señalización de Hedgehog y pueden ser útiles como agonistas de Hedgehog en aplicaciones tales como, por ejemplo, la regulación del crecimiento de los tejidos neuronales, formación y reparación del hueso y el cartílago, regulación de la espermatogénesis, regulación del músculo liso, regulación de los pulmones, hígado y otros órganos derivados del intestino primitivo, regulación de la función hematopoyética y regulación del crecimiento de la piel y el cabello.

#### 30 **D. Cribado de anticuerpos anti-Hhip1<sub>β12</sub> y oligopéptidos Hhip1 con las propiedades deseadas**

Las técnicas para generar anticuerpos y oligopéptidos que se unen a polipéptidos Hhip1 se han descrito anteriormente. Se puede seleccionar además anticuerpos, oligopéptidos u otras moléculas orgánicas con ciertas características biológicas, según se desee.

35 Los efectos inhibidores del crecimiento pueden determinarse mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, usando células que expresan un polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> ya sea endógenamente o después de la transfección con el gen de Hhip1<sub>β12</sub>. Por ejemplo, líneas de células tumorales apropiadas y células transfectadas con Hip pueden tratarse con un anticuerpo monoclonal anti-Hhip1<sub>β12</sub>, oligopéptido Hhip1<sub>β12</sub> u otra molécula orgánica Hhip1<sub>β12</sub> en varias concentraciones durante unos días (por ejemplo, 2-7) días y teñirse con violeta cristal o MTT o analizarse mediante algún otro ensayo colorimétrico. Otro método de medir la proliferación sería mediante la comparación de la absorción de <sup>3</sup>H-timidina por las células tratadas en presencia o ausencia de un anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub>, oligopéptido Hhip1<sub>β12</sub> o molécula orgánica Hhip1<sub>β12</sub>. Después del tratamiento, las células se recogen y se cuantifica la cantidad de radiactividad incorporada en el ADN en un contador de centelleo. Los controles positivos apropiados incluyen el tratamiento de una línea celular seleccionada con un anticuerpo inhibidor del crecimiento conocido por inhibir el crecimiento de esa línea celular. La inhibición del crecimiento de células tumorales *in vivo* se puede determinar de varias maneras conocidas en la técnica. Preferiblemente, la célula tumoral es una que sobreexpresa un polipéptido Hhip1. Preferiblemente, el anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub>, oligopéptido Hhip1<sub>β12</sub> o molécula orgánica Hhip1<sub>β12</sub> inhibirá la proliferación celular de una célula tumoral que expresa Hip *in vitro* o *in vivo* en aproximadamente 25-100 % en comparación con la célula tumoral no tratada, más preferiblemente, en aproximadamente 30-100 %, e incluso más preferiblemente en aproximadamente 50-100 % o 70-100 %, en una realización, a una concentración de anticuerpo de aproximadamente 0,5 a 30 µg/ml. La inhibición del crecimiento se puede medir a una concentración de

anticuerpo de aproximadamente 0,5 a 30  $\mu\text{g/ml}$  o aproximadamente 0,5 nM a 200 nM en cultivo celular, donde se determina la inhibición del crecimiento 1-10 días después de la exposición de las células tumorales al anticuerpo. El anticuerpo es inhibidor del crecimiento *in vivo* si la administración del anticuerpo anti-Hhip1 $_{\beta 12}$  a aproximadamente 1  $\mu\text{g/kg}$  a aproximadamente 100  $\text{mg/kg}$  de peso corporal tiene como resultado la reducción del tamaño del tumor o la reducción de la proliferación de células tumorales en aproximadamente 5 días a 3 meses desde la primera administración del anticuerpo, preferiblemente en aproximadamente 5 a 30 días.

Para seleccionar un anticuerpo anti-Hhip1 $_{\beta 12}$ , oligopéptido Hhip1 $_{\beta 12}$  o molécula orgánica Hhip1 $_{\beta 12}$  que induce la muerte celular, se puede evaluar la pérdida de integridad de la membrana según lo indicado mediante, por ejemplo, la absorción de yoduro de propidio (IP), azul tripano o 7AAD en relación al control. Se puede realizar un ensayo de absorción de IP en ausencia de complemento y células efectoras inmunitarias. Las células tumorales que expresan el polipéptido Hhip1 se incuban con medio solo o con medio que contiene el apropiado anticuerpo anti-Hhip1 $_{\beta 12}$  (por ejemplo, aproximadamente 10  $\mu\text{g/ml}$ ), oligopéptido de unión a Hhip1 o molécula orgánica de unión a Hhip1. Las células se incuban durante un período de tiempo de 3 días. Después de cada tratamiento, las células se lavan y se dividen en partes alícuotas en tubos de 12 x 75 con tapa de colador de 35 mm (1 ml por tubo, 3 tubos por grupo de tratamiento) para la eliminación de grupos de células. A continuación se añade IP a los tubos (10  $\mu\text{g/ml}$ ). Las muestras se pueden analizar utilizando un citómetro de flujo FACSCAN<sup>®</sup> y el software FACSCONVERT<sup>®</sup> CellQuest (Becton Dickinson). Aquellos anticuerpos anti-Hhip1, oligopéptidos de unión a Hhip1 o moléculas orgánicas de unión a Hhip1 que inducen niveles estadísticamente significativos de muerte celular, tal como se determina por la absorción de IP, se pueden seleccionar como anticuerpos anti-Hhip1 $_{\beta 12}$ , oligopéptidos de unión a Hhip1 $_{\beta 12}$  o moléculas orgánicas de unión a Hhip1 $_{\beta 12}$ .

Para identificar anticuerpos, oligopéptidos u otras moléculas orgánicas que se unen a un epítipo de un polipéptido Hhip1 unido por un anticuerpo de interés, se puede realizar un ensayo de bloqueo cruzado de rutina, tal como el descrito en ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Este ensayo se puede usar para determinar si un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica se une al mismo sitio o epítipo que un anticuerpo anti-Hhip1 $_{\beta 12}$  conocido. Como alternativa o adicionalmente, se puede llevar a cabo el cartografiado de epítopos por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la secuencia del anticuerpo se puede mutagenizar tal como por barrido de alanina, para identificar restos de contacto. El anticuerpo mutante se ensaya inicialmente para determinar la unión con el anticuerpo policlonal para garantizar el plegamiento apropiado. En un método diferente, los péptidos correspondientes a diferentes regiones de un polipéptido Hhip1 se pueden utilizar en ensayos de competición con los anticuerpos de ensayo o con un anticuerpo de ensayo y un anticuerpo con un epítipo caracterizado o conocido.

### 35 E. Tratamiento con enzimas y profármacos dirigido por anticuerpos (ADEPT)

Los anticuerpos de la presente invención también se pueden utilizar en ADEPT mediante la conjugación del anticuerpo a una enzima activadora del profármaco que convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico peptídico, véase el documento WO 81/01145) en un fármaco anticanceroso activo. Véase, por ejemplo, el documento WO 88/07378 y la Patente US-4.975.278.

El componente enzimático del inmunocombinado útil para ADEPT incluye cualquier enzima capaz de actuar sobre un profármaco de tal manera que lo convierte en su forma citotóxica más activa.

Las enzimas que son útiles incluyen, pero no se limitan a, fosfatasa alcalina útil para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasa útil para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina desaminasa útil para convertir la 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco anti-canceroso, 5-fluorouracilo; proteasas, tales como proteasa de *Serratia*, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes D-aminoácidos; enzimas que escinden carbohidratos, tales como  $\beta$ -galactosidasa y neuraminidasa útiles para convertir profármacos glicosilados en fármacos libres;  $\beta$ -lactamasa útil para convertir fármacos derivatizados con beta-lactamas en fármacos libres y penicilina amidasa, tales como penicilina V amidasa o penicilina G amidasa, útiles para convertir fármacos derivatizados en sus nitrógenos de amina con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Como alternativa, los anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la técnica como "abzimas", pueden utilizarse para convertir los profármacos de la invención en fármacos activos libres (véase, por ejemplo, Massey (1987) Nature 328:457-458). Los conjugados anticuerpo-abzima se pueden preparar tal como se describe en la presente memoria para la liberación de la abzima en una población de células tumorales.

Las enzimas de esta invención pueden unirse covalentemente a los anticuerpos anti-Hhip1 por técnicas bien conocidas en la técnica tales como el uso de los reactivos de reticulación heterobifuncionales descritos anteriormente. Como alternativa, las proteínas de fusión que comprenden al menos la región de unión al antígeno de un anticuerpo de la invención unida a al menos una porción funcionalmente activa de una enzima de la invención puede construirse utilizando técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Neuberger *et al.* (1984) Nature 312:604-608).

## F. Polipéptidos Hhip1<sub>β12</sub> de longitud completa

También se describen las secuencias de nucleótidos recientemente identificadas y aisladas que codifican para los polipéptidos denominados en la presente solicitud como polipéptidos Hhip1<sub>β12</sub>. En particular, se describe ADNc (parcial y de longitud completa) que codifica para varios polipéptidos Hhip1. Las secuencias de nucleótidos que codifican para los polipéptidos de la invención pueden ser determinadas con referencia a la **Fig. 1** que muestra una alineación de la secuencia de ácido nucleico que codifica para Hhip1 y la secuencia de aminoácidos deducida. Además, la SEC ID N°: 83 muestra la secuencia de aminoácidos de Hhip1<sub>β12</sub> de longitud completa y la SEC ID N°: 52 muestra la secuencia del ADNc de Hhip1 humana. Los fragmentos más pequeños de Hhip1<sub>β12</sub> pueden estar codificados por cualquier secuencia de polinucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos, pero el ejemplo específico de la secuencia de ácido nucleico proporciona a un experto en la materia al menos una secuencia de referencia

## H. Anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> y variantes del polipéptido Hhip1

Además de los anticuerpos anti-Hhip1<sub>β12</sub> y de los polipéptidos Hhip1<sub>β12</sub> con secuencia de longitud completa y otros polipéptidos Hhip1<sub>β12</sub> descritos en la presente memoria, se contempla que se pueden preparar el anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> y las variantes del polipéptido Hhip1<sub>β12</sub>. El anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> y las variantes del polipéptido Hhip1 se pueden preparar introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN codificante y/o mediante la síntesis del anticuerpo o polipéptido deseado. Los expertos en la técnica apreciarán que los cambios de aminoácidos pueden alterar los procesos post-traduccionales del anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> o del polipéptido Hhip1<sub>β12</sub>, como cambiar el número o posición de sitios de glicosilación o alterar las características de anclaje de la membrana.

Las variaciones en los anticuerpos anti-Hhip1 y polipéptidos Hhip1 descritos en la presente memoria, se pueden preparar, por ejemplo, usando cualquiera de las técnicas y directrices para mutaciones conservadoras y no conservadoras expuestas, por ejemplo, en la Patente US-5.364.934. Las variaciones pueden ser una sustitución, deleción o inserción de uno o más codones que codifican para el anticuerpo o polipéptido que tiene como resultado un cambio en la secuencia de aminoácidos en comparación con el anticuerpo o polipéptido de secuencia nativa. Opcionalmente, la variación es por sustitución de al menos un aminoácido con cualquier otro aminoácido en uno o más de los dominios del anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> o polipéptido Hhip1. La pauta para determinar qué resto de aminoácido puede insertarse, sustituirse o deleccionarse sin afectar adversamente la actividad deseada se puede determinar comparando la secuencia del anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> o del polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> con la de moléculas de proteína homólogas conocidas y minimizando el número de cambios en la secuencia de aminoácidos hechos en regiones de alta homología. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser el resultado de sustituir un aminoácido con otro aminoácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas similares, tales como la sustitución de una leucina con una serina, es decir, las sustituciones de aminoácidos conservadoras. Las inserciones o deleciones pueden estar opcionalmente en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida puede determinarse haciendo sistemáticamente inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia y probando las variantes resultantes para determinar la actividad mostrada por la secuencia nativa madura o de longitud completa.

En la presente memoria se proporcionan el anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> y los fragmentos del polipéptido Hhip1<sub>β12</sub>. Dichos fragmentos pueden estar truncados en el extremo N-terminal o C-terminal, o pueden carecer de restos internos, por ejemplo, cuando se compara con un anticuerpo o proteína nativa de longitud completa. Ciertos fragmentos carecen de restos de aminoácidos que no son esenciales para una actividad biológica deseada del anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> o del polipéptido Hhip1<sub>β12</sub>.

El anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> y los fragmentos de polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> se pueden preparar mediante cualquiera de una serie de técnicas convencionales. Los fragmentos de péptidos deseados pueden sintetizarse químicamente. Un enfoque alternativo implica la generación de fragmentos de anticuerpo o polipéptido mediante digestión enzimática, por ejemplo, tratando la proteína con una enzima conocida que escinde proteínas en sitios definidos por restos de aminoácidos particulares o mediante digestión del ADN con enzimas de restricción adecuadas y aislando el fragmento deseado. Sin embargo, otra técnica adecuada implica el aislamiento y la amplificación de un fragmento de ADN que codifica para un anticuerpo o fragmento de polipéptido deseado, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos que definen los extremos deseados del fragmento de ADN se emplean en los cebadores de 5' y 3' en la PCR. Preferiblemente, el anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> y los fragmentos de polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> comparten al menos una actividad biológica y/o inmunológica con el anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> o el polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> nativo divulgado en la presente memoria.

En realizaciones particulares, las sustituciones conservadoras de interés se muestran en la Tabla 5 bajo el encabezamiento de sustituciones preferidas. Si tales sustituciones tienen como resultado un cambio en la actividad biológica, entonces se introducen más cambios sustanciales, denominados sustituciones ilustrativas en la **Tabla 5**, o como se describe más adelante en referencia a las clases de aminoácidos y se hace un cribado de los productos.

Tabla 5

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

Las modificaciones sustanciales en la función o identidad inmunológica del anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> o del polipéptido Hhip1 se consiguen mediante la selección de sustituciones que difieren significativamente en su efecto de mantener (a) la estructura de la cadena principal del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana o (c) el grueso de la cadena lateral. Los restos naturales se dividen en grupos basándose en las propiedades de las cadenas laterales habituales:

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

Las sustituciones no conservadoras implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otra clase. Tales restos sustituidos también pueden introducirse en los sitios de sustitución conservadora o, más preferiblemente, en los sitios restantes (no conservados).

- 20 Las variaciones se pueden hacer usando métodos conocidos en la técnica tales como mutagénesis mediada por oligonucleótidos (dirigida al sitio), barrido de alanina y mutagénesis de PCR. La mutagénesis dirigida al sitio (Carter *et al.*, (1986) Nucl. Acids Res. 13:4331; Zoller *et al.* (1987) Nucl. Acids Res.10: 6487), la mutagénesis de casete (Wells *et al.* (1985) Gene 34:315), la mutagénesis de selección de restricción (Wells *et al.* (1986) Philos. Trans. R. Soc. London SerA 317: 415) u otras técnicas conocidas pueden realizarse en el ADN clonado para producir el anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> o en el ADN de la variante de polipéptido Hhip1.

- 30 También puede emplearse el análisis de aminoácidos de barrido para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua. Entre los aminoácidos de barrido preferidos se encuentran los aminoácidos relativamente pequeños y neutros. Tales aminoácidos incluyen alanina, glicina, serina y cisteína. La alanina es generalmente un aminoácido de barrido preferido entre este grupo porque elimina la cadena lateral más allá del carbono beta y es menos probable que altere la conformación de la cadena principal de la variante (Cunningham and Wells (1989) Science 244:1081-1085). La alanina también se prefiere en general porque es el aminoácido más común. Además, se encuentra frecuentemente tanto en posiciones enterradas como expuestas (Creighton, THE PROTEINS, W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia (1976) J. Mol. Biol. 150:1). Si la sustitución de alanina no produce  
 35

cantidades adecuadas de la variante, se puede utilizar un aminoácido isotérico.

Cualquier resto de cisteína no implicado en mantener la conformación adecuada del anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> o del polipéptido Hhip1 también puede estar sustituido, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar la reticulación aberrante. A la inversa, se puede añadir un enlace(s) de cisteína al anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> o al polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> para mejorar su estabilidad (particularmente cuando el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fv).

Un tipo particularmente preferido de variante de sustitución implica la sustitución de uno o más restos de la región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). En general, la variante(s) resultante seleccionada para el desarrollo adicional tendrá propiedades biológicas mejoradas en relación con el anticuerpo parental del que se genera. Una manera conveniente de generar tales variantes por sustitución implica la maduración de afinidad utilizando la expresión en fagos. Brevemente, varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) se mutan para generar todas las posibles sustituciones amino en cada sitio. Las variantes del anticuerpo así generadas se expresan de una manera monovalente en partículas de fagos filamentosos como fusiones con el producto del gen III de M13 empaquetado dentro de cada partícula. Las variantes expresadas en fagos se criban a continuación por su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión) como se divulga en la presente memoria. Con el fin de identificar los sitios de la región hipervariable candidatos para la modificación, se puede realizar la mutagénesis de barrido de alanina para identificar restos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión al antígeno. Como alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y el polipéptido Hhip1 humano. Tales restos de contacto y los restos vecinos son candidatos para la sustitución según las técnicas elaboradas en la presente memoria. Una vez generadas dichas variantes, el panel de variantes se somete a cribado tal como se describe en la presente memoria y los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes pueden seleccionarse para un posterior desarrollo.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican para variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> se preparan mediante varios métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, el aislamiento de una fuente natural (en el caso de las variantes de la secuencia de aminoácidos natural) o la preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida al sitio), mutagénesis de PCR y mutagénesis de casete de una variante preparada anteriormente o de una versión no variante del anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub>.

### I. Modificaciones de los anticuerpos anti-Hhip1 y del polipéptido Hhip1<sub>β12</sub>

Las modificaciones covalentes de los anticuerpos anti-Hhip1<sub>β12</sub> y de los polipéptidos Hhip1<sub>β12</sub> se incluyen dentro del alcance de esta invención. Un tipo de modificación covalente incluye la reacción de restos de aminoácidos diana de un anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> o polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o con los restos N- o C- terminales del anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> o del polipéptido Hhip1<sub>β12</sub>. La derivatización con agentes bifuncionales es útil, por ejemplo, para la reticulación del anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> o del polipéptido Hhip1 a una matriz de soporte insoluble en agua o superficie para su uso en el procedimiento para la purificación de anticuerpos anti-Hhip1, y vice-versa. Los agentes de reticulación comúnmente usados incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres de disuccinimidilo tales como 3,3'-ditiobis (succinimidilpropionato), maleimidias bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano y agentes tales como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato.

Otras modificaciones incluyen la desamidación de restos glutaminilo y asparaginilo en los correspondientes restos glutamilo y aspartilo, respectivamente, la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de restos serilo o treonilo, la metilación de los grupos α-amino de las cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (T.E. Creighton, PROTEINS: STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86, 1983), la acetilación de la amina N-terminal y la amidación de cualquier grupo carboxilo C-terminal.

Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> o del polipéptido Hhip1 incluida dentro del alcance de esta invención comprende la alteración del patrón de glicosilación nativo del anticuerpo o del polipéptido. "Alteración del patrón de glicosilación nativo" para los propósitos de la presente memoria significa la eliminación de uno o más restos de carbohidratos que existen en el anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> o polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> de secuencia nativa (ya sea mediante la eliminación del sitio de glicosilación subyacente o suprimiendo la glicosilación por medios químicos y enzimáticos/o) y/o la incorporación de o más sitios de glicosilación que no existen en el anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> o polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> de secuencia nativa. Además, la frase incluye cambios cualitativos en la glicosilación de las proteínas nativas, que implican un cambio en la naturaleza y proporciones de los diversos grupos carbohidrato presentes.

La glicosilación de anticuerpos y de otros polipéptidos está generalmente ligada a N o a O. Ligada a N se refiere a la unión del grupo carbohidrato a la cadena lateral de un resto asparagina. Las secuencias del tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de

reconocimiento para la unión enzimática del grupo carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptidos en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un ácido hidroxiamino, más comúnmente serina o treonina, aunque también se pueden utilizar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> o al polipéptido Hhip1 se consigue convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de forma que contenga una o más de las secuencias de tripéptidos descritas anteriormente (para sitios de glicosilación ligados a N). La alteración también puede hacerse mediante la adición de, o sustitución por, uno o más restos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> o polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> original (para sitios de glicosilación ligados a O). La secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> o del polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> puede alterarse opcionalmente a través de cambios a nivel del ADN, particularmente mutando el ADN que codifica para el anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> o el polipéptido Hhip1 en bases preseleccionadas de tal modo que se generan codones que se traducirán en los aminoácidos deseados.

Otro medio de aumentar el número de grupos carbohidrato en el anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> o en el polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> es mediante el acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al polipéptido. Tales métodos se describen en la técnica, por ejemplo, en el documento WO 87/05330 publicado el 11 de septiembre de 1987 y en Aplin y Wriston, CRC CRIT. REV. BIOCHEM., pp. 259-306, 1981.

La eliminación de los grupos carbohidrato presentes en el anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> o el polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> podría conseguirse química o enzimáticamente o mediante sustitución mutacional de codones que codifican para restos de aminoácidos que sirven como dianas para la glicosilación. Las técnicas de desglicosilación química son conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, por Hakimuddin, *et al.* (1987) Arch. Biochem. Biophys. 259:52 y por Edge *et al.* (1981) Anal. Biochem. 118:131. La escisión enzimática de grupos carbohidrato en los polipéptidos puede lograrse mediante el uso de varias endoglicosidasas y exoglicosidasas como se describe por Thotakura *et al.* (1987) Meth. Enzymol. 138:350.

Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> o del polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> comprende la unión del anticuerpo o del polipéptido a uno de varios polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la manera expuesta en las Patentes US-4.640.835; US-4.496.689; US-4.301.144; US-4.670.417; US-4.791.192 o US-4.179.337. El anticuerpo o polipéptido también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial (por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metacrilato de metilo), respectivamente) en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nano-partículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se describen en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 16ª edición, Oslo, A., Ed., 1980.

El anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> o polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> de la presente invención también se puede modificar de una manera para formar moléculas quiméricas que comprenden un anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> o polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> fusionado a otro polipéptido heterólogo o secuencia de aminoácidos.

En una realización, dicha molécula quimérica comprende una fusión del anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> o polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> con un polipéptido etiqueta que proporciona un epítipo al que puede unirse selectivamente un anticuerpo anti-etiqueta. La etiqueta del epítipo se coloca generalmente en el extremo amino o carboxilo terminal del anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> o del polipéptido Hhip1<sub>β12</sub>. La presencia de tales formas con epítipo etiquetado del anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> o polipéptido Hhip1 pueden detectarse usando un anticuerpo contra el polipéptido etiqueta. También, la provisión de la etiqueta del epítipo permite que el anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> o polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> se purifique fácilmente mediante purificación por afinidad utilizando un anticuerpo anti-etiqueta u otro tipo de matriz de afinidad que se une al epítipo marcado. Varios polipéptidos etiqueta y sus respectivos anticuerpos son bien conocidos en la técnica. Los ejemplos incluyen etiquetas de poli-histidina (poli-his) o poli-histidina-glicina (poli-his-gly); el polipéptido etiqueta HA de la gripe y su anticuerpo 12CA5 (Field *et al.* (1988) Mol. Cell. Biol. 8:2159-2165); la etiqueta c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 contra el mismo (Evan *et al.*, (1985) Mol. Cell. Biol. 5:3610-3616) y la etiqueta glicoproteína D (gD) del virus del herpes simple y su anticuerpo (Paborsky *et al.* (1990) Pro. Engineer. 3(6):547-553). Otros polipéptidos etiqueta incluyen el péptido Flag (Hopp *et al.* (1988) Biotechnology 6:1204-1210); el péptido epítipo KT3 (Martin *et al.* (1992) Science 255:192-194); un péptido epítipo α-tubulina (Skinner *et al.* (1991) J. Biol. Chem. 266:15163-15166) y el péptido etiqueta de la proteína 10 del gen T7 (Lutz-Freyermuth *et al.* (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87:6393-6397).

En una realización alternativa, la molécula quimérica puede comprender una fusión del anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> o polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula quimérica (también denominada "inmuno adhesina"), dicha fusión podría ser con la región Fc de una molécula de IgG. Las fusiones de Ig preferiblemente incluyen la sustitución de una forma soluble (dominio transmembrana eliminado o inactivado) de un anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> o polipéptido Hhip1 en lugar de al menos una región variable dentro de una molécula de Ig. En una realización particularmente preferida, la fusión de inmunoglobulina incluye la bisagra, CH2 y CH3, o la bisagra, regiones CH1, CH2 y CH3 de una molécula de IgG1.

Para la producción de fusiones de inmunoglobulina véase también la Patente US-5.428.130 presentada el 27 de junio de 1995.

## J. Preparación de anticuerpos anti-Hhip1<sub>β12</sub> y polipéptidos Hhip1<sub>β12</sub>

La siguiente descripción se refiere principalmente a la producción de anticuerpos anti-Hhip1<sub>β12</sub> y polipéptidos Hhip1 mediante cultivo de células transformadas o transfectadas con un vector que contiene ácido nucleico que codifica para el anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> y para el polipéptido Hhip1. Esta descripción, por supuesto, contempla que se puedan usar métodos alternativos, que son bien conocidos en la técnica, para preparar anticuerpos anti-Hhip1 y polipéptidos Hhip1. Por ejemplo, se puede producir la secuencia de aminoácidos apropiada, o partes de la misma, mediante síntesis peptídica directa usando técnicas de fase sólida (véase, por ejemplo, Stewart *et al.*, SOLID-PHASE PEPTIDE SYNTHESIS, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, (1963) J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154). La síntesis *in vitro* de proteínas puede realizarse usando técnicas manuales o mediante automatización. La síntesis automatizada puede lograrse, por ejemplo, utilizando el sintetizador de péptidos de Applied Biosystems (Foster City, CA) utilizando las instrucciones del fabricante. Varias partes del anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> o del polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> pueden sintetizarse químicamente por separado y combinarse usando métodos químicos o enzimáticos para producir el deseado anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> o polipéptido Hhip1<sub>β12</sub>.

### 1. Aislamiento del ADN que codifica para el anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> o el polipéptido Hhip1<sub>β12</sub>

El ADN que codifica para el anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> o el polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> puede obtenerse a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido que se cree que posee el ARNm del anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> o el polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> y que se expresa a un nivel detectable. En consecuencia, el ADN humano del anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> o del polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> se puede obtener convenientemente a partir de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido humano. Los genes que codifican para el anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> o polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> también se pueden obtener de una biblioteca genómica o mediante procedimientos sintéticos conocidos (por ejemplo, síntesis automatizada de ácidos nucleicos).

Pueden cribarse bibliotecas con sondas (tales como oligonucleótidos de al menos aproximadamente 20-80 bases) diseñadas para identificar el gen de interés o la proteína codificada por el mismo. El cribado del ADNc o de la biblioteca genómica con la sonda seleccionada puede realizarse utilizando procedimientos estándar, como se describe en Sambrook *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 1989). Un medio alternativo para aislar el gen que codifica para el anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> o el polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> es usar la metodología de PCR (Sambrook *et al.*, *supra*; Dieffenbach *et al.*, PCR PRIMER: A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 1995).

Las técnicas para el cribado de una biblioteca de ADNc son bien conocidas en la técnica. Las secuencias de oligonucleótidos seleccionadas como sondas deben ser de suficiente longitud y lo suficientemente no ambiguas para minimizar los falsos positivos. El oligonucleótido se marca preferentemente de manera que se puede detectar tras la hibridación con el ADN en la biblioteca que se rastrea. Los métodos de marcado son bien conocidos en la técnica, e incluyen el uso de radiomarcadores como ATP marcado con <sup>32</sup>P, la biotilación o el marcaje enzimático. Las condiciones de hibridación, incluyendo las condiciones de rigurosidad moderada y de rigurosidad alta, se proporcionan en Sambrook *et al.*, *supra*.

Las secuencias identificadas en dichos procedimientos de cribado de bibliotecas pueden compararse y alinearse con otras secuencias conocidas depositadas y disponibles en bases de datos públicas tales como GenBank u otras bases de datos de secuencias privadas. La identidad de secuencia (ya sea a nivel de aminoácidos como de nucleótidos) dentro de regiones definidas de la molécula o a través de la secuencia de longitud completa se puede determinar utilizando métodos conocidos en la técnica y como se describe en la presente memoria.

El ácido nucleico que tiene una secuencia codificante de proteína se puede obtener mediante cribado de ADNc seleccionado o de bibliotecas genómicas utilizando la secuencia de aminoácidos deducida divulgada en la presente memoria por primera vez, y, si es necesario, utilizando procedimientos convencionales de extensión del cebador como se describe en Sambrook *et al.*, *supra*, para detectar precursores e intermedios de procesamiento del ARNm que pueden no haberse transcrito de forma inversa en ADNc.

### 2. Selección y transformación de células hospedadoras

Las células hospedadoras se transfectan o transforman con vectores de expresión o clonación descritos en la presente memoria para la producción del anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> o del polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican para las secuencias deseadas. Las condiciones de cultivo, tales como medios, temperatura, pH y similares, pueden ser seleccionadas por el experto en la materia sin excesiva experimentación. En general, los principios, protocolos y técnicas prácticas generales para maximizar la productividad de cultivos celulares se pueden encontrar en MAMMALIAN CELL BIOTECHNOLOGY: A PRACTICAL APPROACH, M. Butler, ed., IRL Press, 1991 y Sambrook *et al.*, *supra*.

Los métodos de transfección de células eucariotas y de transformación de células procariotas son conocidos por el experto con conocimientos ordinarios en la materia, por ejemplo, transfección mediante  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CaPO}_4$ , mediada por liposomas y electroporación. Dependiendo de la célula huésped utilizada, la transformación se realiza utilizando técnicas estándar apropiadas para tales células. El tratamiento con calcio que emplea cloruro de calcio, como se describe en Sambrook *et al.*, *supra*, o la electroporación se utiliza generalmente para procariotas. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se utiliza para la transformación de ciertas células vegetales, tal como se describe por Shaw *et al.*, (1983) Gene 23:315 y el documento WO 89/05859 publicado el 29 de junio de 1989. Para las células de mamífero sin tales paredes celulares, se puede emplear el método de precipitación con fosfato cálcico de Graham y van der Eb (1978) Virol. 52:456-457. Los aspectos generales de las transfecciones de sistemas de células hospedadoras de mamíferos se han descrito en la Patente US- 4.399.216. Las transformaciones en levaduras se llevan a cabo generalmente de acuerdo con el método de Van Solingen *et al.*, (1977) J. Bacteriol.130:946 (1977) e Hsiao *et al.* (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76:3829. Sin embargo, también se pueden utilizar otros métodos para introducir ADN en las células, tales como mediante microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplastos bacterianos con células intactas o policonaciones, por ejemplo, polibreno, poliornitina. Para diversas técnicas de transformación de las células de mamífero, véase Keown *et al.* (1990) Meth. Enzymol. 185: 527-537 y Mansour *et al.* (1988) Nature 336: 348-352.

Las células hospedadoras adecuadas para la clonación o expresión del ADN en los vectores de la presente memoria incluyen células procariotas, células de levaduras o células eucariotas superiores. Los procariotas adecuados incluyen, pero no se limitan a eubacterias, tales como organismos gram-negativos o gram-positivos, por ejemplo, *Enterobacteriaceae* como *E. coli*. Varios Existen varias cepas de *E. coli* disponibles públicamente, tales como *E. coli* K12 cepa MM294 (ATCC 31.446); *E. coli* X1776 (ATCC 31.537); *E. coli* cepa W3110 (ATCC 27.325) y K5 772 (ATCC 53.635). Otras células hospedadoras procariotas adecuadas incluyen *Enterobacteriaceae*, tal como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescens* y *Shigella*, así como bacilos como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P divulgado en el documento DD 266.710 publicadado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tal como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitantes. La cepa W3110 es un hospedador u hospedador parental particularmente preferido porque es una cepa hospedadora común para las fermentaciones de productos de ADN recombinante. Preferiblemente, la célula hospedadora secreta cantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la cepa W3110 puede modificarse para efectuar una mutación genética en los genes que codifican para las proteínas endógenas del hospedador, incluyendo algunos ejemplos de dichos huéspedes *E. coli* W3110 cepa 1A2, que tiene el genotipo completo tonA; *E. coli* W3110 cepa 9E4, que tiene el genotipo completo tonA ptr3; *E. coli* W3110 cepa 27C7 (ATCC 55.244), que tiene el genotipo completo tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT kanr; *E. coli* W3110 cepa 37D6, que tiene el genotipo completo tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 deep ompT rbs7 ilvG kanr; *E. coli* W3110 cepa 40B4, que es la cepa 37D6 con una mutación de delección degP no resistente a kanamicina y una cepa de *E. coli* que tiene una proteasa periplásmica mutante divulgada en la Patente US-4.946.783 presentada el 7 de agosto de 1990. Como alternativa, son adecuados métodos de clonación *in vitro*, por ejemplo, PCR u otras reacciones de la polimerasa de ácido nucleico.

Los anticuerpos de longitud completa, los fragmentos de anticuerpos y las proteínas de fusión de anticuerpos se pueden producir en bacterias, en particular cuando no son necesarias la glicosilación ni la función efectora de Fc, tal como sucede cuando el anticuerpo terapéutico se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, una toxina) y el inmunocombinado por sí mismo muestra eficacia en la destrucción de células tumorales. Los anticuerpos de longitud completa tienen una mayor semivida en la circulación. La producción en *E. coli* es más rápida y más rentable. Para la expresión de fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias, véase, por ejemplo, la Patente US-5.648.237 (Carter *et al.*), la Patente US- 5.789.199 (Joly *et al.*) y la Patente US-5.840.523 (Simmons *et al.*) que describen la región de inicio de la traducción (TIR) y las secuencias señal para optimizar la expresión y secreción. Después de la expresión, el anticuerpo se aísla de la pasta de células de *E. coli* en una fracción soluble y se puede purificar mediante, por ejemplo, una columna de proteína A o G dependiendo del isotipo. La purificación final se puede llevar a cabo de forma similar al proceso para purificar el anticuerpo expresado por ejemplo, en células CHO.

Además de los procariotas, los microorganismos eucariotas como los hongos filamentosos o las levaduras son hospedadores de clonación o expresión adecuados para los vectores que codifican para el anticuerpo Hhip1<sub>β12</sub> o el polipéptido Hhip1<sub>β12</sub>. *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo hospedador eucariota inferior utilizado comúnmente. Otros incluyen *Schizosaccharomyces pombe* (Beach and Nurse (1981) Nature 290:140; el documento EP139.383 publicado el 2 de mayo de 1985); hospedadores *Kluyveromyces* (Patente US-4.943.529; Fleer *et al.*, (1991) Bio/Technology, 9:968-975) como, por ejemplo, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt *et al.* (1983) J. Bacteriol. 154(2):737-742); *K. fragilis* (ATCC 12,424); *K. bulgaricus* (ATCC 16,045); *K. wickerhamii* (ATCC 24,178); *K. waltii* (ATCC 56,500); *K. drosophilum* (ATCC 36, 906; Van den Berg *et al.* (1990) Bio/Technology, 8:135); *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183.070; Sreekrishna *et al.* (1988) J. Basic Microbiol. 28:265-278); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244.234); *Neurospora crassa* (Case *et al.* (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:5259-5263); *Schwanniomyces* tal como *Schwanniomyces occidentalis* (EP 394.538 publicada el 31 de octubre de 1990) y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolyposcladium* (documento WO 91/00357 publicado el 10 de enero de 1991) y hospedadores *Aspergillus* tales como *A. nidulans* (Ballance *et al.* (1983) Biochem. Biophys. Res. Commun., 112:284-289; Tilburn *et al.* (1983)

Gene 26:205-221; Yelton *et al.* (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:1470-1474) y *A. niger* (Kelly and Hynes (1985) EMBO J. 4:475-479). Las levaduras metilotróficas son adecuadas en la presente memoria e incluyen, pero no se limitan a, levaduras capaces de crecer en metanol, seleccionadas de los géneros que consisten en *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* y *Rhodotorula*. Una lista de especies específicas que son

5 ilustrativas de esta clase de levaduras se puede encontrar en C. Anthony, THE BIOCHEMISTRY OF METHYLOTROPHS, Academic Press, Londres, p. 269, 1982.

Las células hospedadoras adecuadas para la expresión del anticuerpo Hhip1<sub>β12</sub> o polipéptido Hhip1 glicosilado se derivan de organismos multicelulares. Ejemplos de células de invertebrados incluyen células de insectos tales como

10 *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9, así como células vegetales, tales como cultivos celulares de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco. Se han identificado numerosas cepas y variantes de baculovirus y las correspondientes células hospedadoras de insecto permisivas de hospedadores tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori* (gusano de seda). Varias cepas virales para la transfección están disponibles al público, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV y dichos virus se pueden utilizar

15 como el virus de la presente memoria de acuerdo con la presente invención, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

Sin embargo, el interés ha sido mayor en células de vertebrados y la propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo de tejidos) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamíferos útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.* (1977) J. Gen. Virol. 36:59); las células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10); las células de ovario de hámster chino-DHFR (CHO, Urlaub *et al.* (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 4216); las células de Sertoli de

20 ratón (TM4, Mather (1980) Biol. Reprod. 23:243-251); las células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); las células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); las células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); las células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); las células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); las células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); las células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); el tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); las células TRI (Mather *et al.* (1982) Anales

30 N.Y. Acad. Sci. 383:44-68); las células MRC 5; las células FS4 y una línea de hepatoma humano (Hep G2). Las células hospedadoras se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción de anticuerpos anti-Hhip1<sub>β12</sub> o polipéptido Hhip1 y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que

35 codifican las secuencias deseadas.

### 3. Selección y uso de un vector replicable

El ácido nucleico (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) que codifica para el anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> o polipéptido

40 Hhip1 puede insertarse en un vector replicable para la clonación (amplificación del ADN) o para la expresión. Existen varios vectores disponibles al público. El vector puede, por ejemplo, estar en la forma de un plásmido, cósmido, partícula viral, o fago. La secuencia de ácido nucleico apropiada puede insertarse en el vector mediante varios procedimientos. En general, el ADN se inserta en un sitio(s) apropiado de una endonucleasa de restricción usando técnicas conocidas en la técnica. Los componentes del vector generalmente incluyen, pero no se limitan a, una o

45 más de una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción. La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de estos componentes emplea técnicas de ligación estándar que son conocidas por el experto en la materia.

Los polipéptidos Hhip1<sub>β12</sub> se pueden producir de forma recombinante no sólo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N-terminal de la proteína o polipéptido maduros. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector o puede ser una parte del ADN que codifica para el anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> o para el polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> que se inserta en el vector. La secuencia señal puede ser una secuencia

50 señal procarionota seleccionada, por ejemplo, del grupo de la fosfatasa alcalina, la penicilinasasa, 1pp o los líderes de la enterotoxina II termoestables. Para la secreción en levaduras la secuencia señal puede ser, por ejemplo, el líder de la invertasa de levadura, el líder del factor alfa (incluyendo líderes del factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, este último descrito en la Patente US-5.010.182) o el líder de la fosfatasa ácida, el líder de la glucoamilasa de *C. albicans* (EP 362.179 publicada el 4 de abril de 1990) o la señal descrita en el documento WO 90/13646 publicado el

60 15 de noviembre de 1990. En la expresión de células de mamífero, las secuencias señal de mamíferos se pueden utilizar para dirigir la secreción de la proteína, tales como secuencias señal de polipéptidos secretados de la misma especie o especies relacionadas, así como líderes secretores virales.

Tanto los vectores de expresión como los vectores de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que

65 permite al vector replicarse en una o más células hospedadoras seleccionadas. Tales secuencias son bien conocidas para varias bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para

la mayoría de las bacterias Gram-negativas, el origen del plásmido 2 $\mu$  es adecuado para levaduras y varios orígenes virales (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamífero.

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

10 Un ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero son aquellos que permiten la identificación de células competentes para incorporar el ácido nucleico que codifica para el anticuerpo anti-Hhip1 $_{\beta 12}$  o polipéptido Hhip1, tal como DHFR o la timidina quinasa. Una célula hospedadora apropiada cuando se emplea DHFR de tipo silvestre es la línea celular CHO deficiente en actividad DHFR, preparada y propagada como se describe por Urlaub *et al.* (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 77:4216. Un gen de selección adecuado para uso en levaduras es el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura YRp7 (Stinchcomb *et al.* (1979) Nature 282:39; Kingsman *et al.* (1979) Gene 7:141; Tschemper *et al.* (1980) Gene 10:157). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC N.º 44076 o PEP4-1 (Jones, (1977) Genetics 85:12).

20 Los vectores de expresión y clonación habitualmente contienen un promotor unido operativamente al anticuerpo anti-Hhip1 $_{\beta 12}$  o polipéptido Hhip1 que codifica para la secuencia de ácido nucleico para dirigir la síntesis de ARNm. Los promotores reconocidos por varias células hospedadoras potenciales son bien conocidos. Los promotores adecuados para su uso con hospedadores procariotas incluyen los sistemas de promotor de  $\beta$ -lactamasa y lactosa (Chang *et al.* (1978) Nature 275:615); Goeddel *et al.* (1979) Nature 281:544), el sistema promotor de fosfatasa alcalina, un sistema de promotor de triptófano (*trp*) (Goeddel (1980) Nucl. Acids Res. 8:4057; EP 36,776) y promotores híbridos tales como el promotor *tac* (deBoer *et al.* (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80:21-25). Los promotores para uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) unida operativamente al ADN que codifica para el anticuerpo anti-Hhip1 $_{\beta 12}$  o polipéptido Hhip1.

30 Ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para utilizar con levaduras hospedadoras incluyen los promotores de 3-fosfoglicerato quinasa (Hitzeman *et al.* (1980) J. Biol. Chem. 255:2073) u otras enzimas glicolíticas (Hess *et al.* (1968) J. Adv. Enzyme Reg. 7:149; Holland, (1978) Biochemistry 17:4900), tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa.

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

45 La transcripción del anticuerpo anti-Hhip1 $_{\beta 12}$  o polipéptido Hhip1 $_{\beta 12}$  a partir de vectores en células hospedadoras de mamífero se controla, por ejemplo, mediante promotores obtenidos de los genomas de virus tales como el virus del polioma, virus de la viruela aviar (documento UK-2.211.504 publicado el 5 de julio de 1989), adenovirus (tal como el adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y virus de simio 40 (SV40) de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina y de promotores de choque térmico, siempre que tales promotores sean compatibles con los sistemas de células hospedadoras.

50 La transcripción de un ADN que codifica para el anticuerpo anti-Hhip1 $_{\beta 12}$  o el polipéptido Hhip1 $_{\beta 12}$  por eucariotas superiores puede incrementarse insertando una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos de ADN que actúan en cis (por lo general alrededor de 10 a 300 pb) que actúan sobre un promotor para incrementar su transcripción. Muchas secuencias potenciadoras se conocen ahora a partir de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina,  $\alpha$ -fetoproteína e insulina). Generalmente, sin embargo, se utilizará un potenciador de un virus de célula eucariota. Ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación y los potenciadores de adenovirus. El potenciador puede cortarse y empalmarse en el vector en una posición 5' o 3' respecto a la secuencia de codificación del anticuerpo anti-Hhip1 $_{\beta 12}$  o el polipéptido Hhip1 $_{\beta 12}$ , aunque se localiza preferiblemente en un sitio 5' del promotor.

65 Los vectores de expresión utilizados en las células hospedadoras eucariotas (levadura, hongos, insectos, plantas, animales, seres humanos, o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Tales secuencias están comúnmente disponibles en las regiones no traducidas en 5' y ocasionalmente en 3' de ADN o ADNc eucariotas o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida

del ARNm que codifica para el anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> o el polipéptido Hhip1<sub>β12</sub>.

Otros métodos, vectores y células hospedadoras adecuadas para la adaptación a la síntesis del anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> o el polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> en cultivo de células de vertebrados recombinantes se describen en Gething *et al.* (1981) *Nature* 293:620-625; Mantei *et al.* (1979) *Nature* 281:40-46; documento EP 117.060 y EP 117.058.

#### 4. Cultivo de células hospedadoras

Las células hospedadoras utilizadas para producir el anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> o el polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> de esta invención pueden cultivarse en varios medios. Los medios comercialmente disponibles, tales como F10 de Ham (Sigma), Medio Esencial Mínimo (MEM) (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma) son apropiados para cultivar las células hospedadoras. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham *et al.* (1979) *Meth. Enzymol.* 58:44, Barnes *et al.* (1980) *Anal. Biochem.* 102:255, Patentes US-4.767.704; US-4.657.866; US-4.927.762; US-4.560.655 o US-5.122.469; los documentos WO 90/03430 y WO 87/00195 la Patente US-30.985 se pueden utilizar como medios de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios puede suplementarse según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCIN™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos generalmente presentes a concentraciones finales en el rango micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualquier otro suplemento necesario también se puede incluir en concentraciones apropiadas que serían conocidas por los expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH, y similares, son las utilizadas previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión y serán evidentes para el experto en la materia.

#### 5. Detección de la amplificación/expresión génica

La amplificación y/o expresión génica puede medirse en una muestra directamente, por ejemplo, mediante transferencia Southern convencional, transferencia Northern para cuantificar la transcripción del ARNm (Thomas, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77:5201-5.205), transferencia de puntos (análisis de ADN) o hibridación *in situ*, utilizando una sonda marcada apropiadamente, basándose en las secuencias proporcionadas en la presente memoria. Como alternativa, se pueden utilizar anticuerpos que pueden reconocer dúplex específicos, incluyendo dúplex de ADN, dúplex de ARN y dúplex híbridos ADN-ARN o dúplex ADN-proteína. Los anticuerpos a su vez pueden marcarse y el ensayo puede llevarse a cabo cuando el dúplex está unido a una superficie, de modo que tras la formación del dúplex sobre la superficie puede detectarse la presencia de anticuerpo unido al dúplex.

La expresión génica, alternativamente, puede medirse mediante procedimientos inmunológicos, tales como tinción inmunohistoquímica de células o cortes de tejido y ensayo de cultivos celulares o fluidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto génico. Los anticuerpos útiles para la tinción inmunohistoquímica y/o el ensayo de fluidos de ensayo pueden ser monoclonales o policlonales y pueden prepararse en cualquier mamífero. Convenientemente, los anticuerpos pueden prepararse contra una secuencia de polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> o contra un péptido sintético basado en las secuencias de ADN proporcionadas en la presente memoria o contra la secuencia exógena fusionada con el ADN de Hhip1<sub>β12</sub> y que codifica para un epítipo de un anticuerpo específico.

#### 6. Purificación del anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> y del polipéptido Hhip1

Las formas del anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> y el polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> pueden recuperarse del medio de cultivo o de lisados de células hospedadoras. Si están unidos a la membrana, se pueden liberar de la membrana utilizando una solución detergente adecuada (por ejemplo, Triton-X 100) o mediante escisión enzimática. Las células empleadas en la expresión del anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> y el polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> se pueden destruir mediante diversos medios físicos o químicos, tales como ciclos de congelación-descongelación, sonicación, rotura mecánica o agentes de lisis celular.

Se puede desear purificar el anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> y el polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> a partir de proteínas o polipéptidos celulares recombinantes. Los siguientes procedimientos son ejemplos de procedimientos de purificación adecuados: mediante fraccionamiento en una columna de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía en sílice o en una resina de intercambio catiónico, tal como DEAE; cromatografía de exclusión; SDS-PAGE; precipitación con sulfato de amonio; filtración en gel utilizando, por ejemplo, Sephadex G-75; columnas de proteína A-Sepharosa para eliminar contaminantes tales como IgG y columnas quelantes de metales para unir formas etiquetadas del epítipo del anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> y el polipéptido Hhip1<sub>β12</sub>. Se pueden emplear varios métodos de purificación de proteínas y tales métodos son conocidos en la técnica y se describen por ejemplo en Deutscher (1990) *Meth. Enzymol.* 182:83-90; Scopes, *PROTEIN PURIFICATION: PRINCIPLES AND PRACTICE*, Springer-Verlag, Nueva York, 1982. La etapa(s) de purificación seleccionada dependerá, por ejemplo, de la naturaleza del proceso de producción utilizado y el anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> o polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> particular producido.

Cuando se utilizan técnicas recombinantes, el anticuerpo se puede producir intracelularmente, en el espacio

periplásmico, o se puede secretar directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como un primer paso, los restos de partículas, bien células hospedadoras o fragmentos lisados, se eliminan, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter *et al.* (1992) *Bio/Technology* 10:163-167 describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan al espacio periplásmico de *E. coli*. Brevemente, la pasta celular se descongela en presencia de acetato de sodio (pH 3,5), EDTA y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante aproximadamente 30 min. Los restos celulares se pueden eliminar por centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta en el medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión generalmente se concentran primero usando un filtro de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. En cualquiera de las etapas anteriores se puede incluir un inhibidor de la proteasa tal como PMSF para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes adventicios.

La composición de anticuerpo preparada a partir de las células se puede purificar utilizando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferida. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A se puede utilizar para purificar anticuerpos basados en las cadenas pesadas  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$  o  $\gamma 4$  humanas (Lindmark *et al.* (1983) *J. Immunol. Meth.* 62:1-13). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para la  $\gamma 3$  humana (Guss *et al.* (1986) *EMBO J.* 5:1567-1575). La matriz a la que se une el ligando de afinidad es frecuentemente agarosa, pero existen otras matrices. Las matrices mecánicamente estables tales como vidrio de poro controlado o poli(estirenodivinil)benceno permiten velocidades de flujo más rápidas y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden lograr con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio CH3, la resina Bakerbond ABX™ (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) es útil para la purificación. Dependiendo del anticuerpo a recuperar, existen otras técnicas para la purificación de proteínas tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina, cromatografía en SEPHAROSE™ sobre una resina de intercambio aniónico o catiónico (como una columna de ácido poliaspártico), cromatoenfoque, SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio.

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

## I. Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones terapéuticas de los anticuerpos anti-Hhip1 y oligopéptidos Hhip1 $\beta$ 12, utilizadas de acuerdo con la presente invención se preparan para su almacenamiento mezclando la molécula que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizantes opcionales farmacéuticamente aceptables (REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES 16ª edición, Osol, A. Ed., 1980), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como acetato, Tris, fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo el ácido ascórbico y la metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; parabenos de alquilo tales como metilparabeno o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; tónicos tales como trehalosa y cloruro de sodio; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; tensioactivo tal como polisorbato; contraiones formadores de sal, tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína) y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN®, PLURONICS® o polietilenglicol (PEG). El anticuerpo comprende preferiblemente el anticuerpo a una concentración de entre 5 y 200 mg/ml, preferiblemente entre 10 y 100 mg/ml.

Las formulaciones de la presente memoria también pueden contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se está tratando, preferiblemente aquellas con actividades complementarias que no se ven afectadas de manera adversa entre sí. Por ejemplo, además de un anticuerpo anti-Hhip1 $\beta$ 12 u oligopéptido Hhip1 $\beta$ 12, puede ser deseable incluir en la formulación, un anticuerpo adicional, por ejemplo, un segundo anticuerpo anti-Hhip1 $\beta$ 12 que se une a un epítipo diferente en el polipéptido Hhip1 $\beta$ 12 o un anticuerpo contra alguna otra diana tal como un factor de crecimiento que afecta al crecimiento del cáncer particular. Como alternativa, o adicionalmente, la composición puede comprender además un agente quimioterapéutico, agente citotóxico, citocina, agente inhibidor del crecimiento, agente anti-hormonal y/o cardioprotector. Dichas moléculas están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito previsto.

65

Los principios activos también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, en microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli-(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se divulgan en RIMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 16ª EDICIÓN, Osol, A. Ed., 1980.

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en forma de artículos conformados, por ejemplo., películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (Patente US-3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y  $\gamma$ -etil-L-glutamato, acetato de etileno-vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como el LUPRON DEPOT® (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y poliácido D-(-)-3-hidroxi-butírico.

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

## 20 J. Diagnóstico y tratamiento con anticuerpos anti-Hhip1 <sub>$\beta$ 12</sub> y oligopéptidos Hhip1 <sub>$\beta$ 12</sub>

En una realización, los tumores relacionados con Hedgehog pueden ser analizados por inmunohistoquímica (IHC). Los cortes de tejido embebidos en parafina de una biopsia tumoral pueden someterse al ensayo de IHC y adjudicarse unos criterios de intensidad de la tinción de la proteína Hhip1/Ptch como sigue:

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

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

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

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

Aquellos tumores con puntuaciones 0 o 1+ para la expresión del polipéptido Hhip1 y/o Ptch se pueden caracterizar como que no sobreexpresan Hhip1 y/o Ptch, mientras que aquellos tumores con puntuaciones de 2+ o 3+ pueden caracterizarse como que sobreexpresan Hip y/o Ptch.

Como alternativa, o adicionalmente, los ensayos FISH tales como INFORM® (vendido por Ventana, Arizona) o PATHVISION® (Vysis, Illinois) pueden llevarse a cabo en tejido tumoral embebido en parafina fijado con formalina para determinar el grado (dado el caso) de sobreexpresión de Hhip1 y/o Ptch en el tumor.

La sobreexpresión o amplificación de Hhip1 y/o Ptch pueden ser evaluadas, por ejemplo, usando un ensayo de diagnóstico *in vivo* mediante la administración de una molécula (tal como un anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica) que se une a la molécula a detectar y que está etiquetada con un marcador detectable (por ejemplo, un isótopo radiactivo o un marcador fluorescente) y someter a un estudio de imagen externa al paciente para la localización del marcador.

Sin desear estar ligado por ninguna teoría particular de operabilidad, se cree que los anticuerpos anti-Hhip1 <sub>$\beta$ 12</sub> de la invención que se unen al bucle L2 de Hhip1 pueden sufrir una reacción cruzada con el bucle análogo de Ptch y, por lo tanto, detectar la sobreexpresión de Ptch, así como de Hip.

Como se describió anteriormente, los anticuerpos anti-Hhip1 <sub>$\beta$ 12</sub>, oligopéptidos y moléculas orgánicas tienen varias aplicaciones no terapéuticas. Los anticuerpos anti-Hhip1 <sub>$\beta$ 12</sub> y oligopéptidos de la presente invención pueden ser útiles para el diagnóstico y la estadificación de los cánceres que expresan Hip o Ptch (por ejemplo, mediante radioimagen). Los anticuerpos y oligopéptidos son también útiles para la purificación o inmunoprecipitación de Hhip1 y del polipéptido Hhip1 <sub>$\beta$ 12</sub> a partir de células, para la detección y cuantificación del polipéptido Hhip1 *in vitro*, por ejemplo, en un ELISA o una transferencia Western, para destruir y eliminar células que expresan Hip de una población de células mixtas como una etapa en la purificación de otras células.

Actualmente, dependiendo del estadio del cáncer, el tratamiento del cáncer implica una o una combinación de las siguientes terapias: cirugía para extirpar el tejido canceroso, radioterapia y quimioterapia. La terapia con anticuerpo anti-Hhip1 <sub>$\beta$ 12</sub>, oligopéptido o molécula orgánica puede ser especialmente deseable en pacientes ancianos que no toleran bien la toxicidad y los efectos secundarios de la quimioterapia, así como en la enfermedad metastásica donde la radioterapia tiene una utilidad limitada. Los anticuerpos anti-Hhip1 <sub>$\beta$ 12</sub> y los oligopéptidos dirigidos al tumor de la invención son útiles para aliviar los cánceres que expresan Hip en el diagnóstico inicial de la enfermedad o

durante la recidiva. Para aplicaciones terapéuticas, la molécula se puede usar sola, o en terapia de combinación con, por ejemplo, hormonas, antiangiogénos o compuestos radiomarcados o con cirugía, crioterapia y/o radioterapia. El tratamiento con el anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub>, oligopéptido o molécula orgánica se puede administrar en combinación con otras formas de terapia convencional, ya sea consecutivamente con, terapia convencional previa o posterior. Los fármacos quimioterapéuticos como TAXOTERE<sup>®</sup> (docetaxel), TAXOL<sup>®</sup> (palictaxel), estramustina y mitoxantrona se utilizan en el tratamiento del cáncer, en particular, en pacientes con buen riesgo. En el presente método de la invención para tratar o aliviar el cáncer, al paciente con cáncer se le puede administrar anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> u oligopéptido conjuntamente con el tratamiento con el uno o más de los agentes quimioterapéuticos anteriores. En particular, se contempla la terapia de combinación con palictaxel y derivados modificados (véase, por ejemplo, el documento EP0600517). El anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub>, oligopéptido o molécula orgánica se administrarán con una dosis terapéuticamente efectiva del agente quimioterapéutico. En otra realización, la molécula se administra en combinación con quimioterapia para aumentar la actividad y eficacia del agente quimioterapéutico, por ejemplo, paclitaxel. En el vademécum (THE PHYSICIANS' DESK REFERENCE (PDR)) se divulgan las dosis de estos agentes que se han utilizado en el tratamiento de varios tipos de cáncer. La pauta posológica y las dosis de estos fármacos quimioterapéuticos anteriormente mencionados que son terapéuticamente eficaces dependerán del cáncer particular que se trata, la extensión de la enfermedad y otros factores familiares para el médico experto en la materia y pueden ser determinadas por el médico.

En una realización particular, se administra al paciente un conjugado que comprende un anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> u oligopéptido conjugado con un agente citotóxico. Preferiblemente, los inmunoconjugados unidos a la proteína Hhip1 son internalizados por la célula, teniendo como resultado una mayor eficacia terapéutica del inmunoconjugado en destruir la célula cancerosa a la que se une. En una realización preferida, el agente citotóxico actúa o interfiere con el ácido nucleico de la célula cancerosa. Ejemplos de dichos agentes citotóxicos se han descrito anteriormente e incluyen maitansinoides, calicheamicinas, ribonucleasas y ADN endonucleasas.

Los anticuerpos anti-Hhip1<sub>β12</sub>, oligopéptidos o sus conjugados con toxina de los mismos se administran a un paciente humano, de acuerdo con métodos conocidos, tales como, por ejemplo, mediante administración intravenosa, por ejemplo, como un bolo o por infusión continua durante un período de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intra-articular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o inhalación. Se prefiere la administración intravenosa o subcutánea del anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica.

Otros regímenes terapéuticos pueden combinarse con la administración del anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> u oligopéptido. La administración combinada incluye la coadministración, usando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica y la administración consecutiva en cualquier orden, en el que preferiblemente existe un periodo de tiempo durante el cual ambos (o todos) los agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas. Preferiblemente, dicha terapia combinada tiene como resultado un efecto terapéutico sinérgico.

También puede ser deseable combinar la administración del anticuerpo o anticuerpos anti-Hhip1<sub>β12</sub> u oligopéptidos con la administración de un anticuerpo dirigido contra otro antígeno tumoral asociado al cáncer particular.

En otra realización, los métodos de tratamiento terapéuticos de la presente invención implican la administración combinada de un anticuerpo (o anticuerpos) anti-Hhip1<sub>β12</sub> u oligopéptidos y uno o más agentes quimioterapéuticos o agentes inhibidores del crecimiento, incluyendo la coadministración de cócteles de diferentes agentes quimioterapéuticos. Los agentes quimioterapéuticos incluyen fosfato de estramustina, prednimustina, cisplatino, 5-fluorouracilo, melfalán, ciclofosfamida, hidroxurea e hidroxureataxanos (tales como paclitaxel y docetaxel) y/o antibióticos antraciclina. Se pueden utilizar la preparación y las pautas posológicas de dichos agentes quimioterapéuticos indicadas en las instrucciones del fabricante o según determine empíricamente el médico experto. La preparación y las pautas posológicas de dicha quimioterapia se describen también en CHEMOTHERAPY SERVICE Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 1992.

El anticuerpo u oligopéptido se pueden combinar con un compuesto anti-hormonal, por ejemplo, un compuesto anti-estrógeno, tal como tamoxifeno; una anti-progesterona, tal como onapristona (véase, el documento EP 616 812) o un anti-andrógeno, tal como flutamida, en dosis conocidas para tales moléculas. Cuando el cáncer a tratar es un cáncer independiente de andrógenos, el paciente puede someterse previamente a terapia anti-andrógenos y después de que el cáncer se vuelva independiente de andrógenos, se puede administrar al paciente el anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> u oligopéptido (y otros agentes, opcionalmente, como se describe en la presente memoria).

A veces, puede ser beneficioso también co-administrar un cardioprotector (para evitar o reducir la disfunción miocárdica asociada a la terapia) o una o más citocinas al paciente. Además de los regímenes terapéuticos anteriores, el paciente puede someterse a la eliminación quirúrgica de las células cancerosas y/o a radioterapia, antes, simultáneamente con, o después de la terapia con anticuerpos u oligopéptido. Las dosis adecuadas para cualquiera de los agentes coadministrados anteriormente son las utilizadas actualmente y pueden reducirse debido a la acción combinada (sinergia) del agente y del anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> u oligopéptido.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosis y modo de administración serán elegidos por el médico de acuerdo con criterios conocidos. La dosis apropiada dependerá del tipo de enfermedad a tratar, tal como se

define anteriormente, la gravedad y la evolución de la enfermedad, independientemente de si el anticuerpo u oligopéptido se administra con fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta al anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica y a discreción del médico responsable del tratamiento. El anticuerpo u oligopéptido se administra adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos.

5 Preferiblemente, el anticuerpo u oligopéptido se administra por infusión intravenosa o mediante inyecciones subcutáneas. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal (por ejemplo, aproximadamente 0,1-15 mg/kg/dosis) de anticuerpo puede ser una dosis candidata inicial para la administración al paciente, sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o mediante infusión continua. Una pauta posológica puede comprender administrar una dosis de carga  
10 inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguida de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg del anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub>. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas posológicas. Una dosis diaria típica puede variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para las administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo del trastorno, el tratamiento se mantiene hasta que ocurre una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. El progreso de esta terapia se  
15 puede controlar fácilmente mediante métodos y ensayos convencionales y basándose en criterios conocidos para el médico u otras personas expertas en la materia.

Aparte de la administración de la proteína anticuerpo al paciente, la presente solicitud contempla la administración del anticuerpo mediante terapia génica. Tal administración de ácido nucleico que codifica para el anticuerpo está abarcada en la expresión "administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo". Véase, por ejemplo,  
20 el documento WO 96/07321 publicado el 14 de marzo de 1996 relativo a la utilización de la terapia génica para generar anticuerpos intracelulares.

Hay dos estrategias principales para introducir el ácido nucleico (opcionalmente contenido en un vector) en las células del paciente, *in vivo* y *ex vivo*. Para la administración *in vivo*, el ácido nucleico se inyecta directamente en el paciente, por lo general en el sitio donde se requiere el anticuerpo. Para el tratamiento *ex vivo*, se extraen las células del paciente, se introduce el ácido nucleico en estas células aisladas y las células modificadas se administran al paciente directamente o, por ejemplo, encapsuladas dentro de membranas porosas que se implantan en el paciente (véase, por ejemplo, las Patentes US-4.892.538 y US-5.283.187). Existen diversas técnicas disponibles para  
30 introducir ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas varían dependiendo de si el ácido nucleico se transfiere en células cultivadas *in vitro* o *in vivo* en las células del hospedador pretendido. Las técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico en células de mamíferos *in vitro* incluyen el uso de liposomas, electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano, el método de precipitación con fosfato de calcio, etc. Un vector comúnmente usado para la administración *ex vivo* del gen es un vector retroviral.  
35

Las técnicas de transferencia de ácido nucleico *in vivo* actualmente preferidas incluyen la transfección con vectores virales (tales como adenovirus, virus del herpes simple I o virus adenoasociados) y sistemas basados en lípidos (lípidos útiles para la transferencia mediada por lípidos del gen son DOTMA, DOPE y DC-Chol, por ejemplo). Para una revisión de los protocolos de marcaje génico y terapia génica actualmente conocidos, véase Anderson *et al.*  
40 (1992) Science 256:808-813. Véase también el documento WO 93/25673 y las referencias citadas en el mismo.

Los anticuerpos anti-Hhip1 de la invención pueden estar en las diferentes formas abarcadas por la definición de "anticuerpo" de la presente memoria. Por lo tanto, los anticuerpos incluyen anticuerpo de longitud completa o intacta, fragmentos de anticuerpos, variantes de anticuerpo o aminoácidos de secuencia nativa, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos o de fusión, inmunoconjugados y fragmentos funcionales de los mismos. En los anticuerpos de fusión, una secuencia de anticuerpo se fusiona con una secuencia de polipéptido heterólogo. Los anticuerpos se pueden modificar en la región Fc para proporcionar las funciones efectoras deseadas. Como se discute en más detalle en las secciones de la presente memoria, con las regiones Fc apropiadas, el anticuerpo desnudo unido a la superficie celular puede inducir citotoxicidad, por ejemplo, a través de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) o mediante la intervención del complemento en la citotoxicidad dependiente de complemento o algún otro mecanismo. Como alternativa, cuando es deseable eliminar o reducir la función efectora, a fin de minimizar los efectos secundarios o las complicaciones terapéuticas, pueden usarse algunas otras regiones Fc.  
50

55 En una realización, el anticuerpo compite por la unión o se une sustancialmente a, el mismo epítipo que los anticuerpos de la invención. También se contemplan los anticuerpos que tienen las características biológicas de los presentes anticuerpos anti-Hhip1<sub>β12</sub> de la invención, incluyendo específicamente su especificidad por el tumor *in vivo* y cualquier inhibición de la proliferación celular o características citotóxicas.

60 Los métodos para producir los anticuerpos anteriores se describen en detalle en la presente memoria.

Los presentes anticuerpos anti-Hhip1<sub>β12</sub>, oligopéptidos y moléculas orgánicas son útiles para tratar un cáncer que expresa Hip o aliviar uno o más síntomas del cáncer en un mamífero. Tal cáncer incluye cáncer de próstata, cáncer del tracto urinario, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de colon y cáncer de ovario, más específicamente, adenocarcinoma de próstata, carcinomas de células renales, adenocarcinomas colorrectales, adenocarcinomas de pulmón, carcinomas de pulmón de células escamosas y mesotelioma pleural. Los cánceres abarcan los cánceres  
65

metastásicos de cualquiera de los anteriores. El anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica es capaz de unirse a al menos una parte de las células cancerosas que expresan el polipéptido Hhip1 en el mamífero. En una realización preferida, el anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica son eficaces para destruir o eliminar células tumorales que expresan Hip o inhibir el crecimiento de tales células tumorales, *in vitro* o *in vivo*, tras la unión al polipéptido Hhip1 en la célula. Dicho anticuerpo incluye un anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> desnudo (no conjugado con ningún agente). Los anticuerpos desnudos que tienen propiedades citotóxicas o de inhibición del crecimiento celular se pueden utilizar adicionalmente con un agente citotóxico para hacerlos incluso más potentes en la destrucción de células tumorales. Se pueden conferir propiedades citotóxicas a un anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub>, por ejemplo, conjugando el anticuerpo con un agente citotóxico, para formar un inmunoconjugado tal como se describe en la presente memoria. El agente citotóxico o un agente inhibidor del crecimiento es preferiblemente una molécula pequeña. Las toxinas tales como calicheamicina o un maitansinoide y análogos o derivados de los mismos son preferibles.

La invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> u oligopéptido de la invención y un vehículo. A los efectos del tratamiento del cáncer, las composiciones se pueden administrar al paciente que necesita tal tratamiento, en el que la composición puede comprender uno o más anticuerpos anti-Hhip1 presentes como un inmunoconjugado o como el anticuerpo desnudo. En una realización adicional, las composiciones pueden comprender estos anticuerpos u oligopéptidos en combinación con otros agentes terapéuticos tales como agentes citotóxicos o inhibidores del crecimiento, incluyendo agentes quimioterapéuticos. La invención también proporciona formulaciones que comprenden un anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub> u oligopéptido de la invención y un vehículo. En una realización, la formulación es una formulación terapéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

También se divulgan ácidos nucleicos aislados que codifican para los anticuerpos anti-Hhip1. Se divulgan los ácidos nucleicos que codifican tanto para las cadenas H como L y especialmente los restos de la región hipervariable, cadenas que codifican para el anticuerpo de secuencia nativa así como las variantes, modificaciones y versiones humanizadas del anticuerpo.

También se divulga el tratamiento de un cáncer que expresa el polipéptido Hhip1 o el alivio de uno o más síntomas del cáncer en un mamífero, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub>, oligopéptido o molécula orgánica al mamífero. Las composiciones terapéuticas del anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica se pueden administrar a corto plazo (administración aguda) o crónica, o intermitente según lo indique el médico. También se proporcionan métodos para inhibir el crecimiento y destrucción de una célula que expresa el polipéptido Hhip1.

La invención también proporciona kits y artículos manufacturados como se reivindica. Los kits que contienen anticuerpos anti-Hhip1, oligopéptidos o moléculas orgánicas se pueden usar, por ejemplo, para ensayos de destrucción de células Hhip1, para la purificación o inmunoprecipitación de polipéptido Hhip1 de las células. Por ejemplo, para el aislamiento y purificación de Hhip1, el kit puede contener un anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub>, oligopéptido o molécula orgánica acoplados a esferas (por ejemplo, esferas de sefarosa). Los kits proporcionados pueden contener los anticuerpos, oligopéptidos o moléculas orgánicas para la detección y cuantificación de Hhip1 *in vitro*, por ejemplo, en un ELISA o en una transferencia Western. Tal anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica útil para la detección puede estar provisto de un marcador, tal como un marcador fluorescente o radiomarcador.

#### K. Artículos manufacturados y kits

Otra realización de la invención es un artículo manufacturado que contiene materiales útiles para el tratamiento de un cáncer que expresa anti-Hhip1. El artículo manufacturado comprende un envase y un prospecto en o asociado al envase. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, etc. Los envases pueden estar formados de varios materiales tales como vidrio o plástico. El envase contiene una composición que es eficaz para el tratamiento del trastorno de cáncer y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el envase puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un oligopéptido de la invención. La etiqueta o el prospecto indica que la composición se utiliza para tratar el cáncer. La etiqueta o el prospecto comprenderá además instrucciones para administrar la composición de oligopéptido al paciente de cáncer. Además, el artículo manufacturado puede comprender además un segundo envase que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (BWFI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

También se proporcionan kits que son útiles para diversos fines, por ejemplo, para los ensayos de destrucción de células que expresan Hip, para la purificación o inmunoprecipitación del polipéptido Hhip1 de las células. Para el aislamiento y purificación del polipéptido Hhip1, el kit puede contener un anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub>, oligopéptido o molécula orgánica acoplados a esferas (por ejemplo, esferas de sefarosa). Los kits proporcionados pueden contener los anticuerpos, oligopéptidos o moléculas orgánicas para la detección y cuantificación del polipéptido Hhip1 *in vitro*, por ejemplo, en un ELISA o una transferencia Western. Al igual que con el artículo manufacturado, el kit comprende un envase y una etiqueta o prospecto en o asociado al envase. El envase contiene una composición que comprende al menos un anticuerpo anti-Hhip1<sub>β12</sub>, oligopéptido o molécula orgánica de la invención. Se pueden incluir envases

adicionales que contienen, por ejemplo, diluyentes y tampones y anticuerpos de control. La etiqueta o prospecto puede proporcionar una descripción de la composición, así como instrucciones para el uso *in vitro* o diagnóstico.

#### L. Usos de polipéptidos Hhip1 y ácidos nucleicos que codifican para el polipéptido Hip

5 Las secuencias de nucleótidos (o su complemento) que codifican para polipéptidos Hhip1 tienen diversas aplicaciones en la técnica de la biología molecular, incluyendo usos como sondas de hibridación, en la cartografía de cromosomas y genes y en la generación de sondas de ARN y ADN anti-sentido. El ácido nucleico que codifica para Hip también será útil para la preparación de polipéptidos Hhip1 mediante las técnicas recombinantes descritas en la presente memoria, en el que dichos polipéptidos Hhip1 pueden usarse, por ejemplo, en la preparación de anticuerpos anti-Hhip1 como se describe en la presente memoria.

15 El gen Hhip1 de secuencia nativa de longitud completa o partes del mismo, se puede utilizar como sondas de hibridación para una biblioteca de ADNc para aislar el ADNc de Hhip1 de longitud completa o para aislar otros ADNc (por ejemplo, los que codifican para variantes naturales de Hhip1 o Hhip1 de otras especies) que tienen una identidad de secuencia deseada con la secuencia de Hhip1 nativa divulgada en la presente memoria. Opcionalmente, la longitud de las sondas será de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 bases. Las sondas de hibridación pueden derivarse de al menos parcialmente nuevas regiones de la secuencia de nucleótidos nativa de longitud completa, en las que esas regiones se pueden determinar sin experimentación excesiva o de secuencias genómicas incluyendo promotores, elementos potenciadores e intrones de secuencia nativa Hhip1. A modo de ejemplo, un método de cribado comprenderá aislar la región codificante del gen Hhip1 usando la secuencia de ADN conocida para sintetizar una sonda seleccionada de aproximadamente 40 bases. Las sondas de hibridación pueden marcarse mediante varios marcadores, incluyendo radionucleótidos, tales como <sup>32</sup>P o <sup>35</sup>S o marcadores enzimáticos, tales como fosfatasa alcalina acoplada a la sonda mediante sistemas de acoplamiento de avidina/biotina. Las sondas marcadas que tienen una secuencia complementaria a la del gen Hhip1 de la presente invención se pueden utilizar para cribar bibliotecas de ADNc humano, ADN genómico o ARNm para determinar qué miembros de dichas bibliotecas se hibrida la sonda. Las técnicas de hibridación se describen con más detalle en los Ejemplos presentados más adelante. Cualquier secuencia EST divulgada en la presente solicitud puede emplearse de forma similar como sondas, utilizando los métodos divulgados en la presente memoria.

20 Otros fragmentos útiles de los ácidos nucleicos que codifican para Hip incluyen oligonucleótidos antisentido o sentido que comprenden una secuencia de ácido nucleico monocatenaria (ARN o ADN) capaz de unirse para dirigirse a las secuencias de ARNm de Hhip1 (sentido) o del ADN de Hhip1 (antisentido). Los oligonucleótidos antisentido o sentido, de acuerdo con la presente invención, comprenden un fragmento de la región codificante del ADN de Hhip1. Tal fragmento comprende generalmente al menos aproximadamente 14 nucleótidos, preferiblemente de aproximadamente 14 a 30 nucleótidos. La capacidad de obtener un oligonucleótido antisentido o sentido, basándose en una secuencia de ADNc que codifica para una proteína dada se describe, por ejemplo, en Stein y Cohen (1988) Cancer Res. 48:2659 y van der Krol *et al.* (1988) Biotechniques 6:958.

30 La unión de oligonucleótidos antisentido o sentido para dirigirse a secuencias de ácido nucleico da como resultado la formación de dúplex que bloquean la transcripción o traducción de la secuencia diana mediante uno o varios medios, incluyendo la mayor degradación de los dúplex, la terminación prematura de la transcripción o traducción o por otros medios. Tales métodos son abarcados por la presente invención. Los oligonucleótidos antisentido se pueden usar así para bloquear la expresión de las proteínas Hhip1, en la que aquellas proteínas Hhip1 pueden jugar un papel en la inducción del cáncer en mamíferos. Los oligonucleótidos antisentido o sentido comprenden además oligonucleótidos que tienen esqueletos de azúcar-fosfodiéster modificados (u otros enlaces de azúcar, tales como los descritos en el documento WO 91/06629) y en los que dichos enlaces de azúcar son resistentes a nucleasas endógenas. Tales oligonucleótidos con enlaces de azúcar resistentes son estables *in vivo* (es decir, son capaces de resistir la degradación enzimática) pero retienen la especificidad de secuencia para ser capaces de unirse a secuencias de nucleótidos diana.

35 Los sitios intragénicos preferidos para la unión antisentido incluyen la región que incorpora el codón de iniciación/start (5'-AUG / 5'-ATG) o el codón de terminación/stop (5'-UAA, 5'-UAG y 5'-UGA / 5'-TAA, 5'-TAG y 5'-TGA) de la traducción del marco de lectura abierto (ORF) del gen. Estas regiones se refieren a una porción del ARNm o gen que abarca desde aproximadamente 25 hasta aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir, 5' o 3') de un codón de inicio o terminación de la traducción. Otras regiones preferidas para la unión antisentido incluyen: intrones; exones; uniones intrón-exón; el marco de lectura abierto (ORF) o "región codificante", que es la región entre el codón de iniciación de la traducción y el codón de terminación de la traducción; la caperuza 5' de un ARNm que comprende un resto de guanosina N7-metilado unido al resto situado más 5' del ARNm a través de un enlace trifosfato 5'-5' e incluye la propia estructura de la caperuza 5', así como los primeros 50 nucleótidos adyacentes a la caperuza; la región 5' no traducida (5'UTR), la porción de un ARNm en la dirección 5' desde el codón de iniciación de la traducción y que, por lo tanto, incluye los nucleótidos entre el sitio de la caperuza 5' y el codón de iniciación de la traducción de un ARNm o los correspondientes nucleótidos en el gen y la región 3' no traducida (3'UTR), la porción de un ARNm en la dirección 3' desde el codón de terminación de la traducción y, que por lo tanto, incluye los nucleótidos entre el codón de terminación de la traducción y el extremo 3' de un ARNm o los nucleótidos correspondientes en el gen.

Ejemplos específicos de compuestos antisentido preferidos útiles para inhibir la expresión de las proteínas Hhip1 incluyen oligonucleótidos que contienen las cadenas principales modificadas o uniones entre nucleósidos no naturales. Los oligonucleótidos que tienen las cadenas principales modificadas incluyen aquellos que retienen un átomo de fósforo en la cadena principal y aquellos que no tienen un átomo de fósforo en la cadena principal. Para los fines de esta memoria descriptiva y como a veces se hace referencia en la técnica, los oligonucleótidos modificados que no tienen un átomo de fósforo en su cadena principal entre nucleósidos también pueden ser considerados oligonucleósidos. Las cadenas principales de oligonucleótidos modificados preferidos incluyen, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, metilfosfonatos y otros alquilfosfonatos incluyendo 3'-alquilen fosfonatos, 5'-alquilen fosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos incluyendo 3'-amino fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionalquilfosfonatos, tionalquilfosfotriésteres, selenofosfatos y borano-fosfatos que tienen enlaces 3'-5' normales, análogos enlazados 2'-5 de estos y aquellos que tienen polaridad invertida en los que uno o más enlaces internucleotídicos es un enlace 3' con 3', 5' con 5' o 2' con 2'. Los oligonucleótidos preferidos que tienen polaridad invertida comprenden un único enlace 3' con 3' en el enlace internucleotídico más 3', es decir, un único resto de nucleósido invertido que puede ser abásico (no existe la base nitrogenada o tiene un grupo hidroxilo en lugar de la misma). También se incluyen varias sales, sales mixtas y formas de ácido libre. Patentes de los Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de uniones que contienen fósforo incluyen, pero no se limitan a las Patentes US-687.808; US-4.469.863; US-4.476.301; US-5.023.243; US-5.177.196; US-5.188.897; US-5.264.423; US-5.276.019; US-5.278.302; US-5.286.717; US-5.321.131; US-5.399.676; US-5.405.939; US-5.453.496; US-5.455.233; US-5.466.677; US-5.476.925; US-5.519.126; US-5.536.821; US-5.541.306; US-5.550.111; US-5.563.253; US-5.571.799; US-5.587.361; US-5.194.599; US-5.565.555; US-5.527.899; US-5.721.218; US-5.672.697 y US-5.625.050.

Cadenas principales de oligonucleótidos modificados preferidas que no incluyen un átomo de fósforo en las mismas tienen cadenas principales que están formadas por enlaces entre nucleósidos de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, enlaces entre nucleósidos de heteroátomos y alquilo o cicloalquilo mixtos o uno o más enlaces entre nucleósidos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Estos incluyen aquellos que tienen enlaces morfolino (formados en parte por la porción de azúcar de un nucleósido); cadenas principales de siloxano; cadenas principales de sulfuro, sulfóxido y sulfona; cadenas principales de formacetilo y tioformacetilo; cadenas principales de formacetilo de metileno y tioformacetilo; cadenas principales de riboacetilo; cadenas principales que contienen alqueno; cadenas principales de sulfamato; cadenas principales de metiliminio y metilenhidrazino; cadenas principales de sulfonato y sulfonamida; cadenas principales de amida y otras que tienen partes mixtas de los componentes N, O, S y CH<sub>2</sub>. Patentes de los Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de tales oligonucleósidos incluyen, pero no se limitan a las Patentes US-5.034.506; US-5.166.315; US-5.185.444; US-5.214.134; US-5.216.141; US-5.235.033; US-5.264.562; US-5.264.564; US-5.405.938; US-5.434.257; US-5.466.677; US-5.470.967; US-5.489.677; US-5.541.307; US-5.561.225; US-5.596.086; US-5.602.240; US-5.610.289; US-5.602.240; US-5.608.046; US-5.610.289; US-5.618.704; US-5.623.070; US-5.663.312; US-5.633.360; US-5.677.437; US-5.792.608; US-5.646.269 y 5.677.439.

En otros oligonucleótidos antisentido preferidos, tanto el azúcar como el enlace entre nucleósidos, es decir, la cadena principal, de las unidades de nucleótidos están sustituidos por grupos nuevos. Las unidades base se mantienen para la hibridación con un compuesto diana de ácido nucleico apropiado. Un compuesto oligomérico tal, un mimético de oligonucleótido que ha demostrado tener excelentes propiedades de hibridación, se conoce como un ácido peptidonucleico (APN). En compuestos APN, la cadena principal de azúcar de un oligonucleótido se reemplaza por una cadena principal que contiene amida, en particular una cadena principal de aminoetilglicina. Las bases nitrogenadas se mantienen y están unidas directamente o indirectamente a átomos de nitrógeno aza de la porción amida de la cadena principal. Patentes de los Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de compuestos APN incluyen, pero no se limitan a, las patentes US-5.539.082; US-5.714.331 y US-5.719.262. Otras enseñanzas de compuestos APN se pueden encontrar en Nielsen *et al.* (1991) Science 254:1497-1500.

Los oligonucleótidos antisentido preferidos incorporan cadenas principales de fosforotioato y/o cadenas principales de heteroátomos, y en particular -CH<sub>2</sub>-NH-O-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-O-CH<sub>2</sub>- (conocida como cadena principal de metileno (metilimino) o MMI), -CH<sub>2</sub>-O-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>- y -O-N(CH<sub>3</sub>)-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- (en la que la cadena principal de fosfodiéster nativa se representa como -O-P-O-CH<sub>2</sub>-) descritas en la Patente US-5.489.677 anteriormente mencionada y las cadenas principales de amida de la Patente US-5.602.240 anteriormente mencionada. También se prefieren oligonucleótidos antisentido que tienen cadenas principales de morfolino de la Patente US-5.034.506 anteriormente mencionada.

Los oligonucleótidos modificados también pueden contener uno o más restos de azúcar sustituidos. Los oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-alquilo, S-alquilo o N-alquilo; O-alqueno, S-alqueno o N-alqueno; O-alquino, S-alquino o N-alquino u O-alquil-O-alquilo, donde el alquilo, alqueno y alquino pueden ser alquilo C1 a C10 o alqueno y alquino C2 a C10 sustituido o no sustituido. Particularmente preferidos son O[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O]<sub>m</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ONH<sub>2</sub> y O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ON[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub>, donde n y m son de 1 a aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos antisentido preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': alquilo inferior C1 a C10, alquilo inferior sustituido, alqueno,

alquino, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo u O-aralquilo, SH, SCH<sub>3</sub>, OCN, Cl, Br, CN, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, SOCH<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, ONO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo que escinde el ARN, un grupo indicador, un intercalante, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. Una modificación preferida incluye 2'-metoxietoxi (2'-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, también conocida como 2'-O-(2-metoxietil) o 2'-MOE) (Martin *et al.* (1995) *Helv. Chim. Acta* 78:486-504), es decir, un grupo alcóxialcoxi. Otra modificación preferida incluye 2'-dimetilaminooxietoxi, es decir, un grupo O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>ON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, también conocido como 2'-DMAOE, como se describe en los ejemplos presentados más abajo y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

Otra modificación preferida incluye ácidos nucleicos bloqueados (ANB) en los que el grupo 2'-hidroxilo está unido al átomo de carbono 3' o 4' del anillo de azúcar formando así un resto de azúcar bicíclico. El enlace es preferiblemente un grupo metileno (-CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> que une el átomo de oxígeno 2' y el átomo de carbono 4' en el que n es 1 o 2. Los ANB y la preparación de los mismos se describen en los documentos WO 98/39352 y WO 99/14226.

Otras modificaciones preferidas incluyen 2'-metoxi (2'-O-CH<sub>3</sub>), 2'-aminopropoxi (2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>), 2'-alilo (2'-CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>), 2'-O-alil (2'-O-CH<sub>2</sub>-CH=CH<sub>2</sub>) y 2'-fluoro (2'-F). La modificación 2' puede estar en la posición arábica (arriba) o en la posición ribosa (abajo). Una modificación de 2'-arábica preferida es 2'-F. También se pueden hacer modificaciones similares en otras posiciones del oligonucleótido, particularmente en la posición 3' del azúcar del nucleótido 3' terminal o en los oligonucleótidos unidos en 2'-5' y la posición 5' del nucleótido terminal 5'. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcares, tales como restos ciclobutilo en lugar del azúcar pentofuranosilo. Las patentes de los Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de tales estructuras de azúcar modificadas incluyen, pero no se limitan a, las Patentes US-4.981.957; US-5.118.800; US-5.319.080; US-5.359.044; US-5.393.878; US-5.446.137; US-5.466.786; US-5.514.785; US-5.519.134; US-5.567.811; US-5.576.427; US-5.591.722; US-5.597.909; US-5.610.300; US-5.627.053; US-5.639.873; US-5.646.265; US-5.658.873; US-5.670.633; US-5.792.747 y US-5.700.920.

Los oligonucleótidos también pueden incluir modificaciones o sustituciones en las bases nitrogenadas (a menudo denominadas en la técnica simplemente como "base"). Como se usa en la presente memoria, bases nitrogenadas "no modificadas" o "naturales" incluyen las bases purínicas adenina (A) y guanina (G) y las bases pirimidínicas timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las bases nitrogenadas modificadas incluyen otras bases nitrogenadas sintéticas y naturales tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propil y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil (-C=C-CH<sub>3</sub> o -CH<sub>2</sub>-C=CH) uracilo y citosina y otros derivados alquino de bases pirimidínicas, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8 tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas 8-sustituidas, 5-halo particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas 5-sustituidos, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-amino-adenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-desazaguanina y 7-desazaadenina y 3-desazaguanina y 3-desazaadenina. Otras bases nitrogenadas modificadas incluyen pirimidinas tricíclicas tales como fenoxazina citidina (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), fenotiazina citidina (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzotiazin-2(3H)-ona), abrazaderas G, tales como una fenoxazina citidina sustituida (por ejemplo, 9-(2-aminoetoxi)-H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxazin-2(3H)-ona), carbazol citidina (2H-pirimido[4,5-b]indol-2-ona), piridoindol citidina (H-pirido[3',2': 4,5]pirrol[2,3-d]pirimidin-2-ona). Las bases nitrogenadas modificadas también pueden incluir aquellas en las que la base de purina o pirimidina se sustituye con otros heterociclos, por ejemplo 7-desaza-adenina, 7-desazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Otras bases nitrogenadas incluyen las descritas en Patente US-3.687.808, las divulgadas en THE CONCISE ENCYCLOPEDIA OF POLYMER SCIENCE AND ENGINEERING, Kroschwitz, J.I., ed., John Wiley & Sons, 1990, pp. 858-859 y las divulgadas por Englisch *et al.*, ANGEWANDTE CHEMIE, INTERNATIONAL EDITION, Wiley-VCH, Germany, 1991, 30:613. Algunas de estas bases nitrogenadas son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la invención. Estas incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas, incluyendo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha observado que las sustituciones 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico en 0,6-1,2 °C. (Sanghvi *et al.* ANTISENSE RESEARCH AND APPLICATIONS, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276-278) y son sustituciones de bases preferidas, aún más particularmente cuando se combinan con modificaciones de azúcar 2'-O-metoxietilo. Las patentes de los Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de bases nitrogenadas modificadas incluyen, pero no se limitan a la Patente US-3.687.808, ni tampoco a las Patentes US-4.845.205; US-5.130.302; US-5.134.066; US-5.175.273; US-5.367.066; US-5.432.272; US-5.457.187; US-5.459.255; US-5.484.908; US-5.502.177; US-5.525.711; US-5.552.540; US-5.587.469; US-5.594.121; US-5.596.091; US-5.614.617; US-5.645.985; US-5.830.653; US-5.763.588; US-6.005.096; US-5.681.941 y US-5.750.692.

Otra modificación de los oligonucleótidos antisentido es la unión química al oligonucleótido de uno o más restos o conjugados que mejoran la actividad, la distribución celular o la absorción celular del oligonucleótido. Los compuestos de la invención pueden incluir grupos conjugados unidos covalentemente a grupos funcionales tales como grupos hidroxilo primarios o secundarios. Los grupos conjugados de la invención incluyen intercaladores, moléculas indicadoras, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, poliéteres, grupos que potencian las propiedades

farmacodinámicas de los oligómeros y grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas de los oligómeros. Grupos conjugados típicos incluyen colesteroles, lípidos, lípidos catiónicos, fosfolípidos, fosfolípidos catiónicos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas y colorantes. Los grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas, en el contexto de esta invención, incluyen grupos que aumentan la absorción del oligómero, mejoran la resistencia del oligómero a la degradación y/o refuerzan la hibridación específica de la secuencia con ARN. Los grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas, en el contexto de esta invención, incluyen grupos que aumentan la absorción, distribución, metabolismo o excreción del oligómero. Restos conjugados incluyen, pero no se limitan a restos lipídicos tales como un resto de colesterol (Letsinger *et al.* (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86:6553-6556), ácido cólico (Manoharan *et al.* (1994) Bioorg. Med. Chem. Lett. 4:1053-60), un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritilol (Manoharan *et al.* (1992) Ann. N.Y. Acad. Sci. 660:306-309; Manoharan *et al.* (1993) Bioorg. Med. Chem. Lett. 3:2765-2770), un tiocolesterol (Oberhauser *et al.* (1992) Nucl. Acids Res. 20:533-538), una cadena alifática, por ejemplo, restos dodecandiol o undecilo (Saison-Behmoaras *et al.* (1991) EMBO J. 10:1111-1118; Kabanov *et al.* (1990) FEBS Lett. 259:327-330; Svinarchuk *et al.* (1993) Biochimie 75:49-54, un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o trietil-amonio 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato (Manoharan *et al.* (1995) Tetrahedron Lett. 36:3651-3654; Shea *et al.* (1990) Nucl. Acid Res. 18:3777-3783), una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan *et al.* (1995) Nucleosides & Nucleotides 14:969-973) o ácido acético adamantano (Manoharan *et al.* (1995) Tetrahedron Lett. 36:3651-3654), un resto de palmitilo (Mishra *et al.* (1995) Biochim. Biophys. Acta 1264: 229-237) o un resto octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol. Los oligonucleótidos de la invención también pueden conjugarse con sustancias farmacológicas activas, por ejemplo, aspirina, warfarina, fenilbutazona, ibuprofeno, suprofen, fenbufeno, ketoprofeno, (S)-(+)- pranoprofeno, carprofeno, dansilsarcosina, ácido 2,3,5-triyodobenzoico, ácido flufenámico, ácido folínico, una benzotiazida, clorotiazida, una diazepina, indometacina, un barbitúrico, una cefalosporina, un fármaco sulfa, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico. Conjugados de oligonucleótidos-fármaco y su preparación se describen en las Patentes US-4.828.979; US-4.948.882; US-5.218.105; US-5.525.465; US-5.541.313; US-5.545.730; US-5.552.538; US-5.578.717; US-5.580.731; US-5.580.731; US-5.591.584; US-5.109.124; US-5.118.802; US-5.138.045; US-5.414.077; US-5.486.603; US-5.512.439; US-5.578.718; US-5.608.046; US-4.587.044; US-4.605.735; US-4.667.025; US-4.762.779; US-4.789.737; US-4.824.941; US-4.835.263; US-4.876.335; US-4.904.582; US-4.958.013; US-5.082.830; US-5.112.963; US-5.214.136; US-5.082.830; US-5.112.963; US-5.214.136; US-5.245.022; US-5.254.469; US-5.258.506; US-5.262.536; US-5.272.250; US-5.292.873; US-5.317.098; US-5.371.241; US-5.391.723; US-5.416.203; US-5.451.463; US-5.510.475; US-5.512.667; US-5.514.785; US-5.565.552; US-5.567.810; US-5.574.142; US-5.585.481; US-5.587.371; US-5.595.726; US-5.597.696; US-5.599.923; US-5.599.928; US-5.688.941 y US-6.656.730.

No es necesario que todas las posiciones en un compuesto determinado se modifiquen uniformemente, y de hecho, más de una de las modificaciones anteriormente mencionadas puede incorporarse en un único compuesto o incluso en un solo nucleótido dentro de un oligonucleótido. La presente invención incluye compuestos antisentido que son compuestos quiméricos. Compuestos antisentido "quiméricos" o "quimeras", en el contexto de esta invención, son compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos, que contienen dos o más regiones químicamente distintas, cada una compuesta de al menos una unidad de monómero, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto oligonucleótido. Estos oligonucleótidos contienen generalmente al menos una región en la que el oligonucleótido está modificado con el fin de conferir al oligonucleótido una mayor resistencia a la degradación por nucleasas, una mayor absorción celular y/o una mayor afinidad de unión con el ácido nucleico diana. Una región adicional del oligonucleótido puede servir como sustrato para enzimas capaces de escindir híbridos ARN:ADN o ARN:ARN. A modo de ejemplo, la RNasa H es una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de un dúplex de ARN:ADN. La activación de la RNasa H, por lo tanto, da como resultado la escisión de la diana de ARN, con lo que mejora en gran medida la eficiencia de la inhibición por el oligonucleótido de la expresión génica. En consecuencia, frecuentemente se pueden obtener resultados comparables con oligonucleótidos más cortos cuando se utilizan oligonucleótidos quiméricos, en comparación con desoxioligonucleótidos fosforotioato que se hibridan a la misma región diana. Los compuestos antisentido quiméricos de la invención se pueden formar como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleósidos y/o miméticos de oligonucleótidos como se ha descrito anteriormente. Los oligonucleótidos antisentido quiméricos preferidos incorporan al menos un azúcar modificado en 2' (preferiblemente 2'-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>) en el extremo 3' para conferir resistencia a la nucleasa y una región con al menos 4 2'-H azúcares contiguos para conferir actividad de RNasa H. Tales compuestos también han recibido en la técnica el nombre de híbridos o gapmers. Los gapmers preferidos tienen una región de azúcares modificados en 2' (preferiblemente de 2'-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>) en el extremo 3' y en el extremo 5' separados al menos por una región que tiene al menos 4 2'-H azúcares contiguos y que preferiblemente incorporan enlaces de la cadena principal de tipo fosforotioato. Patentes de los Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichas estructuras híbridas incluyen, pero no se limitan a las Patentes US-5.013.830; US-5.149.797; US-5.220.007; US-5.256.775; US-5.366.878; US-5.403.711; US-5.491.133; US-5.565.350; US-5.623.065; US-5.652.355; US-5.652.356 y US-5.700.922.

Los compuestos antisentido usados de acuerdo con esta invención pueden prepararse convenientemente y rutinariamente mediante la técnica bien conocida de la síntesis en fase sólida. El equipo para dicha síntesis está a la venta por varios vendedores incluyendo, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, Calif.). Adicionalmente o como otra alternativa, se puede emplear cualquier otro medio para dicha síntesis conocido en la técnica. Es bien

conocido el uso de técnicas similares para preparar oligonucleótidos tales como los fosforotioatos y derivados alquilados. Los compuestos de la invención también pueden mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de otro modo con otras moléculas, estructuras moleculares o mezclas de compuestos, como por ejemplo, liposomas, moléculas receptoras específicas, formulaciones orales, rectales, tópicas u otras formulaciones, para facilitar la captación, distribución y/o absorción. Patentes de los Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichas formulaciones para facilitar la captación, distribución y/o absorción incluyen, pero no se limitan a, las patentes US-5.108.921; US-5.354.844; US-5.416.016; US-5.459.127; US-5.521.291; US-5.543.158; US-5.547.932; US-5.583.020; US-5.591.721; US-4.426.330; US-4.534.899; US-5.013.556; US-5.108.921; US-5.213.804; US-5.227.170; US-5.264.221; US-5.356.633; US-5.395.619; US-5.416.016; US-5.417.978; US-5.462.854; US-5.469.854; US-5.512.295; US-5.527.528; US-5.534.259; US-5.543.152; US-5.556.948; US-5.580.575 y US-5.595.756.

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

Los oligonucleótidos antisentido o sentido pueden introducirse en una célula que contiene la secuencia de ácido nucleico diana por cualquier método de transferencia génica, incluyendo, por ejemplo, transfección de ADN mediada por CaPO<sub>4</sub>, electroporación, o mediante el uso de vectores de transferencia génica tales como el virus Epstein-Barr. En un procedimiento preferido, un oligonucleótido antisentido o sentido se inserta en un vector retroviral adecuado. Una célula que contiene la secuencia de ácido nucleico diana se pone en contacto con el vector retroviral recombinante, ya sea *in vivo* o *ex vivo*. Vectores retrovirales adecuados incluyen, pero no se limitan a, aquellos derivados del retrovirus murino M-MuLV, N2 (un retrovirus derivado de M-MuLV) o los vectores de doble copia designados DCT5A, DCT5B y DCT5C (véase el documento WO 90/13641).

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

Como alternativa, un oligonucleótido sentido o antisentido se puede introducir en una célula que contiene la secuencia de ácido nucleico diana mediante la formación de un complejo oligonucleótido-lípido, como se describe en el documento WO 90/10448. El complejo oligonucleótido sentido o antisentido-lípido se disocia preferiblemente dentro de la célula por una lipasa endógena.

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

Las sondas también se pueden emplear en las técnicas de PCR para generar un grupo de secuencias para la identificación de secuencias de codificación de Hhip1 estrechamente relacionadas.

Las secuencias de nucleótidos que codifican para una Hhip1 también se pueden utilizar para construir sondas de hibridación para cartografiar el gen que codifica esa Hhip1 y para el análisis genético de individuos con trastornos genéticos. Las secuencias de nucleótidos proporcionadas en la presente memoria se pueden cartografiar en un cromosoma y en regiones específicas de un cromosoma usando técnicas conocidas, tales como hibridación *in situ*, análisis de ligamiento contra marcadores cromosómicos conocidos y el cribado de hibridación con bibliotecas.

Cuando las secuencias codificantes para Hhip1 codifican para una proteína que se une a otra proteína (ejemplo, cuando la Hhip1 es un receptor), Hhip1 se puede utilizar en ensayos para identificar las otras proteínas o moléculas implicadas en la interacción de la unión. Mediante dichos métodos, pueden identificarse los inhibidores de la interacción de unión receptor/ligando. Las proteínas implicadas en tales interacciones de unión también se pueden utilizar para la detección de inhibidores o agonistas de la interacción de la unión peptídicos o de molécula pequeña. Además, el receptor Hhip1 puede utilizarse para aislar ligando(s) correlativos. Los ensayos de cribado pueden diseñarse para encontrar compuestos prototipo que imitan la actividad biológica de una Hhip1 nativa o de un

receptor para Hhip1. Dichos ensayos de cribado incluirán ensayos susceptibles de cribado de alto rendimiento de bibliotecas de sustancias químicas, haciéndolos particularmente adecuados para identificar candidatos de fármacos de molécula pequeña. Las moléculas pequeñas contempladas incluyen compuestos orgánicos o inorgánicos sintéticos. Los ensayos se pueden realizar en varios formatos, incluyendo ensayos de unión proteína-proteína, ensayos de cribado bioquímico, inmunoensayos y ensayos basados en células, que están bien caracterizados en la técnica.

Los ácidos nucleicos que codifican para Hhip1 o sus formas modificadas también se pueden utilizar para generar animales transgénicos o animales "knock out" (con supresión de un gen) los cuales, a su vez, son útiles en el desarrollo y cribado de reactivos terapéuticamente útiles. Un animal transgénico (por ejemplo, un ratón o una rata) es un animal que tiene células que contienen un transgén, el cual se ha introducido en el animal o en un ancestro del animal en un estadio prenatal, por ejemplo, un estadio embrionario. Un transgén es un ADN que está integrado en el genoma de una célula de la cual se desarrolla un animal transgénico. En una realización, el ADNc que codifica para Hhip1 se puede utilizar para clonar ADN genómico que codifica para Hhip1 de acuerdo con técnicas establecidas y las secuencias genómicas utilizadas para generar animales transgénicos que contienen células que expresan ADN que codifica para Hhip1. Los métodos para generar animales transgénicos, particularmente animales tales como ratones o ratas, se han convertido en convencionales en la técnica y se describen, por ejemplo, en las Patentes US-4.736.866 y US-4.870.009. Normalmente, se podría dirigir la incorporación del transgén de Hhip1 $\beta_{12}$  a células particulares con potenciadores específicos de tejido. Los animales transgénicos que incluyen una copia de un transgén que codifica para Hhip1 introducida en la línea germinal del animal en una etapa embrionaria pueden utilizarse para examinar el efecto de un aumento de la expresión del ADN que codifica para Hhip1. Tales animales pueden utilizarse como animales de ensayo de reactivos que se cree que confieren protección frente a, por ejemplo, trastornos patológicos asociados a su sobreexpresión. De acuerdo con esta faceta de la invención, se trata un animal con el reactivo y la observación de una incidencia reducida del trastorno patológico, en comparación con animales no tratados que llevan el transgén, indicaría una potencial intervención terapéutica para el trastorno patológico.

Como alternativa, se pueden utilizar homólogos no humanos de Hhip1 para construir un animal "knock out" para Hhip1 que tiene un gen defectuoso o alterado que codifica para Hhip1 como resultado de la recombinación homóloga entre el gen endógeno que codifica para Hhip1 y el ADN genómico alterado que codifica para Hhip1 introducido en una célula madre embrionaria del animal. Por ejemplo, se puede usar el ADNc que codifica para Hhip1 para clonar ADN genómico que codifica para Hhip1 de acuerdo con técnicas establecidas. Una porción del ADN genómico que codifica para Hhip1 puede ser suprimido o reemplazado con otro gen, tal como un gen que codifica para un marcador seleccionable que puede utilizarse para controlar la integración. Generalmente, se incluyen en el vector varias kilobases de ADN flanqueante no alterado (tanto en los extremos 5' como 3') (véase, por ejemplo, Thomas y Capecchi (1987) Cell 51:503 para una descripción de los vectores de recombinación homóloga). El vector se introduce en una línea de células madre embrionarias (por ejemplo, por electroporación) y se seleccionan las células en las que el ADN introducido se ha recombinado homológamente con el ADN endógeno (véase por ejemplo, Li *et al.* (1992) Cell 69:915). Las células seleccionadas se inyectan a continuación en un blastocisto de un animal (por ejemplo, un ratón o una rata) para formar quimeras de agregación (véase por ejemplo, Bradley, TERATOCARCINOMAS AND EMBRYONIC STEM CELLS: A PRACTICAL APPROACH, E.J. Robertson, ed., IRL, Oxford, 1987, pp. 113-152). A continuación puede implantarse un embrión quimérico en un animal de acogida hembra pseudopreñada y el embrión se lleva a término para crear un animal "knock out". La progenie que alberga el ADN recombinado homológamente en sus células germinales puede identificarse mediante técnicas estándar y utilizarse para criar animales en los que todas las células del animal contienen el ADN recombinado homológamente. Los animales "knock out" pueden caracterizarse, por ejemplo, por su capacidad para defenderse contra ciertos trastornos patológicos y por su desarrollo de trastornos patológicos debido a la ausencia del polipéptido Hhip1.

El ácido nucleico que codifica para los polipéptidos Hhip1 también se puede utilizar en terapia génica. En aplicaciones de terapia génica, los genes se introducen en células con el fin de lograr la síntesis *in vivo* de un producto genético terapéuticamente eficaz, por ejemplo, para la sustitución de un gen defectuoso. "Terapia génica" incluye tanto la terapia génica convencional en la que se consigue un efecto duradero mediante un único tratamiento como la administración de agentes terapéuticos génicos, que implica la administración única o repetida de un ADN o ARNm terapéuticamente eficaz. Los ARN y ADN antisentido se pueden utilizar como agentes terapéuticos para bloquear la expresión de ciertos genes *in vivo*. Ya se ha demostrado que los oligonucleótidos antisentido cortos se pueden importar en células en las que actúan como inhibidores, a pesar de sus bajas concentraciones intracelulares causadas por su absorción limitada por la membrana celular. (Zamecnik *et al.*, (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83:4143-4146). Los oligonucleótidos se pueden modificar para mejorar su absorción, por ejemplo, mediante la sustitución de sus grupos fosfodiéster cargados negativamente por grupos no cargados.

Existe varias técnicas disponibles para introducir ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas varían dependiendo de si el ácido nucleico se transfiere en células cultivadas *in vitro* o *in vivo* en las células del hospedador pretendido. Las técnicas adecuadas para la transferencia de ácido nucleico en células de mamíferos *in vitro* incluye el uso de liposomas, electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano, el método de precipitación con fosfato de calcio, etc. Las técnicas de transferencia génica *in vivo* actualmente preferidas incluyen la transfección

con vectores virales (generalmente retrovirales) y la transfección mediada por liposomas con las proteínas de la cubierta del virus Dzau *et al.* (1993) Trends in Biotechnology 11:205-210). En algunas situaciones es deseable proporcionar la fuente de ácido nucleico con un agente que se dirige a las células diana, tales como un anticuerpo específico para una proteína de membrana de la superficie celular o la célula diana, un ligando para un receptor en la célula diana, etc. Si se emplean liposomas, se pueden utilizar proteínas que se unen a una proteína de la membrana de la superficie celular asociada a la endocitosis para dirigir y/o facilitar la absorción, por ejemplo, proteínas de la cápside o fragmentos de las mismas trópicas para un tipo de célula particular, anticuerpos para proteínas que experimentan internalización en el ciclo, proteínas que dirigen la localización intracelular y potencian la semivida intracelular. La técnica de la endocitosis mediada por receptor se describe, por ejemplo, por Wu *et al.* (1987) J. Biol. Chem. 262:4429-4432 y Wagner *et al.* (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87:3410-3414. Para una revisión del marcaje del gen y los protocolos de terapia génica véase Anderson *et al.* (1992) Science 256: 808-813.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican para los polipéptidos Hhip1 o fragmentos de los mismos descritos en la presente memoria son útiles para la identificación de cromosomas. En este sentido, existe una continua necesidad de identificar nuevos marcadores cromosómicos, ya que actualmente existen relativamente pocos reactivos de marcado de cromosomas, basados en los datos de la secuencia real. Cada molécula de ácido nucleico Hhip1 de la presente invención se puede utilizar como un marcador cromosómico.

Los polipéptidos y moléculas de ácido nucleico de Hhip1<sub>β12</sub> de la presente invención también se pueden utilizar para el diagnóstico de tipificación de tejidos, en la que los polipéptidos Hhip1 pueden expresarse diferencialmente en un tejido en comparación con otro, preferiblemente en un tejido enfermo en comparación con un tejido normal del mismo tipo de tejido. Las moléculas de ácido nucleico de Hhip1<sub>β12</sub> se pueden usar para generar sondas para PCR, análisis Northern, análisis Southern y análisis Western.

Esta invención abarca métodos de cribado de compuestos para identificar aquellos que imitan al polipéptido Hhip1 (antagonistas de Hedgehog) o previenen el efecto del polipéptido Hhip1 (agonistas). Los ensayos de cribado para fármacos antagonistas candidatos están diseñados para identificar compuestos que se unen o forman complejos con los polipéptidos Hhip1 codificados por los genes identificados en la presente memoria o que de otra manera interfieren con la interacción de los polipéptidos codificados con otras proteínas celulares incluyendo, por ejemplo, la inhibición de la expresión del polipéptido Hhip1 de las células. Dichos ensayos de cribado incluirán ensayos susceptibles de cribado de alto rendimiento de bibliotecas de sustancias químicas, haciéndolos particularmente adecuados para identificar candidatos de fármacos de molécula pequeña.

Los ensayos se pueden realizar en varios formatos, incluyendo ensayos de unión proteína-proteína, ensayos de cribado bioquímico, inmunoensayos y ensayos basados en células, todos los cuales están bien caracterizados en la técnica.

Todos los ensayos de antagonistas son comunes en el sentido de que se basan en el contacto del fármaco candidato con un polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> codificado por un ácido nucleico identificado en la presente memoria en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que estos dos componentes interactúen.

En los ensayos de unión, la interacción es la unión y el complejo formado puede ser aislado o detectado en la mezcla de reacción. En una realización particular, el polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> codificado por el ácido nucleico identificado en la presente memoria o el candidato a fármaco es inmovilizado en una fase sólida, por ejemplo, en una placa de microtitulación, mediante enlaces covalentes o no covalentes. La unión no covalente generalmente se consigue recubriendo la superficie sólida con una solución del polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> y secando. Como alternativa, un anticuerpo inmovilizado, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, específico para el polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> a inmovilizar puede utilizarse para anclarlo a una superficie sólida. El ensayo se realiza añadiendo el componente no inmovilizado, que puede ser marcado con un marcador detectable, al componente inmovilizado, por ejemplo, la superficie recubierta que contiene el componente anclado. Cuando la reacción es completa, los componentes que no han reaccionado son eliminados, por ejemplo, por lavado y se detectan los complejos anclados en la superficie sólida. Cuando el componente originalmente no inmovilizado lleva un marcador detectable, la detección del marcador inmovilizado en la superficie indica la formación de un complejo. Cuando el componente originalmente no inmovilizado no lleva un marcador, se puede detectar la formación de un complejo, por ejemplo, mediante el uso de un anticuerpo marcado que se une específicamente al complejo inmovilizado.

Si el compuesto candidato interactúa pero no se une a un polipéptido Hhip1 particular codificado por un ácido nucleico identificado en la presente memoria, su interacción con ese polipéptido puede ensayarse mediante métodos bien conocidos para detectar interacciones proteína-proteína. Dichos ensayos incluyen enfoques tradicionales, tales como, por ejemplo, reticulación, co-inmunoprecipitación y co-purificación a través de gradientes o columnas cromatográficas. Además, las interacciones proteína-proteína pueden controlarse usando un sistema genético basado en levaduras descrito por Fields y colaboradores (Fields y Song, (1989) Nature 340:245-246; Chien *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88:9578-9582) como se divulga por Chevray y Nathans (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:5789-5793. Muchos activadores transcripcionales, tales como GAL4 de levadura, consisten en dos dominios modulares físicamente discretos, uno que actúa como el dominio de unión a ADN, el otro funcionando como el dominio de activación de la transcripción. El sistema de expresión en levadura descrito en las publicaciones

anteriores (por lo general al que se hace referencia como el "sistema de dos híbridos") se aprovecha de esta propiedad y emplea dos proteínas híbridas, una en la que la proteína diana se fusiona con el dominio de unión a ADN de GAL4 y otra, en la que las proteínas activadoras candidatas se fusionan con el dominio de activación. La expresión de un gen informador GAL1-lacZ bajo el control de un promotor activado por GAL4 depende de la reconstitución de la actividad GAL4 a través de la interacción proteína-proteína. Las colonias que contienen polipéptidos que interactúan se detectan con un sustrato cromogénico para la  $\beta$ -galactosidasa. Un kit completo (MATCHMAKER™) para identificar interacciones proteína-proteína entre dos proteínas específicas utilizando la técnica de dos híbridos está comercializado por Clontech. Este sistema también se puede extender para cartografiar dominios de proteínas implicados en las interacciones de proteínas específicas, así como para identificar restos de aminoácidos que son cruciales para estas interacciones.

Los compuestos que interfieren con la interacción de un gen que codifica para un polipéptido Hhip1 $_{\beta 12}$  identificado en la presente memoria y otros componentes intra o extracelulares pueden ser analizados como sigue: por lo general se prepara una mezcla de reacción que contiene el producto del gen y el componente intra o extracelular en condiciones y durante un tiempo que permite la interacción y unión de los dos productos. Para probar la capacidad de un compuesto candidato para inhibir la unión, la reacción se realiza en ausencia y en presencia del compuesto de ensayo. Además, se puede añadir un placebo a una tercera mezcla de reacción, para servir como control positivo. La unión (formación de complejo) entre el compuesto de ensayo y el componente intra o extracelular presente en la mezcla se controla como se ha descrito anteriormente en la presente memoria. La formación de un complejo en la reacción(es) control, pero no en la mezcla de reacción que contiene el compuesto de ensayo indica que el compuesto de ensayo interfiere con la interacción del compuesto de ensayo y su socio de reacción.

Para ensayar antagonistas, el polipéptido Hhip1 $_{\beta 12}$  se puede añadir a una célula junto con el compuesto a cribar para una actividad particular y la capacidad del compuesto para inhibir la actividad de interés en presencia del polipéptido Hhip1 $_{\beta 12}$  indica que el compuesto es un antagonista del polipéptido Hhip1 $_{\beta 12}$ . Como alternativa, los antagonistas se pueden detectar mediante la combinación del polipéptido Hhip1 $_{\beta 12}$  y un antagonista potencial con receptores de polipéptidos Hhip1 $_{\beta 12}$  unidos a la membrana o receptores recombinantes en condiciones apropiadas para un ensayo de inhibición competitiva. El polipéptido Hhip1 $_{\beta 12}$  puede marcarse, tal como mediante radiactividad, de manera que el número de moléculas de polipéptido Hhip1 $_{\beta 12}$  unidas al receptor se pueda utilizar para determinar la eficacia del antagonista potencial. El gen que codifica para el receptor puede identificarse mediante numerosos métodos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, adsorción del ligando y clasificación FACS. Coligan *et al*, eds., CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, 1 (2): Capítulo 5, 1991. Preferiblemente, se emplea clonación de expresión en la que se prepara ARN poliadenilado a partir de una célula sensible al polipéptido Hhip1 $_{\beta 12}$  y una biblioteca de ADNc creada a partir de este ARN se divide en grupos y se utiliza para transfectar células COS u otras células que no son sensibles al polipéptido Hhip1 $_{\beta 12}$ . Las células transfectadas que se cultivan en portaobjetos de vidrio se exponen al polipéptido Hhip1 $_{\beta 12}$  marcado. El polipéptido Hhip1 $_{\beta 12}$  puede marcarse mediante varios medios que incluyen yodación o inclusión de un sitio de reconocimiento para una proteína quinasa específica del sitio. Después de la fijación e incubación, los portaobjetos se someten a análisis autorradiográfico. Se identifican grupos positivos y los sub-grupos se preparan y se re-transfectan utilizando un proceso de sub-agrupación interactiva y re-selección, produciendo finalmente un único clon que codifica el supuesto receptor.

Ejemplos más específicos de potenciales antagonistas incluyen un oligonucleótido que se une a las fusiones de inmunoglobulina con polipéptido Hhip1, y, en particular, anticuerpos que incluyen, sin limitación, anticuerpos policlonales y monoclonales y fragmentos de anticuerpos, anticuerpos de cadena única, anticuerpos anti-idiotípicos y versiones quiméricas o humanizadas de dichos anticuerpos o fragmentos, así como anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos.

Otro potencial antagonista del polipéptido Hhip1 es una construcción de ARN o ADN antisentido preparada utilizando la tecnología antisentido, donde, por ejemplo, una molécula de ARN o ADN antisentido actúa bloqueando directamente la traducción del ARNm mediante la hibridación con el ARNm diana y evitando la traducción de proteínas. La tecnología antisentido se puede utilizar para controlar la expresión génica a través de la formación de una triple hélice o de ADN o ARN antisentido, estando basados ambos procedimientos en la unión de un polinucleótido a ADN o ARN. Por ejemplo, se usan los ácidos nucleicos que codifican para los polipéptidos Hhip1 $_{\beta 12}$  de la presente memoria para diseñar un oligonucleótido de ARN antisentido de aproximadamente 10 a 40 pares de bases de longitud. Se diseña un oligonucleótido de ADN que sea complementario a una región del gen implicado en la transcripción (triple hélice) - véase Lee *et al.* (1979) Nucl. Acids Res.6: 3073; Cooney *et al.* (1988) Science 241:456; Dervan *et al.* (1991) Science 251:1360), evitando de este modo la transcripción y la producción del polipéptido Hhip1. El oligonucleótido de ARN antisentido híbrida con el ARNm *in vivo* y bloquea la traducción de la molécula de ARNm en el polipéptido Hhip1 (Okano (1991) Neurochem. 56:560; OLIGODEOXYNUCLEOTIDES AS ANTISENSE INHIBITORS OF GENE EXPRESSION, CRC Press, Boca Raton, FL, 1988). Los oligonucleótidos descritos anteriormente también se pueden administrar a células tales que el ARN o ADN antisentido se pueda expresar *in vivo* para inhibir la producción del polipéptido Hhip1. Cuando se utiliza ADN antisentido, se prefieren los oligodesoxirribonucleótidos derivados del sitio de inicio de la traducción, por ejemplo, entre aproximadamente las posiciones -10 y +10 de la secuencia de nucleótidos del gen diana.

Los potenciales antagonistas de Hhip1 incluyen moléculas pequeñas que se unen al sitio activo, el sitio de unión del receptor o factor de crecimiento u otro sitio de unión relevante de la región L2 de Hhip1 $_{\beta 12}$ , bloqueando así la

actividad biológica normal del polipéptido Hhip1. Ejemplos de moléculas pequeñas incluyen, pero no se limitan a, péptidos pequeños o moléculas similares a péptidos, péptidos preferentemente solubles y compuestos orgánicos o inorgánicos no peptídicos sintéticos.

5 Agonistas potenciales de la señalización de Hedgehog incluyen moléculas pequeñas que se unen al sitio activo de la unión Hip/Hedgehog, bloqueando así la actividad biológica normal del polipéptido Hhip1 y evitando la inhibición de la señalización de Hedgehog. Ejemplos de moléculas pequeñas incluyen, pero no se limitan a, péptidos pequeños o moléculas similares a péptidos, péptidos preferentemente solubles y compuestos orgánicos o inorgánicos no peptídicos sintéticos.

10 Las ribozimas son moléculas de ARN enzimáticas capaces de catalizar la escisión específica del ARN. Las ribozimas actúan mediante hibridación específica de la secuencia con el ARN diana complementario, seguido de escisión endonucleolítica. Los sitios específicos de escisión de una ribozima dentro de un ARN diana potencial se pueden identificar por técnicas conocidas. Para más detalles, véase, por ejemplo, Rossi (1994) *Current Biology*, 4:469-471 y la publicación PCT N.º WO 97/33551 (publicada el 18 de septiembre de 1997).

15 Las moléculas de ácido nucleico en formación de triple hélice utilizadas para inhibir la transcripción deberían ser de cadena sencilla y estar compuestas de desoxinucleótidos. La composición de bases de estos oligonucleótidos se diseña de manera que promueve la formación de la triple hélice a través de las reglas de apareamiento de bases de Hoogsteen, las cuales generalmente requieren tramos considerables de purinas o pirimidinas en una hebra de un dúplex. Para más detalles, véase, por ejemplo., la publicación PCT N.º WO 97/33551, *supra*.

20 Estas moléculas pequeñas se pueden identificar mediante uno cualquiera o más de los ensayos de detección discutidos anteriormente en la presente memoria y/o por cualquier otra técnica de detección bien conocida para aquellos expertos en la materia.

25 El ácido nucleico que codifica para el polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> aislado se puede utilizar en la presente memoria para producir de forma recombinante el polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> usando técnicas bien conocidas en la técnica como se describe en la presente memoria. A su vez, los polipéptidos Hhip1<sub>β12</sub> producidos se pueden emplear para generar anticuerpos anti-Hhip1 usando técnicas bien conocidas en la técnica y como se describe en la presente memoria.

30 Los anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> identificado en la presente memoria, así como a otras moléculas identificadas mediante los ensayos de detección descritos anteriormente, se pueden administrar para el tratamiento de varios trastornos, incluyendo cáncer, en forma de composiciones farmacéuticas.

35 Si el polipéptido Hhip1 es intracelular y los anticuerpos completos se utilizan como inhibidores, se prefieren anticuerpos de internalización. Sin embargo, también se pueden usar lipofecciones o liposomas para administrar el anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo, en las células. Cuando se utilizan fragmentos de anticuerpos, se prefiere el fragmento inhibidor más pequeño que se une específicamente al dominio de unión de la proteína diana. Por ejemplo, basándose en las secuencias de la región variable de un anticuerpo, se pueden diseñar moléculas de péptidos que retienen la capacidad de unirse a la secuencia proteína diana. Tales péptidos pueden sintetizarse químicamente y/o producirse mediante tecnología de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Marasco *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7889-7893).

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

50 Los siguientes ejemplos se ofrecen solo para fines ilustrativos, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera.

## 55 Ejemplos

Los reactivos disponibles de forma comercial a los que se hace referencia en los ejemplos se utilizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante a menos que se indique otra cosa.

### 60 Ejemplo 1. Clonación y expresión de las variantes de Hhip1<sub>β12</sub>

#### A. Análisis de secuencia de Hhip1 de ser humano

Para discernir los patrones estructurales subyacentes que ayudan a mostrar los plegamientos de dominio y los límites, se construyó un alineamiento evolutivamente diverso de homólogos de Hhip1 mediante MUSCLE (Edgar, R.C. (2004) *Nucleic Acids Res.* 32:1792-1797) a partir de secuencias recolectadas del Genbank mediante procesamientos PSIBLAST iterativos (Schaffer *et al.* (2001) *Nucleic Acid Res.* 29:2994-3005). A su vez, la predicción de la estructura secundaria de las secuencias alineadas se realizó mediante PSIPRED (McGuffin *et al.* (2000) *Bioinformatics* 16:404-405). Los perfiles de secuencia y los MMO de Hhip1 apuntando a las bases de datos de secuencia y de estructura, fueron capaces de discernir vínculos entre un módulo N-terminal rico en Cys (rico en  $\alpha$ -hélices predichas) y dominios Frizzled supuestos, y así mismo, entre una sección central rica en hebras  $\beta$  de Hhip1 y dominios hélice  $\beta$ . Estas relaciones se corroboraron mediante los resultados de programas de reconocimiento de plegamientos (que dependen de los emparejamientos perfil-perfil a los niveles de secuencia y estructural) como HHPred (Söding, J. (2005) *Bioinformatics* 21:951-960). Los modelos comparativos del dominio hélice  $\beta$  de Hhip1 se construyeron con MODELLER (Sali y Blundell, 1993) *J. Mol. Biol.* 234:779-815). Se detectó la presencia de una secuencia anclaje GPI C-terminal en Hhip1 en lugar de una hélice transmembrana, con la predicción simultánea del resto del sitio de modificación, mediante el servidor big-PI (mendel.imp.ac.at/gpi/gpi\_server) (Eisenhaber *et al.* (1999) *J. Mol. Biol.* 292:741-758).

El análisis asistido por ordenador de la secuencia de Hhip1 <sub>$\beta$ 12DEC</sub> utilizando herramientas sensibles de predicción de estructura y de reconocimiento de plegamientos reveló la presencia de cuatro dominios globulares distintos: un dominio rico en cisteína N-terminal con un plegamiento Frizzled (Fz) supuesto, una hélice  $\beta$  de seis hojas central y dos repeticiones EGF C-terminales (**Fig. 3A**). Además, en lugar de la única hélice transmembrana C-terminal predicha de forma previa para Hhip1 (Chuang y McMahon, 1999), los inventores encuentran un motivo consistente con un sitio de unión anclaje de glicosilfosfatidilinositol (GPI) supuesto (Eisenhaber *et al.* (1999) *J. Mol. Biol.* 292:741-758).

El alineamiento de la secuencia de ADNc que codifica Hhip1 de ser humano y la secuencia de aminoácidos deducida se muestra en la **Fig. 1A-C**. La **Fig. 1B** muestra el bucle L2 (sombreado) de la región hélice supuesta y los restos que son importantes para la unión de Hedgehog. Estos incluyen a D378, E380, E381, M382, D383, y D387. Los restos marcados con un asterisco (\*) indican los aminoácidos que son de importancia principal para la unión de Shh. Los restos marcados con una flecha (†) indican aminoácidos que son de importancia menor o moderada para la unión de Shh.

La secuencia de aminoácidos principal se puede describir adicionalmente en términos generales en regiones supuestas. Estas se muestran en la **Fig. 2A**. La figura muestra la secuencia líder supuesta (SEC ID N°: 3) de los aminoácidos 1-19 de SEC ID N°: 2; el dominio Frizzled supuesto (SEC ID N°: 4) de los aminoácidos 20-192 de SEC ID N°: 2; la región enlazadora supuesta (SEC ID N°: 5) entre los aminoácidos 186-192 de SEC ID N°: 2; el dominio hélice  $\beta$  supuesto (SEC ID N°: 6) de los aminoácidos 193-607 of SEC ID N°: 2 (incluyendo el bucle L2 (SEC ID N°: 7) de los aminoácidos 376-388 (sombreados)); el dominio EGF1 (SEC ID N°: 8) de los aminoácidos 608-637 de SEC ID N°: 2; el dominio EGF2 (SEC ID N°: 9) de los aminoácidos 638-667 de SEC ID N°: 2; y la secuencia señal de GPI supuesta (SEC ID N°: 10) de los aminoácidos 668-700 de SEC ID N°: 2. Los márgenes absolutos de estos dominios se pueden cambiar por algunos aminoácidos, incluyendo por 1, 2, 3, 4, o incluso 5 aminoácidos. Estos delineamientos proporcionados en la **Fig. 2A** se presentan como una guía.

Estos dominios también se discuten en referencia a las construcciones que se produjeron para los estudios presentados en el presente documento. La construcción Hhip1<sub>DEC</sub> (dominio extracelular Hhip1 <sub>$\beta$ 12</sub>) (SEC ID N°: 11) abarca los restos 20-667 de SEC ID N°: 2; la construcción Hhip1<sub>Fz $\beta$</sub>  (Fz-hélice  $\beta$ ) (SEC ID N°: 15) abarca los restos 20-607 de SEC ID N°: 2; la construcción Hhip1<sub>Fz</sub> (dominio Fz) (SEC ID N°: 16) abarca los restos 20-189 de SEC ID N°: 2; la construcción Hip <sub>$\beta$ 12</sub> (hélice  $\beta$ -EGF1-EGF2) (SEC ID N°: 12) abarca los restos 193-667 de SEC ID N°: 2; la construcción Hip <sub>$\beta$ 1</sub> (hélice  $\beta$ -EGF1) (SEC ID N°: 13) abarca los restos 193-637 de SEC ID N°: 2; y la construcción Hip <sub>$\beta$</sub>  (hélice  $\beta$ ) (SEC ID N°: 14) abarca los restos 193-607 de SEC ID N°: 2.

El análisis del bucle L2 de Hhip1 <sub>$\beta$ 12</sub> de ser humano (SEC ID N°: 7) muestra homología con regiones similares en Ptch de ser humano (SEC ID N°: 17), Ptch de ratón (SEC ID N°: 18), Ptch de pollo (SEC ID N°: 19), Ptch de pez cebra (SEC ID N°: 20), Ptch de *Drosophila* (SEC ID N°: 21), Ptch de gusano (SEC ID N°: 22), Ptch2 de ser humano (SEC ID N°: 23), y Ptch2 de ratón (SEC ID N°: 24). Estas secuencias se muestran en la **Fig. 5B**.

## B. Expresión y purificación de variantes de Hhip1 <sub>$\beta$ 12</sub> a partir de células de insecto

Para identificar dominios que median la interacciones con Shh e inhiben la señalización celular, se expresaron en células de insecto las versiones de longitud completa y truncada de Hhip1 <sub>$\beta$ 12</sub>.

Por lo tanto, en referencia a los aminoácidos mostrados en SEC ID N°: 2, se clonaron Hhip1<sub>DEC</sub> etiquetada con 6 histidinas (His<sub>6</sub>) en el N-terminal (restos 20-667), Hip <sub>$\beta$ 12</sub> (restos 193-667), Hip <sub>$\beta$ 1</sub> (restos 193-637), y Hip <sub>$\beta$</sub>  (restos 193-607) conteniendo etiquetas His<sub>6</sub> C-terminales, en el vector Gateway pENTR/D-TOPO (Invitrogen) que incluye la señal de secreción de la melitina de abeja para generar baculovirus recombinante a través del sistema Bac-to-Bac (Invitrogen). Se infectaron células de insecto Tni (1 x 10<sup>6</sup> por ml) en medio ESF921 (Expression Systems) con el baculovirus recombinante con una a M.O.I. de tres. Después de 72 h de incubación las proteínas Hhip1 <sub>$\beta$ 12</sub> se

purificaron del medio mediante cromatografía de afinidad de Ni (Ni-NTA Superflow, Qiagen) y de exclusión por tamaño. La expresión y la purificación de Hip $_{\beta 12}$  marcada con selenometionina (Se-Met Hip $_{\beta 12}$ ) se llevó a cabo como se describe anteriormente, utilizando medio ESF921sin metionina (Expression Systems). El medio se complementó con selenometionina 100 mg/l (Sigma Aldrich) a las 12 y 36 h después de la infección con el virus. Las proteínas se purificaron hasta homogeneidad. La construcción Hhip1 $_{\beta 12}$  para expresar solamente el dominio hélice  $\beta$  supuesto (Hipp) (SEC ID N $^{\circ}$ : 6) no se expresó.

### C. Clonación y expresión de Shh de ser humano

Dhh de ser humano (restos 24-198), Ihh (restos 29-202), Shh $_{N-Cys}$  (restos 24-197), Shh (restos 25-197) y Shh-Flag (restos 25-197 con etiqueta Flag C-terminal) se clonaron en pET101/D-TOPO (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante con una etiqueta His $_6$  N-terminal. Las construcciones de Shh se expresaron en células de *E. coli* Rosetta 2 (Novagen) en medio LB durante 20 h a 25 °C después de la inducción con IPTG 1 mM. Para la expresión de Shh marcada con  $^{15}N$ , las células se cultivaron en medio mínimo. Las células recolectadas se lisaron y Shh se purificó a partir de la fracción citosólica mediante cromatografía de afinidad de Ni y de exclusión por tamaño. Para los estudios de cristalización y de RMN, Shh se incubó con 10 unidades de trombina (Calbiochem) por mg de Shh en PBS durante una noche a 23 °C, produciendo Shh (restos 29-197) que carece de la etiqueta His $_6$ . Finalmente, Shh se purificó utilizando una columna Mono S 5/5 GL (GE Healthcare) y se eluyó con un gradiente lineal de NaCl desde 0-1 M en Hepes 20 mM pH 7,2. Los tampones de purificación para Shh $_{N-Cys}$  contenían  $\beta$ -mercaptoetanol 5 mM durante la cromatografía de afinidad de Ni y DTT 0,5 mM durante la cromatografía de exclusión por tamaño y de intercambio catiónico. Shh $_{N-Cys}$  se conjugó con Maleimida EZ-Link PEO $_2$ -Biotina (Pierce) de acuerdo con el protocolo del fabricante, para producir Shh $_{N-Cys}$  biotinilada. Shh $_{C-Cys}$  se conjugó con Maleimida DyLight 649 (Pierce) para producir Shh fluorescente (Shh $_{649}$ ) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las proteínas expresadas se utilizaron en los experimentos descritos a continuación.

#### Ejemplo 2: Unión de Hedgehog a las variantes de Hhip1 $_{\beta 12}$

Las cinéticas de unión de los fragmentos de Hhip1 $_{\beta 12}$ , así como de los mutantes de Hhip1 $_{\beta 12}$ , se midieron mediante interferometría de biocapa en presencia o ausencia de EDTA 10 mM en un Octet (Fortébio). Los biosensores FA de alta unión de estreptavidina se cargaron con Shh $_{N-Cys}$  biotinilada en tampón de cinética (Fortébio). Los biosensores cargados se lavaron y transfirieron a pocillos que contenían la proteína Hhip1 $_{\beta 12}$  a concentraciones de 1,2, 1,0, 0,8 y 0,6  $\mu$ M en tampón de cinética. La asociación y disociación de Hhip1 $_{\beta 12}$  se midió durante 30 y 20 min, respectivamente. Los parámetros de cinética ( $k_{on}$  (velocidad de disociación) y  $k_{off}$  (velocidad de asociación)) y las afinidades ( $K_D$ ) se calcularon a partir de un ajuste no lineal de los datos basado en un modelo de unión 1:1 entre Hhip1 $_{\beta 12}$  y Shh, utilizando el programa informático Octet. Se realizaron múltiples mediciones independientes.

Los valores de  $K_D$  para la unión de Shh a Hhip1 $_{DEC}$  de longitud completa, una versión truncada que carece del dominio  $F_z$  supuesto (Hip $_{\beta 12}$ ), y Hhip1 $_{\beta 12}$  que contiene solamente la hélice  $\beta$  y los dominios EGF1 (Hip $_{\beta 1}$ ) fueron de 67 nM, 220 nM y 150 nM, respectivamente, según se determina mediante interferometría de biocapa (Tabla 6). También se evaluó mediante ELISA la unión a los 3 homólogos de mamífero utilizando competición (véase el Ejemplo 3).

**Tabla 6. Cinéticas de unión de las variantes de Hhip1 $_{\beta 12}$  a Shh.**

	Variantes de Hhip1 $_{\beta 12}$ <sup>a</sup>	$k_{on} \times 10^3 [M^{-1}Xs^{-1}]^b$	$k_{off} \times 10^{-4} [s^{-1}]^b$	$K_D [nM]^b$
	Hhip1 $_{DEC}$	1,2	7,9	67
	Hhip1 $_{\beta 12}$	4,3	9,4	220
	Hhip1 $_{\beta 1}$	1,5	2,3	150
<b>Bucle<sup>c</sup></b>				
<b>L1</b>	I312A	1,5	4,8	320
	D378A	0,15	3,6	2400
	E380A	n.d	n.d	n.d
<b>L2</b>	E381A	1,1	3,3	300
	M382A	n.d	n.d	n.d
	D383A	n.d	n.d	n.d
	D387A	n.d	n.d	n.d

L3	T418A	3,4	9,0	270
	Q420A	2,1	11,0	500
<sup>a</sup> Todas las variantes de alanina de Hhip1 <sub>β12</sub> se prepararon en la construcción Hhip1 <sub>β12</sub> . <sup>b</sup> n.d. representa unión no detectada. <sup>c</sup> Los restos de bucle en Hhip1 <sub>β12</sub> es como sigue:				

### Ejemplo 3:

#### 5 A. Ensayo de cocultivo de señalización de Gli luciferasa y ensayo de Hip-Fc

Debido a la falta de las modificaciones lipídicas N- y C-terminales de Shh y a la ausencia de otros componentes celulares, los ensayos *in vitro* pueden no recapitular de forma completa las interacciones Hip-Shh que se producen en un entorno celular. Por lo tanto, se utilizó un ensayo de cocultivo que consiste en fibroblastos S12 murinos transfectados de forma estable con un gen indicador *Gli* luciferasa (Frank-Kamenetsky *et al.* (2002) J. Biol. 1:10) y células HT29 de adenocarcinoma colorrectal de ser humano que secretan Shh totalmente modificada con lípidos (Yauch *et al.* (2008) Nature 455:406), para determinar qué dominios extracelulares de Hhip1<sub>β12</sub> median la inhibición de la señalización de Shh en células de mamífero.

Brevemente, células S12, las cuales son fibroblastos 10T1/2 transfectados de forma estable con 8 sitios de unión a Gli fusionados a un indicador de luciferasa (Frank-Kamenetsky *et al.* (2002) J. Biol. 1:10), se sembraron en placa a 10.000 células/pocillo en una placa de 96 pocillos de paredes blancas y fondo (Costar 3610) durante 48 h en un medio de crecimiento regular (HG-DMEM, SFB al 10 %, glutamina al 1 %). Después de 24 h, el medio se retiró y las células HT29 que producían Shh se sembraron en placa a 20.000 células/pocillo y el cocultivo se cultivó en medio regular. Después de 24 h, se cambió el medio a HG-DMEM con suero al 0,5 % ± fragmentos de Hhip1<sub>β12</sub> y se incubó adicionalmente durante 24 h para estimular la señalización. La actividad Gli-luciferasa se midió utilizando un kit de detección de luciferasa HTS-Steady Lite (Perkin Elmer); se llevaron a cabo múltiples ensayos, cada uno en triplicado. Los datos se ajustaron a una ecuación sigmoideal de 4 parámetros, de la que se obtuvo la CI<sub>50</sub> utilizando Kaleidagraph (Synergy Software). Los resultados se muestran en la **Fig. 3B**.

Hhip1<sub>DEC</sub> y Hhip1<sub>β12</sub> fueron potentes inhibidores por igual de la señalización de Hh, con valores de CI<sub>50</sub> de 5,3 nM y 5,0 nM, respectivamente, mientras que Hip<sub>β1</sub> tenía un CI<sub>50</sub> de 20,3 nM, solo aproximadamente 4 veces mayor que Hhip1<sub>DEC</sub> (**Fig. 3B**).

Para confirmar que el dominio Fz supuesto (Hhip1<sub>Fz</sub>) es prescindible para la inhibición en este ensayo, los inventores lo expresaron y purificaron como una proteína de fusión a Fc (Hhip1<sub>Fz-Fc</sub>). Brevemente, se clonó Hhip1<sub>β12</sub> de ser humano (20-193) en el vector de expresión pRK5 (Genentech) con una señal de secreción gD N-terminal (MGGAARLGAVILFVVIVGLHGVRG) (SEC ID N°: 41) y un fragmento Fc de ser humano C-terminal (IgG<sub>1</sub>). La construcción se expresó en células 293 mediante transfección transitoria utilizando FuGENE 6 (Roche) y después de 5 días de incubación se purificó utilizando resina proteína A (GE Healthcare) seguido de cromatografía de exclusión de tamaño (columna S-200, GE Healthcare). De forma coherente con los datos anteriores, la construcción de fusión a Fc carecía de cualquier actividad inhibitoria (**Fig. 3B**). En conjunto, estos datos ponen de manifiesto que la región mínima de Hhip1<sub>β12DEC</sub> necesaria para la unión de las tres Hedgehogs de mamífero y mediar su efecto antagonista completo, está contenida en la hélice β y los dominios EGF, teniendo el dominio EGF2 solo un papel menor.

#### B. ELISA de competición de péptidos

La unión a los 3 homólogos Hh de mamífero utilizando competición también se evaluó utilizando ELISA. Brevemente, placas de 96 pocillos Nunc-Immuno MaxiSorp (Nalge Nunc International) se recubrieron con 100 μl de Hhip1<sub>β12</sub> a 2 μg/ml en tampón bicarbonato de sodio 50 mM pH 9,6 a 4 °C durante una noche. Las placas se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente con 100 μl de tampón de bloqueo (PBS conteniendo BSA al 0,5 % y Proclin 15 PPM) en un agitador de placas. El tampón de bloqueo se retiró y se añadió a los pocillos una dilución seriada de Dhh, Ihh, o Shh (comenzando en 10 μM, dilución 1:4) conteniendo Shh<sub>N-Cys</sub> biotinilada 5 nM en un volumen final de 100 μl, para competir por la unión a Hhip1 inmovilizada. Después de la incubación durante 1 h a temperatura ambiente en agitador de placas, los pocillos se lavaron con tampón de lavado (Hepes 50 mM pH 7,2, NaCl 150 mM, Tween al 0,1 %) y se incubó durante 1 h con estreptavidina-HRP (Pierce) en tampón de bloqueo de acuerdo con el protocolo del fabricante. Después de eso, la placa se lavó otra vez con tampón de lavado y se incubó con 100 μl de mezcla de reactivos BD OptEIA (relación 1:1, BD Bioscience) hasta que la solución se volvió azul claro. Después, la reacción se interrumpió mediante la adición de 100 μl de ácido (H<sub>3</sub>PO<sub>3</sub> 1 M) y la densidad óptica a 450nm (DO<sub>450</sub>) se midió con un lector de placas SpectraMAX (Molecular Devices). La DO<sub>450</sub> se representó contra la concentración de Ihh, Dhh y Shh y la CI<sub>50</sub> de las curvas se determinó en triplicado mediante un ajuste sigmoideal de 4 parámetros a los datos, utilizando Kaleidagraph (Synergy Software). Los resultados se muestran en la **Fig. 8A**.

La afinidad de Hip $_{\beta 12}$  por Lhh (CI $_{50}$  = 87 nM), Dhh (CI $_{50}$  = 40 nM) o Shh (CI $_{50}$  = 53 nM) (**Fig. 8A**), era coherente con resultados publicados de forma previa para Hhip1 de longitud completa (Chuang y McMahon (1999) Nature 397:617-621; Pathi, S. *et al.* (2001) Mech. Dev. 106:107-117).

### 5 C. Competición de la unión de Shh a Ptch1 por Hhip

Se incubó Shh $_{649}$ , conjugada a Dylight 649 (Pierce) en su extremo C-terminal (véase anteriormente), a 0,33 o 1 nM durante 1 h en hielo con diversas proteínas Hhip o de control, antes de la incubación con células HEK-293 (293) o células 293 expresando Patched-1 de ser humano de longitud completa (Ptch1-293 clon 10) (Carpenter D. *et al.* (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:13630-13634) en tampón de FACS (SFB al 3 % en PBS) durante 1 h en hielo. Después de lavar tres veces en tampón de FACS, las células vivas (seleccionadas mediante exclusión de yoduro de propidio) se analizaron mediante citometría de flujo en el canal APC utilizando un FACSCalibur (BD Biosciences). Las proteínas de control incluían His6-Shh, His6-Lhh, HGF  $\beta$ -His $_{639}$ , Trastuzumab (Genentech, Inc.) como un control de isotipo de IgG1 de ser humano para Hhip1 $_{\beta 12}$ -Fc, y mlgG1 (Molecular Probes Z25105) como un control de Acm murino para el Acm34 anti-Shh 5E1. Los resultados se muestran en la **Fig.14C**.

### D. Mapeo del epítipo 5E1

Se incubó 5E1 unido a esferas de agarosa con Shh, digerida de forma parcial con tripsina, después los péptidos no digeridos se eluyeron e identificaron mediante espectrometría de masas, como se describe de forma previa (Kiselyov, A.S. *et al.* (2007) Expert Opin. Ther. Targets 11:1087-1101). Esto mostró el péptido 158-178 (**Fig. 8b**) de acuerdo con datos previos, que abarca al resto S177 (Fuse N. *et al.* (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. 96:10992-10999; Pepinsky, R.B. *et al.* (2000) J. Biol. Chem. 5:154-156). El epítipo probablemente se extiende hasta más allá del sitio de escisión triptico en K178, abarcando los restos que difieren entre Shh/Lhh y Dhh para explicar la menor afinidad por Dhh (véase más adelante).

### E. Afinidad de unión de 5E1 a Shh mediante resonancia de plasmón superficial

Las determinaciones de la afinidad de unión por Shh de ser humano (25-197), Dhh, o Lhh a 5E1, se realizaron mediante resonancia de plasmón superficial utilizando un BIAcore<sup>TM</sup>-2000. Se inmovilizó IgG (882 a 991 UR) en acetato de sodio 10 mM pH 4,8 en un chip sensor CM5 y se inyectaron diluciones seriadas al tercio de diversas formas de Shh (0,3 - 1000 nM) en PBST a un caudal de 30  $\mu$ l/min. Cada muestra se analizó con tiempo de asociación de 4 minutos y tiempo de disociación de 10 min. Después de cada inyección el chip se regeneró utilizando glicina 10 mM pH 1,7. La respuesta de unión se corrigió mediante la sustracción de la celda de flujo 1 de IgG de control de las celdas de flujo de 5E1. Se utilizó un modelo Langmuir 1:1 de ajuste simultaneo de  $k_{on}$  y  $k_{off}$  para el análisis de las cinéticas. 5E1 se unió con afinidad similar ( $\sim$ 3 nM) a Shh e Lhh, pero tenía afinidad significativamente menor por Dhh.

### Ejemplo 4: Cristalización, recolección de datos y solución de estructura

#### A. Formación y características de cristales

Habiendo definido el dominio Hip $_{\beta 12}$  como esencial para la unión y la inhibición de la señalización de Shh, los inventores exploraron las bases moleculares para esta actividad mediante la determinación de las estructuras de Hhip1 y de los complejos Hip-Shh.

Se crecieron cristales de apo Hip $_{\beta 12}$  mediante difusión por vapor por gota colgante atípica a 19 °C, poniendo muestras de proteína (0,3-2  $\mu$ l) sobre 500  $\mu$ l de solución de depósito de Hepes 20 mM pH 7,2 y NaCl 3 M. Dentro de las 48 h aparecieron cristales rectangulares y se crecieron durante una semana, con la dimensión más larga excediendo los 0,8 mm. Los mejores cristales difractantes (normalmente 0,25 x 0,25 x 0,10 mm<sup>3</sup>) se transfirieron a una gota de 2  $\mu$ l de HEPES 20 mM pH 7,2 y NaCl 3 M y se colocaron sobre 500  $\mu$ l de solución de depósito de HEPES 20 mM pH 7,2 y NaCl 5 M. Después de 16-24 h de deshidratación, los cristales se remojaron durante 30 s en HEPES 20 mM pH 7,2, NaCl 5 M antes de la refrigeración instantánea en nitrógeno líquido. Se recolectó MAD basado en Se-Met de tres longitudes de onda a 100 K en 9-2 en línea de luz 9-2 en el Stanford Synchrotron Radiation Laboratory (SSRL). Los valores estadísticos de la cristalografía se resumen en la **Tabla 7**.

Se creció una forma distinta de cristal de apo Hip $_{\beta 12}$  mediante difusión por vapor por gota colgante a 19 °C mediante la combinación de 1,5  $\mu$ l de solución de proteína con 1,5  $\mu$ l de solución de depósito (acetato de sodio 0,1 M, sulfato de amonio 0,2 M, PEG 4000 al 22-24 % y dioxano al 1-2 %). Los cristales aparecieron dentro de una semana y crecieron hasta el tamaño total en 7-14 días. Antes de la refrigeración instantánea en nitrógeno líquido los cristales se crioprotegieron de forma gradual en una solución de depósito complementada con glicerol (concentración final de glicerol del 5 %, 10 %, 15 % y 20 % v/v). Los datos nativos se recogieron a 100 K en la línea de luz Advanced Light Source (ALS) 5.0.2.

Se generaron cristales iniciales del complejo Hip $_{\beta 12}$ -Shh mediante difusión por vapor por gota colgante a 19 °C mediante la combinación de 1  $\mu$ l de muestra de proteína y 1  $\mu$ l de solución de depósito (bis-Tris propano 0,1 M pH

7,0 y formiato de sodio 2,8-3,0 M). Aquellos aparecieron después de 4 días y crecieron grandes con la dimensión más larga excediendo los 0,3 mm. Estos cristales eran de calidad muy pobre y se necesitó una serie de etapas de microsiembra y macrosiembra para cristales adecuados para la recolección de datos. Una sucesión de siembras estriadas en una gota de proteína preequilibrada (48 h) mejoró la calidad del cristal de tal forma que la macrosiembra fue factible. Los cristales pequeños, con dimensiones de aproximadamente 0,20, mm se lavaron y se transfirieron a una gota preequilibrada con una solución de depósito que contenía bis-Tris propano 0,1 M pH 7,0 y formiato de sodio 2,2 M. Debido a que el crecimiento lento fue esencial para obtener cristales adecuados para la difracción de rayos X, se implementaron procedimientos complejos y de varias etapas extensas utilizando placas de 24 pocillos con tapa a rosca NeXtal. Normalmente, los cristales se incubaron en solución de depósito durante 4-7 días antes de transferirlos a condiciones en las cuales la concentración de formiato de sodio se elevó a 0,1 M. Este proceso se repitió cuatro veces con un depósito final conteniendo bis-Tris propano 0,1 M pH 7,5 y formiato de sodio 2,5 M. Los cristales de mejor calidad, que medían 0,09 x 0,09 x 0,05 mm<sup>3</sup> se produjeron en un período de 4-6 semanas. Los datos nativos anisotrópicos se recolectaron en línea de luz SSRL 11-1.

Todos los conjuntos de datos se procesaron utilizando HKL2000 (Otwinowski y Minor (1997) *Methods Enzymol.* 276: 307-325). Se localizaron nueve sitios de selenio y se realizó el refinamiento de fase para apo Hip<sub>β12</sub> cristalizada en el grupo de espacio de P<sub>3</sub><sub>1</sub>21 con autoSHARP (Bricogne, G. *et al.* (2003) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 59: 2023-30). El aplanamiento de disolvente con contenido de disolvente del 66 % mejoró de forma significativa la calidad del mapa experimental. La construcción del modelo atómico manual en la densidad electrónica experimental se hizo en Coot (Emsley y Cowtan (2004) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 60: 2126-2132). Las estructuras de apo Hhip1<sub>β12</sub> en el grupo de espacio C222<sub>1</sub>, y el complejo Hhip1<sub>β12</sub>-Shh se resolvieron mediante reemplazo molecular con Phaser (McCoy, A. J. *et al.* (2005) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 61: 458-464) utilizando las coordenadas refinadas de la forma cristalina de P<sub>3</sub><sub>1</sub>21 como un modelo de búsqueda para la estructura cristalina de Hhip1<sub>β12</sub> y Shh (código PDB 1VHH). El refinamiento de todas las estructuras se hizo con Refmac (Winn, M. D. *et al.* (2001) *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 57: 122-133). Los valores estadísticos de la cristalografía se resumen en la **Tabla 7**.

Hhip1<sub>β12</sub> purificada cristalizó en los sistemas trigonal y ortorrómbico (grupo espacial C222<sub>1</sub>) con modelos finales refinados a una resolución de 3,1 Å y 2,9 Å, respectivamente (los valores estadísticos estructurales se resumen en la **Tabla 7**). La siguiente discusión sobre la estructura de apo Hhip1<sub>β12</sub> se basa en las observaciones de los cristales trigonales con algunas diferencias entre las dos formas destacadas en consecuencia.

La alta afinidad entre Hip<sub>β12</sub> y Shh permitió el aislamiento de un complejo estable con una estequiometría de 1:1, el complejo se aisló mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Sorpresivamente, el complejo cristalizó en el mismo grupo espacial trigonal que el cristal de apo con parámetros de celda unitaria casi idénticos y se difractó a una resolución de 3,0 Å (**Tabla 7**). La unidad asimétrica contenía dos moléculas de Hhip1<sub>β12</sub> en la misma orientación que en la forma apo, y dos moléculas de Shh, cada una creando un complejo heterodimérico 1:1. Sin embargo, la densidad de una de las moléculas de Shh fue extremadamente pobre debido a la carencia de interacciones de empaquetamiento cristalino estabilizantes; esta copia de Shh no se incluyó en el modelo final.

**Tabla 7. Valores estadísticos cristalográficos**

Proteína	Apo Se-Met Hhip1 <sub>β12</sub>			Apo Hhip1 <sub>β12</sub>	Complejo Hhip1 <sub>β12</sub> -Shh
<i>Recolección de datos</i>					
	Pico Se	Inflexión Se	Se Remoto		
Grupo espacial	P <sub>3</sub> <sub>1</sub> 21			C222 <sub>1</sub>	P <sub>3</sub> <sub>1</sub> 21
Dimensión de celda unitaria (Å)	a=101,0, b=101,0, c=304,9			a=86,2, b=118,0, c=126,3	a=101,6, b=101,6, c=302,8
Longitud de onda (Å)	0,97940	0,97955	0,91176	1,0000	0,97839
Resolución (Å)	30-3,1	30-3,1	30-3,1	30-2,8	50-3,0
Completitud (%) <sup>a</sup>	99,8 (99,2)	99,8 (99,3)	99,6 (98,9)	99,8 (100)	99,8 (100)
Reflexiones únicas	33,657	33,672	33,626	14,755	37,106
Redundancia	5,3 (5,1)	5,3 (5,1)	5,2 (4,9)	4,7 (4,8)	8,7 (8,9)
Rsym (%) <sup>b</sup>	7,4 (56,8)	7,6 (60,1)	7,7(64,4)	8,9(49,1)	8,5 (58,9)
<I>/<σ(I)>	21,2 (2,9)	20,7(2,8)	20,6 (2,4)	14,4 (3,5)	24,2 (4,3)

<i>Valores estadísticos de fase</i>					
Potencia de fase (iso)	0,328	0,415	0		
Potencia de fase (anom)	0,487	0,454	0,273		
FOM acéntrico, céntrico	0,25/0,2				
<i>Valores estadísticos de refinamiento</i>					
Resolución (Å)	30-3,1			30-2,9	30-3,0
R <sub>crist</sub> (%) <sup>c</sup>	22,1			26,1	23,6
libre (%)	25,2			30,7	29,5
N.º de átomos de proteína	6,590			3,364	7,876
N.º de átomos de iones					4
Factor B promedio (Å <sup>2</sup> )	71,3			93,8	61,5
Enlaces Rmsd (Å)	0,008			0,007	0,008
Ángulos (°)	1,3			1,15	1,223
Gráfico de Ramachandran (%) <sup>d</sup>	80,8, 16,7, 1,7, 0,8			78,2, 17,9, 2,5, 1,4	84,4, 13,7, 0,9, 0,9
<sup>a</sup> Números en paréntesis se refieren a las conchas de resolución mayores. <sup>b</sup> $R_{sim} = \sum  I - \langle I \rangle  / \sum I$ . $\langle I \rangle$ es la intensidad promedio de las observaciones relacionadas con la simetría de una reflexión única. <sup>c</sup> $R = \sum  F_o - F_c  / \sum F_o$ , <sup>d</sup> Porcentaje de restos en las regiones más favorecidas, adicionalmente permitidas, generosamente permitidas, y no permitidas de un gráfico de Ramachandran.					

El fragmento Hhip1<sub>β12</sub> presente en las estructuras cristalinas de los inventores contiene un dominio hélice β de seis láminas canónico y dos dominios EGF, con la estructura global que se asemeja a una piruleta (**Fig. 3C**). El dominio hélice β representa la cabeza (65 x 50 x 50 Å<sup>3</sup>) de la piruleta y los dos dominios EGF crean el tallo (40 x 15 x 15 Å<sup>3</sup>). Están presentes cuatro enlaces disulfuro intradominio dentro de la hélice β y tres dentro de cada uno de los dominios EGF. Las estructuras de Shh y el núcleo de la β hélice de Hhip1<sub>β12</sub> permanece en gran medida inalterado después de la formación del complejo (rmsd de Shh = 0,38 Å (restos 40-187)); (rmsd de Hhip1<sub>β12</sub> = 0,39 Å (restos 215-606)), con la excepción de los bucles de unión a Shh periféricos en Hhip1<sub>β12</sub> que en general están más definidos en el complejo.

Una búsqueda en el Protein Data Bank (PDB) con el programa SSM (Krissinel y Henrick, 2004) reveló que el dominio hélice β de Hhip1 se superpuso mejor con las estructuras de rayos X de la quinoproteínas solubles glucosa deshidrogenasas de bacterias y arqueas (códigos de PDB 2ISM, 2G8S y 1CRU), con los rmsd variando desde 2,2-2,4 Å sobre las posiciones C<sub>α</sub> alineadas 271-284 con una identidad de secuencia del 23 %. Estas proteínas son miembros de una familia más grande de enzimas de bacterias y arqueas que, notablemente, utilizan un cofactor pirroloquinonina quinona (PQQ) altamente reactivo que se une a la cavidad central de sus plegamientos de hélice β de seis láminas (Oubrie, 2003). La inspección minuciosa de las hélices β superpuestas de Hhip1 y de estas deshidrogenasas seleccionadas, muestra que Hhip1 carece de restos de coordinación de PQQ y que el correspondiente bolsillo de unión es más pequeño y está más expuesto a disolventes. La relación estructural observada de Hhip1 con un clan de enzimas dependientes de PQQ bacterianas plantea la interesante cuestión de si la familia Hhip1 de mamíferos es una rama muy divergente que ha perdido la función enzimática pero ha ganado un nuevo papel de interacción proteica.

Todas las figuras estructurales se generaron utilizando Pymol (DeLano, W. L. (2002) The PyMOL Molecular Graphics System, Palo Alto, CA, Estados Unidos, DeLano Scientific) que se puede encontrar en la Red de Redes con una dirección URL de pymol.com.

## B. El dominio EGF1 se asocia de forma íntima con la hélice $\beta$

En las cinco estructuras cristalográficamente independientes de Hhip1, tres para la forma apo y dos unidas a Shh, los dominio hélice  $\beta$  y EGF1 se superponen bien, sugiriendo que forman una unidad rígida (**Fig. 3D**). EGF1 está espacialmente restringido por una interacción íntima con las láminas 2 y 3 de la hélice  $\beta$ . La interfaz resultante entre los dos dominios es de naturaleza hidrófila así como hidrófoba, con un enlace disulfuro formado entre C402 en la lámina 3 de la hélice  $\beta$  y C624 en EGF1 (**Fig. 3E**). La naturaleza íntima de esta interacción explica la inestabilidad de la construcción de Hhip que carece del dominio EGF1 (**Fig. 9**). La estrecha interacción entre la hélice  $\beta$  de Hhip y el dominio EGF1 se asemeja los contactos hechos entre la segunda y la tercera lámina del dominio hélice  $\beta$  de seis láminas del receptor de lipoproteína de baja densidad (RLBD) y su dominio EGF C-terminal (Jeon *et al.*, 2001). De forma notable, la interfaz es considerablemente más grande en el caso del RLBD con las cadenas laterales hidrófobas predominando. A diferencia de EGF1, la orientación de EGF2 con respecto a la hélice  $\beta$  muestra variación significativa, probablemente debido a la flexibilidad inherente de la región enlazadora entre los dos dominios EGF (**Fig. 3D**). Aquí la flexibilidad y muy probablemente entre el dominio EGF2 y la membrana, implica que en la Hhip1 $_{\beta 12DEC}$  hay algo de libertad conformacional con respecto a la membrana plasmática.

## C. Hhip1 $_{\beta 12}$ interactúa con Shh a través de tres bucles

El sitio de unión a Shh está localizado en la periferia del dominio hélice  $\beta$  de Hhip1 $_{\beta 12}$ , alejado del tallo de EGF (**Fig. 4 A y B**). Tres bucles de la segunda y la tercera lámina de Hhip1 $_{\beta 12}$  (L1: 309-314, L2: 376-388 y L3: 417-422) contactan una región de Shh centrada en la hendidura que contiene  $Zn^{2+}$  (**Fig. 4 A-C**). Los bucles L1 y L2 presentan evidencia de conformaciones múltiples en las estructuras de apo Hhip1 $_{\beta 12}$ , indicando que la unión a Shh restringe su conformación. La interfaz es grande, comprendiendo 23 restos de Hhip1 y 29 restos de Shh, lo que explica el área de superficie accesible a disolvente hundida de 870 Å<sup>2</sup> y 780 Å<sup>2</sup>, respectivamente. La localización y la extensión de la interacción es coherente con los datos de unión *in vitro* de los inventores, que muestran que la región mínima de unión se encuentra dentro del fragmento de proteína que abarca la hélice  $\beta$  y EGF1 (**Tabla 6**). Aunque el dominio EGF1 no se pone en contacto con Shh, no obstante es necesario debido a que estabiliza la hélice  $\beta$  (véase anteriormente). Es interesante advertir que los extremos N- y C-terminales de Shh, que están modificados con lípidos *in vivo*, así como el extremo C-terminal de Hhip1 $_{\beta 12}$ , están en el mismo lado del complejo, lo que sugiere que ambos componentes podrían estar anclados a la misma membrana celular.

El bucle L2 de Hhip1 $_{\beta 12}$  se inserta de manera profunda en la hendidura que contiene  $Zn^{2+}$  de Shh y constituye el corazón de la interacción. Aproximadamente, 500 Å<sup>2</sup> de la superficie de L2 de Hhip1 $_{\beta 12}$  está en contacto directo con Shh, lo que explica el ~ 60 % de la superficie total de Hhip1 $_{\beta 12}$  en contacto con Shh. Están presentes extensas interacciones de cadenas laterales entre Shh y el bucle L2, además de algunas interacciones entre la cadena principal y la cadena lateral. Curiosamente, D383 en el bucle L2 de Hhip1 $_{\beta 12}$  interacciona de manera directa con el catión  $Zn^{2+}$  en Shh, dando lugar a la coordinación del tetraedro (**Fig. 4D**). En la estructura de alta resolución de apo Shh murina (Hall, T.M. *et al.* (1995) Nature 378:212-216), una molécula de agua reemplaza a D383 mientras que los restos que coordinan  $Zn^{2+}$  en Shh, H141, D148, y H183 (H140, D147, H182 en Shh de ser humano) son idénticos en las estructuras unida y apo (**Fig. 4D y 8B**). A diferencia de las extensas interacciones que hace el bucle L2 de Hhip1 $_{\beta 12}$ , los contactos de los bucles L1 y L3 parecen más superficiales e implican un área de superficie significativamente menor en la periferia del sitio de unión (**Fig. 4C**). Es notable que el sitio de unión a Hhip en Shh incluye los restos E176-K178, cuya delección está asociada a la presentación clínica de microcefalia y un cuerpo calloso parcial (Dubourg *et al.*, 2004).

Se cree que las interacciones de Hhip1 $_{\beta 12}$  con Hedgehog demostradas en el presente documento son las mismas interacciones que se presentan entre Hhip1 nativa y Hedgehog.

### Ejemplo 5:

#### A. $Zn^{2+}$ y la interacción entre Hip y Shh

Para caracterizar la importancia del catión  $Zn^{2+}$  en la mediación de las interacciones entre Hhip y Shh, los inventores realizaron estudios de unión en presencia de EDTA. Shh marcada con <sup>15</sup>N se preparó con medio M9 complementado con <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl, del mismo modo que la proteína nativa (véase Ejemplo 1D). El espectro <sup>15</sup>N, <sup>1</sup>H-HSQC se registró con <sup>15</sup>N-Shh 90 nM en tampón PBS complementado con D<sub>2</sub>O al 10 % (v/v), a 32 °C en un espectrómetro Bruker DRX600 MHz equipado con una criosonda de triple resonancia inversa de 5 mm. Los estudios de  $Zn^{2+}$  de Shh marcada con <sup>15</sup>N se llevaron a cabo en presencia o ausencia de EDTA 10 nM.

De forma coherente con la idea de que la interacción de Hip $_{\beta 1}$  con Shh es dependiente de  $Zn^{2+}$ , en presencia de EDTA la unión se suprimió de forma completa (**Fig. 10A**). Es importante destacar que la pérdida del catión  $Zn^{2+}$  no tiene un efecto significativo sobre la estructura de Shh o la estabilidad, como se demuestra mediante los espectros virtualmente idénticos de RMN en ausencia o presencia de EDTA (**Fig. 10B**). Las diferencias espectrales menores son consistentes con cambios locales en los restos de unión a cinc después del desplazamiento de  $Zn^{2+}$ . Además, la estructura terciaria de Shh es casi idéntica a la de Hh de *Drosophila* (McLellan, J. S. *et al.* (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:17208-17213), la cual es incapaz de unir  $Zn^{2+}$  en el sitio homólogo debido a las diferencias en los

restos de la hendidura (**Fig. 10 C y D**). Aunque el EDTA también puede secuestrar otros cationes divalentes (véase el sitio de  $\text{Ca}^{2+}$  a continuación) los inventores creen que la interacción de  $\text{Zn}^{2+}$  es crítica para el ensamblado del complejo debido a que  $\text{Zn}^{2+}$  es el único catión divalente unido a Shh que interactúa de forma directa con Hhip1.

## 5 B. Papel de L1, L2 y L3 en la unión a Hedgehog

Para evaluar la contribución de los restos en la unión de los bucles L1, L2 y L3 de Hhip1 a Shh, se preparó una serie de mutantes únicos de alanina de Hhip $_{\beta 12}$  utilizando el kit de mutagénesis QuickChange DNA (Stratagene) utilizando el protocolo del fabricante, y se midió su afinidad por Shh mediante interferometría de biocapa (según se describe en el Ejemplo 2B). Estas mutaciones incluían a los mutantes de Hhip1 $_{\beta 12}$  I312A, E381A, M382A, D383A, D378A, T418A, Q420A, E380A, D387A y  $\Delta\text{L2}$ .

Los resultados se muestran en la **Tabla 6** y en las **Figs. 4E y 4F**. Como se esperaba, la delección del bucle L2 completo (Hhip1 $_{\Delta\text{L2}}$ ) anula la unión a Shh. La importancia del catión  $\text{Zn}^{2+}$  para establecer la interacción entre Hhip1 $_{\beta 12}$  y Shh se destacó adicionalmente por la incapacidad de los mutantes de Hhip L2 D383A y L2 D383R para unir Shh. Las sustituciones a alanina en los restos de L2 E380, M382, y D387 también anularon la unión a Shh. Los restos E380 y D387 tienen interacciones directas con Shh, mientras que M382 no se pone en contacto con Shh y probablemente funciona mediante la estabilización del bucle L2 en una conformación que es competente para la unión. Otras dos mutaciones en L2, D378A y E389A, tienen efectos menores a moderados sobre la unión a Shh (**Tabla 6, Fig. 4E**). A diferencia de los cambios en el bucle L2, las mutaciones únicas de alanina en los bucles L1 (I312A) o L3 (T418A, Q420A) tenían poco efecto sobre Shh, uniéndose con valores de  $K_D$  comparables a Hhip1 $_{\beta 12}$  natural (**Tabla 6, Fig. 4F**). Los datos de afinidad del mutante de alanina son consistentes con la hipótesis de que el bucle L2 es un determinante energético principal para la unión a Shh.

De forma un tanto inesperada, el mutante D383A retuvo la actividad en el ensayo de cocultivo de Gli-luciferasa, más complejo y fisiológicamente relevante (para el protocolo véase el Ejemplo 3A), teniendo una  $\text{CI}_{50}$  ~10 nM, solamente 2 veces mayor que la observada para Hhip $_{\beta 12}$  natural. Sin embargo, la inhibición fue incompleta (~ 85%) en condiciones de saturación (**Fig. 4F**).

Los efectos estéricos y de carga adversos en esta posición (D383R) dieron como resultado una reducción de ~13 veces en la  $\text{CI}_{50}$  (57 nM) e la inhibición máxima de solamente ~ 50 %. Como se esperaba, no hubo actividad inhibitoria observada con el mutante Hhip $_{\Delta\text{L2}}$  (**Fig. 4F**). Debido a que no se añadieron iones metálicos divalentes adicionales en los ensayos de unión de proteínas, las concentraciones de subsaturación podrían explicar las diferencias encontradas en el ensayo basado en células; además los estudios de unión Hhip-Shh son necesarios para definir mejor la dependencia de los iones metálicos divalentes. La complejidad de las interacciones entre Hhip y Shh en los ensayos basados en células, podrían también originarse de las interacciones ausentes en los ensayos de unión, por ejemplo, modificaciones lipídicas en Shh. Además, la presencia de un área ácida altamente conservada en la superficie del complejo Hhip-Shh sugiere un sitio de interacción potencial para reguladores adicionales (**Fig. 12**).

Otro mutante, I312A, que se une a Shh de forma semejante a Hhip1 $_{\beta 12}$  natural (**Tabla 6**), fue esencialmente idéntico a Hhip1 $_{\beta 12}$  natural en la actividad basada en células (**Fig. 4F**). La complejidad de la interacción entre Hip y Shh en los ensayos basados en células puede incluir interacciones adicionales o compensatorias, ausentes en el ensayo de unión, el cual utiliza Shh recombinante no modificada. Las modificaciones de Shh palmitoilo N-terminal y de colesterol C-terminal, presentes en el ensayo basado en células, probablemente anclan Shh a la membrana celular, restringiendo su movilidad e induciendo la unión a Hhip1 $_{\beta 12}$ . Además, el dominio EGF2 de Hhip1 puede mediar interacciones adicionales debido a que tiene un efecto pequeño sobre la inhibición en el ensayo de cocultivo, a pesar de que no contacta de forma directa con Shh en la estructura cristalina y no parece contribuir a la unión *in vitro* (**Fig. 3B, Tabla 6**).

## 50 **Ejemplo 6: El complejo sugiere un fundamento para las mutaciones genéticas de Ihh de la braquidactilia de tipo A1**

Los datos genéticos de Hh y otros miembros de la familia Hh resaltan la importancia de la hendidura del sitio pseudoactivo de Shh y del sitio de unión de  $\text{Ca}^{2+}$ . Estas mutaciones pueden tener un efecto profundo, aunque para la mayoría de ellas no está claro si esto se debe a interacciones alteradas con Ptch1 y/o con receptores moduladores. Por ejemplo, la delección de E176-K178, la cual contribuye a una pared de la hendidura del sitio pseudoactivo, está asociada a microcefalia y un cuerpo calloso parcial. Además, varias mutaciones de Ihh (E95G/K, D100E/N, R128Q, T130N, E131K y T154I, que corresponden a los restos de Shh E90, D95, R123, T125, E126 y T149, respectivamente; **Fig. 8B**) están asociadas a la braquidactilia tipo A1, un trastorno hereditario autosómico dominante que se caracteriza por el acortamiento de las falanges intermedias<sup>43, 44, 45, 47, 48, 49</sup>. Estas mutaciones mapean en dos sitios en Shh: el sitio pseudoactivo (R123, T125, T149) y el sitio de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  adyacente (E90, D95, E126) (**Fig. 4D**). En la hendidura de unión a  $\text{Zn}^{2+}$ , T125 y T149 se comprimen contra R123 y contribuyen a la superficie de la hendidura. Además, R123 proporciona una carga complementaria para el resto E380 en Hhip (**Fig. 4D**). Las mutaciones de Ihh T154I, R128Q, T130N están expuestas a disolvente y no es probable que alteren el plegamiento de Ihh, aunque la mutación R128Q puede disminuir las interacciones electroestáticas con los

compañeros de unión. La naturaleza relativamente benigna de estas tres mutaciones heterocigotas contrasta con la letalidad embrionaria en ratones de la genosupresión  $Ihh^{50}$ .

5 El otro tipo de mutaciones en  $Ihh$  asociadas a braquidactilia tipo A1 (E95G/K, D100E/N y E131K (Gao B. *et al.* (2001) Nat. Genet. 28:386-388; Kirkpatrick T.J. *et al.* (2003) J. Med. Genet. 40:42-44; McCready *et al.* (2002) Hum. Genet. 111:368-375)) forman parte de un nuevo sitio de unión a cationes divalentes en Shh, adyacente a la hendidura de unión a  $Zn^{2+}$ . Las cadenas laterales de Shh E90, D95 y E126, que corresponden a los restos de  $Ihh$  anteriores, y la estructura carbonilo de W 128, coordinan un catión  $Ca^{2+}$  supuesto (**Fig. 4G**). La alteración de cualquiera de estas cadenas laterales ácidas probablemente afectará de forma adversa la unión del catión divalente a Shh o a  $Ihh$ . La asociación evolutiva entre las cadenas laterales que coordinan catión y esta enfermedad hereditaria sugiere que este sitio es funcionalmente importante en la señalización de Hh.

### Ejemplo 7: Las interacciones entre Hip y Shh se asemejan a las interacciones entre el inhibidor y la metaloproteasa

15 Aunque tanto la geometría de la coordinación del catión  $Zn^{2+}$  y el plegamiento global de Shh son topológicamente semejantes al clan MD de las metaloproteasas (Bochtler. M. *et al.* (2004) Protein Sci. 13:854-861; Bussiere. D. E. *et al.* (1998) Mol. Cell 2:75-84; Hall, T. M. *et al.* (1995) Nature 378:212-216; Rawlings, N. D. *et al.* (2008) Nucl. Acids Res. 36:D320-325), no se ha informado actividad enzimática para Shh (Fuse, N. *et al.* (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:10992-10999). La mutación de restos clave en el sitio pseudoactivo ha demostrado tales funciones de Shh como un ligando para Ptch y no como una proteasa (Fuse, N. *et al.* (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:10992-10999). Por lo tanto la estructura del complejo Hip-Shh de los inventores es el primer ejemplo de Shh utilizando su plegamiento similar a metaloproteasa para regular la ruta de Hh. La hendidura de Shh que contiene  $Zn^{2+}$ , la cual es semejante al surco de unión sustrato/inhibidor de la proteasa, está ocupada por el bucle L2 de  $Hhip1_{\beta12}$  con D383 coordinando el  $Zn^{2+}$ . Este modo de interacción es análogo al del complejo TIMP1-MMP3 (Gomis-Ruth, F. X. *et al.* (1997) Nature 389:77-81), en el cual la hendidura del sitio activo de MMP3 está ocupada por un bucle continuo de su inhibidor, TIMP1. En la estructura TIMP- MMP3, como en el complejo Hip-Shh, el inhibidor completa la esfera de coordinación de  $Zn^{2+}$ . La estructura Hip-Shh sugiere que Shh puede haber evolucionado a partir de un ancestro catalíticamente competente que perdió su actividad proteolítica mientras que retuvo algunos aspectos del modo de unión del inhibidor a la proteasa para regular la actividad de la ruta. La implicación de las proteasas no catalíticas como compañeras de unión se ha observado en otras rutas de señalización importantes. Por ejemplo, el factor de crecimiento de hepatocito (HGF) es un factor de crecimiento  $\alpha/\beta$  heterodimérico similar a plasminógeno y el ligando para Met, un receptor de tirosina cinasa (Birchmeier, C. *et al.* (2003) Nature Rev. Mol. Cell Biol. 4:915-925). El dominio similar a proteasa de la cadena  $\beta$  de HGF interactúa con la hélice  $\beta$  del receptor Met a través de su sitio pseudoactivo, a pesar de que HGF carece de cualquier actividad catalítica (Kirchhofen D. *et al.* (2004) J. Biol. Chem. 279:39915-39924; Stamos, J. *et al.* (2004) EMBO J. 23:2325-2335).

40 Si  $Hhip$  actúa como un receptor señuelo para Shh, evitando que se una a Ptch1 y de este modo inhibiendo la señalización, entonces  $Hhip1$  y Ptch1 deberían competir por Shh. Por lo tanto, los inventores examinaron mediante FACS si  $Hhip1_{\beta12}$  soluble podría competir con Shh por la unión a células 293 que expresan Ptch1.  $Shh_{649}$  fluorescente se unió de forma específica a células 293-Ptch1 con una  $CE50$  de  $\sim 2$  nM (datos no mostrados) y podría competir con Shh o con  $Ihh$  no marcados en una manera dependiente de la dosis (**Fig. 15J**).

45 En efecto,  $Hhip1_{\beta12}$  y  $Hhip1_{\beta12}$ -Fc inhiben la unión de Shh a células, específica de Ptch1, en una manera dependiente de la dosis (**Figs. 15I y 15J**). Por el contrario, los mutantes que no se unen a Shh (**Tabla 6**), tales como  $Hhip\Delta L2$  o  $Hhip1_{\beta12}$  D383R, y los controles etiquetados His6 o Fc, no mostraron inhibición (**Fig. 15J**). El anticuerpo monoclonal 5E134 anti Shh neutralizante de alta afinidad también compete con Shh por la unión a Ptch1 (**Figs. 15I y 15J**), así como a  $Hhip1_{\beta12}$  (**Fig. 15**). Además, el epítipo 5E1 en Shh solapa de forma parcial con el sitio de unión de  $Hhip$  (**Fig. 14**). Por lo tanto, debido a que los sitios de unión de  $Hhip1_{\beta12}$ , Ptch1 y 5E1 solapan, esto confirma adicionalmente que Ptch1 y  $Hhip$  compiten por Shh e indica que comparten un sitio de unión común o que tienen sitios de unión en estrecha proximidad, de forma tal que el impedimento estérico da como resultado competición.

### Ejemplo 8: La unión de $Hhip1_{\beta12}$ a Shh difiere de la interacción de Ihog con Hh de *Drosophila*

55 La interacción observada entre  $Hhip1_{\beta12}$  y Shh difiere de la de Hh de *Drosophila* e Ihog (McLean J. S. *et al.* (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:17208-17213), la única otra estructura de complejo Hh-receptor disponible hasta la fecha. Los dos complejos difieren en sus tipos y localización de interacciones intermoleculares. El complejo Ihog-Hh necesita heparina, la cual no solo conecta a los dos compañeros de unión, sino que también facilita la dimerización de Ihog. Por el contrario, la interacción entre Hip y Shh es independiente de heparina y la presencia de heparina, al menos *in vitro*, no conduce a la formación de oligómeros de  $Hhip1_{\beta12}$  de mayor orden (datos no mostrados).

65 A pesar de la homología estructural entre Hh de *Drosophila* y Shh, Ihog y  $Hhip1_{\beta12}$  se unen a distintas superficies en estos ligandos.  $Hhip1_{\beta12}$  se une a Shh en su sitio pseudoactivo, mientras que Ihog se une a una superficie localizada en el lado de la molécula alrededor de la segunda hélice (**Fig. 5A**). Además, los elementos estructurales de Ihog y de  $Hhip1_{\beta12}$  responsables de la unión de ligando son fundamentalmente diferentes. Mientras que Ihog utiliza uno de sus dominios de fibronectina tipo III (FNIII) para unir Hh de *Drosophila*, la hélice  $\beta$  de  $Hhip1_{\beta12}$  media las

interacciones con Shh. Se ha sugerido que los dos homólogos de mamífero de Ihog, Cdon y Boc, se unen a Shh en una manera similar a Ihog (Yao, S. *et al.* (2006) *Cell* 125:343-357), lo cual no implica a la hendidura que contiene  $Zn^{2+}$ , dejando por consiguiente esta superficie disponible para interactuar con Hhip1. Aunque Hhip1 e Ihog tienen distintos sitios de unión sobre Shh y Hh, respectivamente (**Fig. 5A**), la superposición de los dos complejos muestra interacciones estéricas adversas del dominio FNIII con Hhip1 que se producen lejos del sitio de unión. Esto sugiere que Hhip1 y Cdon/Boc no pueden unirse de forma simultánea a Shh o, si pueden, que Cdon/Boc no se une a Shh de una manera similar a Ihog (véase posteriormente).

El papel crucial de la señalización de Hh en el desarrollo, la enfermedad y el cáncer, ilustra de forma clara la necesidad de una regulación estrecha. Varios receptores asociados a la membrana plasmática están implicados en la transmisión de la señal de Hh. Para comprender mejor los mecanismos por los cuales Hhip1 inhibe la señalización de Shh, los inventores determinaron la estructura del complejo entre Hhip1<sub>β12</sub> y Shh, lo cual condujo a varios hallazgos importantes e inesperados. Primero, la hendidura que contiene  $Zn^{2+}$  y el sitio pseudoactivo de Shh, en efecto desempeñan un papel bioquímico y biológico crítico. Hhip1 utiliza este sitio para regular la actividad biológica de Shh. Segundo, la unión de Shh a un péptido Ptch, homólogo al bucle L2 de Hhip1, sugiere que Hhip1 y Ptch comparten un modo de unión común a los homólogos de Hh y refuerza la idea de que Hhip1 actúa como un receptor señuelo competitivo por Ptch. Finalmente, otros receptores de Shh tales como Cdon/Boc pueden unirse al complejo Hip-Shh, lo que permite que los inventores comiencen a poner la función biológica de estas proteínas en un contexto estructural. Los inventores proponen que Cdon/Boc actúan como correceptores para Shh, lo que conduce a la señalización o a la inhibición de la ruta.

Los inventores demuestran que un fragmento soluble de Hhip1 (Hip<sub>β12</sub>), que se une de forma estrecha a Shh, es un inhibidor potente de la señalización de Hh. Mientras que la mayoría de los inhibidores de la señalización de Hh descritos son moléculas pequeñas que se unen a Smo (Kiselyov *et al.* (2007) *Expert Opin. Ther. Targets* 11:1087-1101), el anticuerpo monoclonal 5E1 continúa siendo el único inhibidor potente de la ruta que une ligandos de Hh (Ericson *et al.* (1996) *Cell* 87:661-663). Las interacciones críticas de Hhip1 con el sitio pseudoactivo de Shh se pueden capturar mediante un péptido obtenido a partir de su bucle L2 así como un péptido a partir de Ptch. Por lo tanto, anticuerpos, péptidos o moléculas pequeñas que se unen con alta afinidad al sitio pseudoactivo de Shh deberían inhibir la señalización de Hh. Los anticuerpos dirigidos al sitio de unión a Shh en Ptch podrían no hacer lo mismo. Esto abre varias nuevas oportunidades para diseñar antagonistas nuevos de la señalización de Hh para su uso en biología celular y en áreas terapéuticas.

### Ejemplo 9: Unión de Ptch a Shh

El mapeo de los sitios de unión de Hhip1<sub>β12</sub> e Ihog sobre Shh en Hh *Drosophila*, muestra que hay por lo menos dos sitios de unión distintos entre los receptores de superficie y los homólogos de Hh (**Fig. 5A**). Las interacciones de Ptch con Shh se han definido mediante la afinidad y la actividad de mutantes de superficie de Shh (Fuse, N. *et al.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 10992-10999; Pepinsky, R. B. *et al.* (2000) *J. Biol. Chem.* 275:10995-11001) (**Fig. 5A**, panel derecho). Debido a que Cdon/Boc se une de forma directa a Shh y potencia la señalización a través de Ptch (Tenzen, T. *et al.* (2006) *Dev. Cell* 10: 647-56; Yao, S. *et al.* (2006) *Cell* 125:343-357), los mutantes de Shh que anulan la unión de Cdon/Boc pueden tener consecuencias indirectas sobre la interacción de Ptch con Shh y la señalización aguas abajo. Para determinar las regiones candidatas de Ptch que podrían contactar Shh, los inventores buscaron similitudes de secuencia entre Ptch y Hhip1, así como entre Ptch e Ihog. Este análisis identificó un tramo de restos en el segundo ectodominio de Ptch, entre las hélices transmembrana 7 y 8, el cual tenía notable similitud de secuencia con el bucle L2 de Hhip1<sub>β12</sub>, sugiriendo de esta manera la presencia de un bucle semejante en Ptch (**Fig. 5B**). Los restos Asp o Glu ocupan la posición 0, excepto en *C. elegans* en el cual se encuentra Ser. En todos los casos, se encuentra Gly en la posición 1 y Thr es el resto predominante en la posición -8. Además, la abrumadora presencia de restos hidrófobos en las posiciones -7, -4, -1 y 2, es coherente con un papel en la estabilización de un bucle similar a L2. De acuerdo con los análisis de los inventores, la eliminación del dominio extracelular completo entre las hélices transmembranas 7 y 8 de Ptch da como resultado una pérdida de la unión de Shh, mientras que se conserva la capacidad de reprimir Smo (Briscoe *et al.* (2001) *Mol. Cell* 7:1279-1291; Taipale *et al.* (2002) *Nature* 418:892-897).

Para explorar aún más, los inventores sintetizaron péptidos cíclicos conteniendo disulfuros que corresponden a los bucles L2 de Hhip1<sub>β12</sub> y Ptch, y caracterizaron sus interacciones con Shh utilizando espectroscopia de RMN. Brevemente, se preparó Shh marcada con <sup>15</sup>N con medio M9 complementado con <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl, del mismo modo que la proteína nativa. El espectro de <sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N-HSQC se registró con <sup>15</sup>N-Shh 90 μM en tampón PBS complementado con D<sub>2</sub>O al 10 % (v/v), a 32 °C en un espectómetro Bruker DRX600 MHz equipado con criosonda de triple resonancia inversa de 5 mm. Los estudios de péptidos se hicieron en presencia de péptidos cíclicos que contenían disulfuros para los péptidos de L2 de Ptch (GCQLTKQRLVDADGIINPCG) (SEC ID N°: 53) y de L2 de Hhip1<sub>β12</sub> (GCGMITLDDMEEMDGLSDFCG) (SEC ID N°: 54), marcados ambos a 2 mM.

La adición de cualquier péptido dio como resultado cambios significativos en el espectro <sup>15</sup>N, <sup>1</sup>H HSQC de Shh (**Fig. 5D y E**), indicativo de unión peptídica. La similitud de la huella HSQC entre los dos complejos sugiere que el péptido de L2 de Ptch en efecto une a Shh de una manera semejante a la del péptido de L2 de Hhip1<sub>β12</sub>.

En un ensayo de competición, un péptido obtenido del bucle L2 de Hhip1<sub>β12</sub> compitió con Hip<sub>β1</sub> por la unión de Shh. Brevemente, se recubrieron placas de 96 pocillos Nunc-Immuno MaxiSorp (Nalge Nunc International) con 100 μl de anticuerpo M2 anti-Flag (Sigma) a 5 μg/ml en tampón carbonato de sodio 50 mM pH 9,6 a 4 °C durante una noche. Las placas se bloquearon y lavaron como se describe para el ELISA de competición de Shh, seguido de incubación con 100 μl de Shh-Flag a 50 μg/ml durante 1 h. Después del lavado de la placa se añadió a los pocillos una dilución seriada de péptido Hip-L2 (GDGMITLDDMEEMDGLSDFTG) (SEC ID N°: 46), comenzando en 1,2 mM (dilución 1:3), conteniendo Hhip1<sub>β12</sub> 800 nM en un volumen final de 100 μl, para competir por la unión a Shh-Flag. Después de la incubación durante 1 h, los pocillos se lavaron e incubaron con conjugado anti-His-HRP (Qiagen, dilución 1:2000) en tampón de bloqueo. La placa se reveló y los datos se ajustaron a una ecuación de 4 parámetros y la CI<sub>50</sub> se calculó como describe anteriormente; los ensayos se llevaron a cabo en triplicado.

El péptido obtenido del bucle L2 de Hhip1<sub>β12</sub> compitió con Hip<sub>β1</sub> por la unión de Shh con una CI<sub>50</sub> de 150 μM (**Fig. 5C**), coherente con la idea de que el péptido se une a la misma región sobre Shh que Hhip1. El péptido obtenido de L2 de Ptch fue de menor afinidad y así, incapaz de competir con Hip<sub>β1</sub> por la unión de Shh. Debido a las limitaciones de afinidad y solubilidad de estos péptidos, los inventores no fueron capaces de analizar su efecto sobre la señalización de Shh en los ensayos de Gli-luciferasa basados en células. Considerados en su conjunto, (i) la similitud de secuencia entre los péptidos de L2 de Hhip1<sub>β12</sub> L2 y Ptch, (ii) la capacidad del péptido de L2 de Hhip1<sub>β12</sub> para competir con Hip<sub>β1</sub> por la unión de Shh, y (iii) la similitud en el espectro de HCQC de Shh en presencia de ambos péptidos sugiere que Ptch podría unirse a Shh en su sitio pseudoactivo, proporcionando así a los inventores un "parche para Patched." Los inventores proponen un papel principal para Hhip1 en la señalización de Hh como un receptor señuelo estructural inhibidor para ligandos de Hh (**Fig. 12**).

#### Ejemplo 10: Papel de Cdon en las interacciones de Hhip1<sub>β12</sub> con Shh

Estudios recientes han demostrado que Cdon/Boc potencia la señalización de Shh a través de Ptch y sugirieron que la posible existencia de un complejo multicomponente entre homólogos de Hh, Cdon/Boc (o Ihog en *Drosophila*) y Ptch (Tenzen, T. *et al.* (2006) *Dev. Cell* 10:647-56; Yao, S. *et al.* (2006) *Cell* 125: 343-57). El sitio de unión en Cdon/Boc para los restos de Shh está dentro del tercer (proximal de membrana) dominio de FNIII (Tenzen *et al.* (2006) *Dev. Cell* 10:647-56), el cual comparte identidad de secuencia del 98,0 % entre proteínas de ser humano y murinas. Para evaluar si Cdon/Boc podría desempeñar un papel menor con Shh y Hhip1<sub>β12</sub>, los inventores examinaron la capacidad de Cdon recombinante para interactuar con el complejo Shh-Hhip1<sub>β12</sub>. Un ensayo de unión de competición reveló que un fragmento de Cdon murina, que contiene sus 3 dominios FNIII fusionados a tiorredoxina (Cdon<sub>FN1-3</sub>) no compite con Hhip1 por la unión a Shh (datos no mostrados).

Para encontrar un posible sitio de unión para Cdon/Boc (u otros interactuantes *in vivo*), los inventores mapearon la conservación de secuencia entre ortólogos de Shh y Hhip1. El análisis de secuencia reveló un área acida altamente conservada en la superficie del complejo Shh-Hhip1<sub>β12</sub> (**Fig. 12B**). Los inventores proponen que esta región contiene un sitio de interacción potencial para compañeros de unión de señalización adicionales tales como Cdon/Boc.

Basándose en sus estructuras y en los datos de unión discutidos anteriormente, los inventores proponen el siguiente modelo simple para la regulación de Hip/Ptch de la ruta de Hh (**Figs. 6 y 7**). Primero se une Shh con modificación de lípido anclada en la membrana celular a Cdon/Boc. Después, dependiendo del entorno celular, el complejo Shh-Cdon/Boc podría interactuar adicionalmente con Ptch o Hhip1. La formación del complejo de Shh con Ptch estimularía la señalización de Hh (**Fig. 6**), mientras que la formación del complejo con Hhip1 secuestraría Shh e inhibiría la ruta (**Fig. 7**). Esto sugiere un papel principal para Hhip1 en la señalización de Hh como un receptor señuelo estructural inhibidor para Ptch.

Los datos genéticos sobre Hh y otros miembros de la familia Hh resaltan la importancia de la hendidura del sitio pseudoactivo de Shh y del sitio de unión de Ca<sup>2+</sup>. Estas mutaciones pueden tener un efecto profundo, aunque no está claro para la mayoría de ellos si esto se debe a las interacciones afectadas con Ptch1 y/o con receptores moduladores. Por ejemplo, la delección de E176- K178, que contribuye a una pared de la hendidura del sitio pseudoactivo, está asociada a microcefalia y un cuerpo caloso parcial.

#### Ejemplos proféticos

##### Ejemplo 11: Expresión de Hhip1<sub>β12</sub> en *E. coli*

Este ejemplo ilustra la preparación de una forma no glucosilada de Hhip1<sub>β12</sub> mediante expresión recombinante en *E. coli*.

La secuencia de ADN que codifica Hhip1<sub>β12</sub> se amplifica de forma inicial utilizando cebadores seleccionados de PCR. Los cebadores deberían contener sitios para enzimas de restricción que correspondan a los sitios de enzimas de restricción en el vector de expresión seleccionado. Se puede emplear diversos vectores de expresión. Un ejemplo de un vector adecuado es pBR322 (obtenido de *E. coli*; véase Bolivar *et al.*, (1977) *Gene*, 2:95) que contiene genes para resistencia a ampicilina y tetraciclina. El vector se digiere con enzima de restricción y se desfosforila. Después se ligan en el vector las secuencias amplificadas por PCR. El vector preferentemente incluirá secuencias que

codifican un gen de resistencia a antibiótico, un promotor *trp*, un líder polihis (incluyendo los primeros seis codones STII, secuencia polihis, y sitio de escisión de enterocinasa), la región codificante de Hhip1<sub>β12</sub>, el terminador de la transcripción lambda y un gen *argU*.

- 5 Después, la mezcla de ligación se utiliza para transformar una cepa seleccionada de *E. coli* utilizando los métodos descritos en Sambrook *et al.*, véase anteriormente. Los transformantes se identifican mediante su capacidad para crecer en placas de LB y después se seleccionan las colonias resistentes a antibióticos. El ADN plasmídico se puede aislar y confirmar mediante análisis de restricción y secuenciación de ADN.
- 10 Los clones seleccionados se pueden cultivar durante una noche en medio de cultivo líquido tal como caldo LB complementado con antibióticos. Posteriormente, el cultivo de una noche se puede utilizar para inocular un cultivo a mayor escala. Después, las células se cultivan hasta una densidad óptica deseada, durante lo cual el promotor de la expresión se inicia.
- 15 Después del cultivo de las células durante varias horas más, las células se pueden recoger mediante centrifugación. El sedimento celular obtenido mediante la centrifugación se puede solubilizar utilizando diversos agentes conocidos en la técnica, y después la proteína Hhip1<sub>β12</sub> solubilizada se puede purificar utilizando una columna quelante de metales, en condiciones que permitan la unión estrecha de la proteína.
- 20 Utilizando el siguiente procedimiento Hhip1<sub>β12</sub> se puede expresar en *E. coli* en una forma etiquetada con poliHis. El ADN que codifica Hhip1<sub>β12</sub> se amplifica de forma inicial utilizando cebadores de PCR seleccionados. Los cebadores contendrán sitios para enzimas de restricción que corresponden con los sitios de enzimas de restricción en el vector de expresión seleccionado, y otras secuencias útiles que provean la iniciación de la traducción eficaz y fiable, la purificación rápida en una columna de quelado de metal y el retiro proteolítico con enterocinasa. Después, las secuencias amplificadas por PCR etiquetadas con poliHis, se ligan en un vector de expresión, el cual se utiliza para transformar un hospedador *E. coli* basado en la cepa 52 (W3110 fuhA(tonA) lon galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq)).
- 25 Primero, los transformantes se crecen en LB conteniendo carbenicilina 50 mg/ml a 30 °C con agitación hasta que se alcanza una DO<sub>600</sub> de 3-5. Después, los cultivos se diluyen 50-100 veces en medio CRAP (preparado mediante la mezcla de 3,57 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,71 g de citrato de sodio•2H<sub>2</sub>O, 1,07 g de KCl, 5,36 g de extracto de levadura Difco, 5,36 g de Hy-Case SF de Sheffield en 500 ml de agua, así como MPOS 110 mM, pH 7,3, glucosa al 0,55 % (p/v) y MgSO<sub>4</sub> 7 mM) y se cultivan con agitación durante aproximadamente 20-30 h a 30 °C. Las muestras se retiran para comprobar la expresión mediante análisis de SDS-PAGE, y el volumen de cultivo se centrifuga para sedimentar las células. Los sedimentos celulares se congelan hasta la purificación y el replegamiento.
- 35 La pasta de *E. coli* a partir de fermentaciones de 0,5 a 1 l (sedimentos de 6-10 g) se resuspende en 10 volúmenes (p/v) en tampón guanidina 7 M, Tris 20 mM, pH 8. Se añade sulfito de sodio y tetrionato de sodio sólidos para preparar concentraciones finales de 0,1 M y 0,02 M, respectivamente, y la solución se agita durante una noche a 4 °C. Esta etapa da como resultado una proteína desnaturalizada con todos los restos de cisteína bloqueados mediante sulfitolización. La solución se centrifuga a 40.000 rpm en una ultracentrífuga Beckman durante 30 min. El sobrenadante se diluye con 3-5 volúmenes de tampón de columna de quelato de metales (guanidina 6 M, Tris 20 mM, pH 7,4) y se filtra a través de filtros de 0,22 micrones para clarificarlo. El extracto clarificado se carga en una columna de quelato de metal Ni-NTA de Qiagen equilibrada en el tampón de columna de quelato de metal. La columna se lava con tampón adicional conteniendo imidazol 50 mM (Calbiochem, grado Utrol), pH 7,4. La proteína se eluye con tampón que contiene imidazol 250 mM. Las fracciones que contienen la proteína deseada se agrupan y se reservan a 4 °C. La concentración de proteína se estima mediante su absorbancia a 280 nm utilizando el coeficiente de extinción calculado basado en su secuencia de aminoácidos.
- 40
- 45

Las proteínas se repliegan diluyendo la muestra lentamente en tampón de replegamiento preparado recientemente, que consiste de: Tris 20 mM, pH 8,6, NaCl 0,3 M, urea 2,5 M, cisteína 5 mM, glicina 20 mM y EDTA 1 mM. Los volúmenes de replegamiento se eligen de modo que la concentración final de proteína está entre 50 a 100 microgramos/ml. La solución de replegamiento se agita suavemente a 4 °C durante 12-36 horas. La reacción de replegamiento se interrumpe mediante la adición de TFA a una concentración final del 0,4 % (pH de aproximadamente 3). Antes de la purificación adicional de la proteína, la solución se filtra a través de un filtro de 0,22 micrones y se añade acetonitrilo a una concentración final del 2-10 %. La proteína replegada se somete a cromatografía en una columna de fase inversa Poros R1/H, utilizando un tampón móvil de TFA al 0,1 % con elución con un gradiente de acetonitrilo desde el 10 al 80 %. Las alícuotas de las fracciones con absorbancia A280 se analizan en geles de poliacrilamida SDS y se agrupan las fracciones que contienen proteína replegada homogénea. En general, las especies replegadas de forma apropiada de la mayoría de las proteínas se eluyen a las menores concentraciones de acetonitrilo debido a que las especies son las más compactas con sus interiores hidrófobos protegidos de la interacción con la resina de fase inversa. Las especies agregadas usualmente se eluyen a las menores concentraciones de acetonitrilo debido a que tales especies son las más compactas, con sus interiores hidrófobos protegidos de la interacción con la resina de fase inversa. Las especies agregadas usualmente se eluyen a mayores concentraciones de acetonitrilo. Además de resolver formas de proteínas plegadas de forma errónea de la forma deseada, la etapa de fase inversa también elimina endotoxinas de las muestras.

65

Se agrupan las fracciones que contienen el polipéptido Hhip1 plegado deseado y el acetonitrilo se elimina utilizando una corriente suave de nitrógeno dirigida hacia la solución. Las proteínas se formulan en Hepes 20 mM, pH 6,8 con cloruro de sodio 0,14 M y manitol al 4 %, mediante diálisis o mediante filtración en gel, utilizando resinas G25 Superfine (Pharmacia) equilibradas en el tampón de formulación y esterilizadas por filtración.

5

### Ejemplo 12: Expresión de Hhip1<sub>β12</sub> en células de mamífero

Este ejemplo ilustra la preparación de una forma potencialmente glucosilada de Hhip1<sub>β12</sub> mediante expresión recombinante en células de mamífero.

10

El vector, pRK5 (véase el documento EP 307.247, publicado el 15 de marzo de 1989), se emplea como el vector de expresión. De forma opcional, una construcción de ADN de Hhip1<sub>β12</sub> se liga en pRK5 con enzimas de restricción seleccionadas para permitir la inserción del ADN de Hhip1<sub>β12</sub> utilizando métodos de ligación tales como los descritos en Sambrook *et al.*, véase anteriormente.

15

En una realización, las células hospedadoras seleccionadas pueden ser células 293. Las células 293 de ser humano (ATCC CCL 1573) se cultivan hasta la confluencia en placas de cultivo de tejidos en medio tal como DMEM complementado con suero fetal de ternera y, opcionalmente, componentes nutrientes y/o antibióticos. Aproximadamente 10 µg de ADN de pRK5-Hhip1<sub>β12</sub> se mezclan con aproximadamente 1 µg de ADN que codifica el gen VA RNA (Thimmappaya *et al.* (1982) Cell 31:543) y se disuelven en 500 µl de Tris-HCl 1 mM, EDTA 0,1 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,227 M. A esta mezcla se añade, gota a gota, 500 µl de HEPES 50 mM HEPES (pH 7,35), NaCl 280 mM, NaPO<sub>4</sub> 1,5 mM, y se permite que se forme un precipitado durante 10 minutos a 25 °C. El precipitado se suspende y se añade a las células 293 y se permite que se deposite durante aproximadamente cuatro horas a 37 °C. El medio de cultivo se aspira y se añaden 2 ml de glicerol al 20 % en PBS durante 30 segundos. Después se lavan las células 293 con medio sin suero, se añade medio recién preparado y las células se incuban durante aproximadamente 5 días.

20

25

Aproximadamente 24 horas después de las transfecciones, el medio de cultivo se retira y se reemplaza con medio de cultivo (solo) o con medio de cultivo que contiene <sup>35</sup>S-cisteína 200 µCi/ml y <sup>35</sup>S-metionina 200 µCi/ml. Después de 12 horas de incubación, el medio acondicionado se recolecta, se concentra en un filtro de centrifugación, y se carga en un gel de SDS al 15 %. El gel procesado se puede desecar y exponer a film durante un período seleccionado de tiempo para mostrar la presencia del polipéptido Hhip1<sub>β12</sub>. Los cultivos que contienen las células transfectadas pueden someterse a incubación adicional (en medio sin suero) y el medio se analiza en bioensayos seleccionados.

30

35

En una técnica alternativa, se puede introducir de forma transitoria una construcción de Hhip1<sub>β12</sub> en células 293 utilizando el método de sulfato de dextrano descrito por Sompariyac *et al.* (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 12:7575. Las células 293 se cultivan hasta densidad máxima en un matraz rotativo y se añaden 700 µg de ADN de pRKS-Hhip1<sub>β12</sub>. Primero las células se concentran a partir del matraz rotativo mediante centrifugación y se lavan con PBS. El precipitado de ADN-dextrano se incuba en el sedimento celular durante cuatro horas. Las células se tratan con glicerol al 20 % durante 90 segundos, se lavan con medio de cultivo de tejidos, y se reintroducen en el matraz rotativo que contiene medio de cultivo de tejidos, insulina bovina 5 µg/ml y transferrina bovina 0,1 µg/ml. Después de aproximadamente cuatro días, el medio acondicionado se centrifuga y se filtra para eliminar células y residuos. Después se puede concentrar la mezcla que contiene Hhip1<sub>β12</sub> expresada y purificarla mediante cualquier método seleccionado, tal como diálisis y/o cromatografía en columna.

40

45

En otra realización, Hhip1<sub>β12</sub> se puede expresar en células CHO. El pRK5-Hhip1<sub>β12</sub> se puede transfectar en células CHO utilizando reactivos conocidos tales como CaPO<sub>4</sub> o DEAE-dextrano. Como se describe anteriormente, los cultivos celulares se pueden incubar, y el medio se puede reemplazar con medio de cultivo (solo) o con medio que contiene un marcador radiactivo tal como <sup>35</sup>S-metionina. Después de determinar la presencia de un polipéptido Hhip1<sub>β12</sub>, el medio de cultivo se puede reemplazar con medio sin suero. Preferentemente, los cultivos se incuban durante aproximadamente 6 días, y después el medio acondicionado se recolecta. Después se puede concentrar y purificar el medio que contiene la Hhip1<sub>β12</sub> expresada mediante cualquier método seleccionado.

50

55

También se puede expresar en células hospedadoras CHO un polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> etiquetado con epítipo. La construcción Hhip1<sub>β12</sub> se puede subclonar a partir del vector pRK5. El inserto del subclón puede someterse a PCR para fusionarlo en marco con una etiqueta de epítipo seleccionada tal como etiqueta poli-his en un vector de expresión de Baculovirus. Después, el inserto Hhip1<sub>β12</sub> etiquetado con poli-his se puede subclonar en un vector dirigido por SV40 que contenga para la selección de clones estables un marcador de selección tal como DHFR. Finalmente, las células CHO se pueden transfectar (según se describe anteriormente) con el vector dirigido por SV40. Para verificar la expresión se puede realizar el marcaje según se describe anteriormente. Después, el medio de cultivo que contiene la Hhip1<sub>β12</sub> etiquetada con poli-His se puede concentrar y purificar mediante cualquier método seleccionado, tal como cromatografía de afinidad de Ni<sup>2+</sup> quelado.

60

65

También se puede expresar en células CHO y/o COS una construcción de Hhip1<sub>β12</sub> mediante un procedimiento de expresión transitoria o en células CHO mediante otro procedimiento de expresión estable.

La expresión estable en células CHO se realiza utilizando el siguiente procedimiento. Las proteínas se expresan como una construcción de IgG (inmunoadhesina), en la que las secuencias codificantes de las formas solubles (por ejemplo, dominios extracelulares) de las respectivas proteínas se fusionan a una secuencia de la región constante de IgG 1 que contiene la bisagra, los dominios CH2 y CH2 y/o es una forma etiquetada con poli-His.

5 Después de la amplificación por PCR, los ADN respectivos se subclonan en un vector de expresión de CHO utilizando técnicas convencionales, según se describe en Ausubel *et al.*, CURRENT PROTOCOLS OF MOLECULAR BIOLOGY, Unidad 3.16, John Wiley and Sons (1997). Los vectores de expresión de CHO se construyen para que  
10 tengan sitios de restricción compatibles 5' y 3' del ADN de interés, para permitir el transporte conveniente de los ADNc. El vector utilizado para la expresión en células CHO es según se describe en Lucas *et al.* (1996) Nucl. Acids Res. 24:9 1774-1779, y utiliza el promotor/potenciador temprano de SV40 para dirigir la expresión del ADNc de interés y de la dihidrofolato reductasa (DHFR). La expresión de DHFR permite la selección para el mantenimiento estable del plásmido después de la transfección.

15 Doce microgramos del ADN plasmídico deseado se introduce en aproximadamente 10 millones de células CHO utilizando los reactivos de transfección disponibles de forma comercial SUPERFECT® (Quiagen), DOSPER® o FUGENE® (Boehringer Mannheim). Las células se cultivan según se describe en Lucas *et al.*, véase anteriormente. Aproximadamente  $3 \times 10^7$  células se congelan en una ampolla para el cultivo y la producción adicionales, según se describe a continuación.

20 Las ampollas conteniendo el ADN plasmídico se descongelan colocándolas en un baño de agua y mezclando mediante agitación vorticial. Los contenidos se pipetea en un tubo de centrifuga que contiene 10 ml de medio y se centrifugan a 1000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se aspira y las células se resuspenden en 10 ml de medio de selección (PS20 filtrado por 0,2  $\mu\text{m}$  con suero fetal bovino diafiltrado al 5 %). Después se alicuotan las  
25 células un frasco centrifugador de 100 ml que contiene 90 ml de medio de selección. Después de 1-2 días, las células se transfieren a un frasco centrifugador de 250 ml lleno con 150 ml de medio de cultivo de selección y se incuban a 37 °C. Después otros 2-3 días, se siembran frascos centrifugadores de 250 ml, 500 ml y 2000 ml con  $3 \times 10^5$  células/ml. El medio de las células se intercambia con medio recién preparado mediante centrifugación y resuspensión en el medio de producción. Aunque se puede emplear cualquier medio de CHO adecuado, puede en realidad utilizarse un medio de producción descrito en la patente de Estados Unidos n.º: 5.122.469, expedida el 16 de junio de 1992. Un frasco de producción de 3L se siembra a  $1,2 \times 10^6$  células/ml. En el día 0, se determina el número de células y el pH. En el día 1, el matraz rotativo se muestrea y se comienza la aireación con aire filtrado. En el día 2, el matraz rotativo se muestrea, la temperatura se cambia a 33 °C, y se incorporan 30 ml de glucosa 500 g/l y 0,6 ml de antiespumante al 10 % (por ejemplo emulsión de polidimetilsiloxano al 35 %, emulsión de grado médico 365 Dow Corning). El pH se ajusta a lo largo de toda la producción según se necesite para mantenerlo alrededor de 7,2. Después de 10 días, o hasta que la viabilidad cae por debajo del 70 %, el cultivo celular se recolecta mediante centrifugación y se filtra a través de un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$ . El filtrado se reserva a 4 °C o se carga de forma inmediata en columnas para la purificación.

40 Para las construcciones etiquetadas con poli-His, las proteínas se purifican utilizando una columna Ni-NTA (Quiagen). Antes de la purificación se añade imidazol al medio acondicionado hasta una concentración de 5 mM. El medio acondicionado se bombea en una columna de Ni-NTA de 6 ml equilibrada en tampón Hepes 20 mM, pH 7,4, que contiene NaCl 0,3 M e imidazol 5 mM a un flujo de 4-5 ml/min a 4 °C. Después de la carga, la columna se lava con tampón de equilibrado adicional y la proteína se eluye con tampón de equilibrado que contiene imidazol 0,25 M.  
45 Posteriormente, la proteína altamente purificada se desala en un tampón de almacenamiento que contiene Hepes 10 mM, NaCl 0,14 M y manitol al 4 %, pH 6,8, con una columna G25 Superfine de 25 ml (Pharmacia) y se reserva a -80 °C.

Las construcciones de inmunoadhesina (que contienen Fc) se purifican a partir del medio acondicionado como sigue. El medio acondicionado se bombea en una columna de Proteína A de 5 ml (Pharmacia) que se ha equilibrado en tampón de fosfato de Na 20 mM, pH 6,8. Después de la carga, la columna se lava de forma extensa con tampón de equilibrado antes de la elución con ácido cítrico 100 mM, pH 3,5. La proteína eluida se neutraliza de forma inmediata mediante la recolección de fracciones de 1 ml en tubos que contienen 275  $\mu\text{l}$  de tampón Tris 1 M, pH 9. La proteína altamente purificada posteriormente se desala en tampón de almacenamiento, según se describe  
50 anteriormente para las proteínas etiquetadas con poli-His. La homogeneidad se valora mediante geles de poliacrilamida SDS y mediante secuenciación de aminoácidos N-terminal mediante degradación de Edman.

### Ejemplo 13: Expresión de Hhip1 $\beta_{12}$ en levadura

60 El siguiente método describe la expresión recombinante de una construcción de Hhip1 $\beta_{12}$  en levadura.

Primero, se construyen los vectores de expresión en levadura para la producción o secreción intracelular de Hhip1 $\beta_{12}$  a partir del promotor ADH2/GAPDH. El ADN que codifica un polipéptido Hhip1 $\beta_{12}$  y el promotor se insertan en sitios de restricción adecuados en el plásmido seleccionado para dirigir la expresión intracelular de Hhip1. Para la secreción, el ADN que codifica Hhip1 $\beta_{12}$  se puede clonar en el plásmido seleccionado, junto con el ADN que codifica  
65 el promotor ADH2/GAPDH, un péptido señal de Hhip1 $\beta_{12}$  nativa u otro péptido señal de mamífero o, por ejemplo, un

alfa factor de levadura o secuencia señal/líder secretora de invertasa, y secuencias enlazadoras (si se necesita) para la expresión de Hip.

5 Después se pueden transformar las células de levadura, tal como la cepa de levadura AB110, con los plásmidos de expresión descritos anteriormente y se pueden cultivar en el medio de fermentación seleccionado. Los sobrenadantes de las levaduras transformadas se pueden analizar mediante precipitación con ácido tricloroacético al 10 % y separación mediante SDS-PAGE, seguido de la tinción de los geles con tinción de Coomassie Blue.

10 Posteriormente, Hhip1<sub>β12</sub> recombinante se puede aislar y purificar separando las células de levadura del medio de fermentación mediante centrifugación y después concentrando el medio utilizando filtros de cartucho seleccionados. El concentrado que contiene Hhip1<sub>β12</sub> puede adicionalmente purificarse utilizando resinas de cromatografía en columna seleccionadas.

#### 15 **Ejemplo 14: Preparación de anticuerpos que se unen a Hhip1<sub>β12</sub>**

Este ejemplo ilustra la preparación de anticuerpos monoclonales que se pueden unir de forma específica Hip.

20 Las técnicas para la producción de anticuerpos monoclonales son conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en Goding, véase anteriormente. Los inmunógenos que se pueden utilizar incluyen polipéptidos Hhip1<sub>β12</sub> purificados, proteínas de fusión que contienen polipéptidos Hhip1<sub>β12</sub>, y células que expresan Hhip1<sub>β12</sub> recombinante en la superficie celular. El experto en la materia puede hacer la selección del inmunógeno sin experimentación excesiva.

25 Se inmunizan ratones, tales como Balb/c, con el inmunógeno Hhip1<sub>β12</sub> emulsionado en adyuvante de Freund completo y se inyectan por vía subcutánea o intraperitoneal con una cantidad de 1-100 microgramos. De forma alternativa, el inmunógeno se emulsiona en adyuvante MPL-TDM (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) y se inyecta en las almohadillas de las patas traseras. Después se refuerzan los ratones inmunizados 10 a 12 días más tarde con inmunógeno adicional emulsionado en el adyuvante seleccionado. Posteriormente, durante varias semanas los ratones se pueden reforzar con inyecciones de inmunización adicionales. Se pueden obtener de forma periódica muestras de suero de los ratones mediante sangrado retroorbital para el análisis en ensayos de ELISA para detectar anticuerpos anti-Hhip1<sub>β12</sub>.

35 Después de que se haya detectado un título de anticuerpos adecuado, los animales "positivos" para anticuerpos se pueden inyectar con una inyección intravenosa final de Hhip1. Tres a cuatro días más tarde, los ratones se sacrifican y las células esplénicas se recolectan. Después, las células esplénicas se fusionan (utilizando polietilenglicol al 35 %) con una línea celular de mieloma murina seleccionada tal como P3X63AgU.1, disponible de la ATCC, n.º: CRL 1597. Las fusiones generan células de hibridoma que después se pueden sembrar en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos que contienen medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) para inhibir la proliferación de las células no fusionadas, de híbridos de mieloma, y de híbridos de células esplénicas.

40 La reactividad contra Hhip1 de las células de hibridoma se explorará en un ELISA. La determinación de células de hibridoma "positivas" que secretan los anticuerpos monoclonales contra Hhip1<sub>β12</sub> deseados está dentro de las habilidades en la técnica.

45 Las células de hibridoma positivas se pueden inyectar por vía intraperitoneal en ratones Balb/c singénicos para producir líquido ascítico que contenga los anticuerpos monoclonales anti-Hhip1<sub>β12</sub>. De forma alternativa, las células de hibridoma se pueden cultivar en matraces de cultivo de tejidos o en botellas rotativas. La purificación de los anticuerpos monoclonales producidos en el líquido ascítico se puede lograr utilizando precipitación con sulfato de amonio, seguido de cromatografía de exclusión en gel. De forma alternativa, se puede emplear cromatografía de afinidad basada en la unión del anticuerpo a proteína A o proteína G.

#### 50 **Ejemplo 15: Preparación de anticuerpos conjugados a toxina que se unen a Hhip1<sub>β12</sub>**

55 El uso de conjugados de anticuerpo-fármaco (CAF), es decir inmunoconjugados, para la administración local de agentes citotóxicos o citostáticos, es decir, fármacos para destruir o inhibir células tumorales en el tratamiento del cáncer (Payne (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Syrigos y Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz y Springer (1997) *Adv. Drug Del. Rev.* 26:151-172; US 4.975.278), permite la administración dirigida de fracciones farmacológicas a tumores, y la acumulación intracelular allí, en donde la administración sistémica de estos agentes farmacológicos no conjugados puede dar como resultado niveles no aceptables de toxicidad para células normales, así como para las células tumorales que se busca eliminar (Baldwin *et al.*, (1986) *Lancet* (Mar. 15, 1986) pág. 603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review," en *MONOCLONAL ANTIBODIES '84: BIOLOGICAL AND CLINICAL APPLICATION*, Pinchera *et al.* (eds.), pág. 475-506). De este modo, se busca máxima eficacia con mínima toxicidad. Los esfuerzos para diseñar y perfeccionar CAF se han enfocado en la selectividad de anticuerpos monoclonales (Acm) así como en las propiedades de unión de fármacos y de liberación de fármacos. Se ha informado que tanto los anticuerpos policlonales como los anticuerpos monoclonales son útiles en estas estrategias (Rowland *et al.* (1986) *Cancer*

Immunol. Immunother. 21:183-87). Los fármacos utilizados en estos métodos incluyen daunomicina, doxorrubicina, metotrexato, y vindesina (Rowland *et al.*, (1986) véase anteriormente). Las toxinas utilizadas en los conjugados anticuerpo-toxina incluyen toxinas bacterianas tales como toxina diftérica, toxinas vegetales tales como ricina, toxina de molécula pequeña tales como geldanamicina (Mandler *et al.* (2000) *J. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-1581; Mandler *et al.* (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028; Mandler *et al.* (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791), maitansinoides (documento EP 1391213; Liu *et al.*, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623), y caliqueamicina (Lode *et al.* (1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman *et al.* (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342).

En los conjugados anticuerpo-fármaco (CAF) de la invención, un anticuerpo (Ac) se conjuga a uno o más fracciones farmacológicas (F), por ejemplo, aproximadamente 1 a aproximadamente 20 fracciones farmacológicas por anticuerpo, a través de un enlazador (E). Los CAF que tienen la fórmula: Ac-(E-F)<sub>p</sub> se pueden preparar mediante varias vías, empleando reacciones, condiciones y reactivos de química orgánica conocidos para los expertos en la materia, incluyendo: (1) reacción de un grupo nucleófilo de un anticuerpo con un reactivo enlazador bivalente, para formar Ac-E, a través de un enlace covalente, seguido de reacción con una fracción farmacológica F; y (2) reacción de un grupo nucleófilo de una fracción farmacológica con un reactivo enlazador bivalente, para formar F-E, a través de un enlace covalente, seguido de reacción con el grupo nucleófilo de un anticuerpo. Se describen en el presente documento métodos adicionales para preparar CAF.

El enlazador puede estar compuesto de uno o más componentes enlazadores. Los componentes enlazadores ejemplares incluyen 6-maleimidocaproilo ("MC"), malimidopropanoilo ("MP"), valina-citrulina ("val-cit"), alanina-fenilalanina ("ala-phe"), p-aminobenciloxicarbonilo ("PAB"), N-Succinimidil 4-(2-piridiltio) pentanoato ("SPP"), N-Succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1 carboxilato ("SMCC"), y N-Succinimidil (4-yodo-acetil) aminobenzoato ("SIAB"). Se conocen en la técnica componentes enlazadores adicionales y algunos se describen en el presente documento.

En algunas realizaciones, el enlazador puede comprender restos de aminoácidos. Los componentes enlazadores aminoácidos ejemplares incluyen un dipéptido, un tripéptido, un tetrapéptido o un pentapéptido. Los dipéptidos ejemplares incluyen: valina-citrulina (vc o val-cit), alanina-fenilalanina (af o ala-phe). Los tripéptidos ejemplares incluyen: glicina-valina-citrulina (gly-val-cit) y glicina-glicina-glicina (gly-gly-gly). Los restos de aminoácidos que comprende un componente enlazador aminoácido incluyen a los de origen natural, así como aminoácidos menores y análogos de aminoácidos que no son de origen natural, tal como citrulina. Los componentes enlazadores aminoácidos se pueden diseñar y optimizar su selectividad para la escisión enzimática mediante enzimas particulares, por ejemplo, una proteasa asociada a tumor, cathepsina B, C y D, o una proteasa plasmina.

Los grupos nucleófilos en los anticuerpos incluyen, pero sin limitación: (i) grupos amina N-terminales, (ii) grupos amina de cadena lateral, por ejemplo lisina, (iii) grupos tiol de cadena lateral, por ejemplo cisteína, y (iv) grupos hidroxilo o amino azúcares, en los cuales el anticuerpo está glucosilado. Los grupos amina, tiol, hidroxilo, hidracida, oxima, hidracina, tiosemicarbazona, hidracina carboxilato, y arilhidracida son nucleófilos y capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrófilos en las fracciones enlazadoras y reactivos enlazadores que incluyen: (i) ésteres activos tales como ésteres NHS, ésteres HOBt, haloformatos y haluros ácidos; (ii) haluros de alquilo y bencilo tales como haloacetamidas; (iii) grupos aldehídos, cetonas, carboxilo, y maleimida. Determinados anticuerpos tienen disulfuros intercadena reducibles, es decir puentes de cisteína. Los anticuerpos se pueden hacer reactivos para conjugación con reactivos enlazadores mediante el tratamiento con un agente reductor tal como DTT (ditiotreitól). Por lo tanto, cada puente de cisteína formará, teóricamente, dos nucleófilos de tiol reactivos. Se pueden introducir en los anticuerpos grupos nucleófilos adicionales a través de la reacción de lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) dando como resultado la conversión de una amina en un tiol. Los grupo tiol reactivos se pueden introducir en el anticuerpo (o fragmento del mismo) mediante la introducción de uno, dos, tres, cuatro, o más restos cisteína (por ejemplo, preparando anticuerpos mutantes que comprenden uno o más restos del aminoácido cisteína no nativos).

Los conjugados de anticuerpo-fármaco de la invención también se pueden producir mediante la modificación del anticuerpo para introducir fracciones electrófilas, las cuales pueden reaccionar con sustituyentes nucleófilos en el reactivo enlazador o el fármaco. Los azúcares de los anticuerpos glucosilados se pueden oxidar, por ejemplo con reactivos oxidantes de peryodato, para formar grupos aldehído o cetona que pueden reaccionar con el grupo amina de los reactivos enlazadores o de las fracciones farmacológicas. Los grupos base de Schiff imina resultantes pueden formar una unión estable, o pueden reducirse, por ejemplo, mediante reactivos borohidruro para formar uniones amina estables. En una realización, la reacción de la porción carbohidrato de un anticuerpo glucosilado con galactosa oxidasa o meta-peryodato de sodio puede producir en la proteína grupos carbonilo (aldehído y cetona) que pueden reaccionar con los grupos apropiados en el fármaco (Hermanson, *Bioconjugate Techniques*). En otra realización, las proteínas que contienen restos de serina o treonina N-terminales pueden reaccionar con meta-peryodato de sodio, dando como resultado la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan y Stroh, (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:138-146; documento US 5362852). Tal aldehído puede reaccionar con una fracción farmacológica o un nucleófilo enlazador.

De forma alternativa, se puede preparar una proteína de fusión que comprende el anticuerpo y el agente citotóxico, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o de síntesis de péptido. La longitud del ADN puede comprender las

regiones respectivas que codifican las dos porciones del conjugado, ya sea adyacentes entre sí o separadas mediante una región que codifica un péptido enlazador que no destruya las propiedades deseadas del conjugado.

En otra realización más, el anticuerpo se puede conjugar a un "receptor" (tal como estreptavidina) para la utilización en predirecciónamiento tumoral, en el que el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, seguido de la eliminación de la circulación del conjugado no unido utilizando un agente clarificante, y después la administración de un "ligando" (por ejemplo, avidina) que está conjugado a un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

Las técnicas específicas para producir conjugados anticuerpos-fármacos mediante la unión de toxinas a anticuerpos purificados son bien conocidas y se emplean de forma rutinaria en la técnica. Por ejemplo, la conjugación de un anticuerpo monoclonal purificado a la toxina DM1 se puede lograr como sigue. El anticuerpo purificado se derivatiza con N-succinimidil-4-(2-piridiltio) pentanoato para introducir grupos ditiopiridilo. Se trata el anticuerpo (376,0 mg, 8 mg/ml) en 44,7 ml de tampón de fosfato de potasio 50 mM (pH 6,5) que contiene NaCl (50 mM) y EDTA (1 mM) con SPP (5,3 equivalentes molares en 2,3 ml de etanol). Después de la incubación durante 90 minutos en argón a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtra en gel a través de una columna de Sefadex G25 equilibrada con citrato de sodio 35 mM, NaCl 154 mM y EDTA 2 mM. Después se agrupan y se ensayan las fracciones que contienen anticuerpo. Se diluye el anticuerpo-SPP-Pi (337,0 mg con grupos 2-tiopiridina liberables) con el anterior tampón de citrato de sodio 35 mM, pH 6,5, a una concentración final de 2,5 mg/ml. Después se añade DM1 (1,7 equivalentes, 16,1 moles) en dimetilacetamida 3,0 mM (DMA al 3 % v/v en la mezcla final de reacción) y después se añade a la solución de anticuerpo. Se permite que proceda la reacción a temperatura ambiente en argón durante 20 horas. Se carga la reacción en una columna de filtración en gel de Sefacril S300 (5,0 cm x 90,0 cm, 1,77 l) equilibrada con citrato de sodio 35 mM, NaCl 154 mM, pH 6,5. El flujo es de 5,0 ml/min y se recolectan 65 fracciones (cada una de 20,0 ml). Las fracciones se agrupan y se ensayan, en las que se determina el número de moléculas de fármaco DM1 unidas por molécula de anticuerpo (p') mediante la medición de la absorbancia a 252 nm y 280 nm.

Para fines ilustrativos, también se puede lograr la conjugación de un anticuerpo monoclonal purificado a la toxina DM1 como sigue. El anticuerpo purificado se derivatiza con (Succinimidil 4-N-maleimidometil) cyclohexano-1-carboxilato (SMCC, Pierce Biotechnology, Inc) para introducir el enlazador SMCC. El anticuerpo se trata a 20 mg/ml en fosfato de potasio 50 mM/ cloruro de sodio 50 mM/ EDTA 2 mM, pH 6,5 con 7,5 equivalentes molares de SMCC (20 mM en DMSO, 6,7 mg/ml). Después de agitar durante 2 horas en argón a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtra a través de una columna de Sefadex G25 equilibrada con fosfato de potasio 50 mM/ cloruro de sodio 50 mM/ EDTA 2 mM, pH 6,5. Las fracciones que contienen anticuerpo se agrupan y se ensayan. Después se diluye el anticuerpo-SMCC con fosfato de potasio 50 mM/ cloruro de sodio 50 mM/ EDTA 2 mM, pH 6,5, a una concentración final de 10 mg/ml, y se hace reaccionar con una solución de DM1 10 mM (1,7 equivalentes asumiendo 5 SMCC/anticuerpo, 7,37 mg/ml) en dimetilacetamida. La reacción se agita a temperatura ambiente en argón durante 16,5 horas. Después se filtra la mezcla de reacción de conjugación a través de una columna de filtración en gel de Sefadex G25 (1,5 x 4,9 cm) con PBS 1X a pH 6,5. Después se mide la relación DM1/anticuerpo (p) mediante la absorbancia a 252 nm y a 280 nm.

Además, se puede modificar una cisteína libre en un anticuerpo de elección mediante el reactivo bis-maleimido BM(PEO)4 (Pierce Chemical), dejando un grupo maleimido sin reaccionar en la superficie del anticuerpo. Esto se puede lograr disolviendo BM(PEO)4 en una mezcla etanol/agua al 50 % hasta una concentración de 10 mM y añadiendo un exceso molar de diez veces a una solución que contiene el anticuerpo en solución salina tamponada con fosfato a una concentración de aproximadamente 1,6 mg/ml (10 micromolar) y permitiendo que reaccione durante 1 hora. El exceso de BM(PEO)4 se elimina mediante filtración en gel en tampón citrato 30 mM, pH 6 con NaCl 150 mM. Se disuelve aproximadamente un exceso molar de 10 veces de DM1 en dimetilacetamida (DMA) y se añade al intermediario anticuerpo-BMPEO. También se puede emplear dimetilformamida (DMF) para disolver el reactivo de fracción farmacológica. Se permite que la mezcla de reacción reaccione durante una noche antes de la filtración en gel o de la diálisis en PBS para eliminar fármaco que no haya reaccionado. Se utiliza filtración en gel en columnas S200 en PBS para eliminar agregados de alto peso molecular y proporcionar conjugado anticuerpo-BMPEO-DM1 purificado.

Normalmente los fármacos citotóxicos se han conjugado a anticuerpos a través de los a menudo numerosos restos lisina del anticuerpo. También se ha logrado la conjugación a través de grupos tiol presentes, o modificados por ingeniería genética, en el anticuerpo de interés. Por ejemplo, se han introducido restos de cisteína en proteínas mediante técnicas de ingeniería genética para formar sitios de enlace covalente para ligandos (Better *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 13:9644-9650; Bernhard *et al.* (1994) *Bioconjugate Chem.* 5:126-132; Greenwood *et al.* (1994) *Therapeutic Immunol.* 1:247-255; Tu *et al.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 96:4862-4867; Kanno *et al.* (2000) *J. Biotechnology*, 76:207-214; Chmura *et al.* (2001) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 98(15):8480-8484; patente de Estados Unidos n.º: 6.248.564). Una vez que existe un resto de cisteína libre en el anticuerpo de interés, las toxinas se pueden unir a ese sitio. Como un ejemplo, los reactivos enlazadores de fármacos, maleimidocaproil-monometil auristatina E (MMAE), es decir, MC-MMAE, maleimidocaproil-monometil auristatina F (MMAF), es decir, MC-MMAF, MC-val-cit-PAB-MMAE o MC-val-cit-PAB-MMAF, disueltos en DMSO, se diluyen en acetonitrilo y agua a una concentración conocida, y se añaden a anticuerpo derivatizado con cisteína enfriado en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Después de aproximadamente una hora, se añade un exceso de maleimida para interrumpir la reacción y tapar cualquiera de los grupos tiol del anticuerpo que no hayan reaccionado. La mezcla de reacción se

concentra mediante ultrafiltración centrífuga y el anticuerpo conjugado a toxina se purifica y desala mediante elución a través de resina G25 en PBS, se filtra a través de filtros de 0,2 m en condiciones estériles, y se congela para el almacenamiento.

5 Adicionalmente, los anticuerpos anti-Hhip1<sub>β12</sub> de la presente invención se pueden conjugar a las toxinas auristatina y dolostatina (tales como MMAE y MMAF) utilizando la siguiente técnica. Se trata el anticuerpo, disuelto en borato de sodio 500 mM y cloruro de sodio 500 mM a pH 8,0 con un exceso de ditioneitol (DTT) 100 mM. Después de la incubación a 37 °C durante aproximadamente 30 minutos, el tampón se intercambia mediante elución en resina Sefadex G25 y se eluye con PBS con DTPA 1 mM. Se controla el valor tiol/Ac mediante la determinación de la  
10 concentración de anticuerpo reducido a partir de la absorbancia a 280 nm de la solución y la concentración de tiol mediante reacción con DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) y la determinación de la absorbancia a 412 nm. El anticuerpo reducido disuelto en PBS se enfría en hielo.

15 El reactivo enlazador de fármaco, (1) maleimidocaproil-monometil auristatina E (MMAE), es decir MC-MMAE, (2) MC-MMAF, (3) MC-val-cit-PAB-MMAE, o (4) MC-val-cit-PAB-MMAF disueltos en DMSO, se diluye en acetonitrilo y agua a concentración conocida, y se añade al anticuerpo reducido enfriado en PBS. Después de aproximadamente una hora, se añade un exceso de maleimida para interrumpir la reacción y tapar cualquiera de los grupos tiol del anticuerpo que no haya reaccionado. La mezcla de reacción se concentra mediante ultrafiltración centrífuga y el anticuerpo conjugado se purifica y desala mediante elución a través de resina G25 en PBS, se filtra a través de  
20 filtros de 0,2 m en condiciones estériles, y se congela para el almacenamiento.

#### **Ejemplo 16: Purificación de los polipéptidos Hhip1 utilizando anticuerpos específicos**

25 Se pueden purificar los polipéptidos Hhip1 nativos o recombinantes mediante diversas técnicas convencionales en la técnica de la purificación de proteínas. Por ejemplo, el polipéptido pro-Hhip1<sub>β12</sub>, el polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> maduro, o el polipéptido pre-Hhip1, se purifican mediante cromatografía de inmunoafinidad utilizando anticuerpos específicos para el polipéptido Hhip1 de interés. En general, una columna de inmunoafinidad se construye mediante el acoplamiento covalente del anticuerpo anti-polipéptido Hhip1 a una resina cromatográfica activada.

30 Las inmunoglobulinas policlonales se preparan a partir de sueros inmunes mediante precipitación con sulfato de amonio o mediante purificación en Proteína A inmovilizada (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J.). Asimismo, los anticuerpos monoclonales se preparan a partir de líquido ascítico de ratón mediante precipitación con sulfato de amonio o cromatografía en Proteína A inmovilizada. La inmunoglobulina parcialmente purificada se une covalentemente a una resina cromatográfica tal como SEPHAROSE™ activada con CnBr (Pharmacia LKB  
35 Biotechnology). Se acopla el anticuerpo a la resina, la resina se bloquea, y la resina derivada se lava de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

40 Tal columna de inmunoafinidad se utiliza en la purificación del polipéptido Hhip1 mediante la preparación de una fracción de células que contienen el polipéptido Hhip1 en una forma soluble. La preparación se deriva mediante la solubilización de la célula entera o de una fracción subcelular obtenida a través de centrifugación diferencial mediante la adición de detergente o mediante otros métodos bien conocidos en la técnica. De forma alternativa, el polipéptido Hhip1 soluble que contiene una secuencia señal se puede secretar en cantidad útil en el medio en el que las células se cultivaron.

45 Una preparación que contiene polipéptido Hhip1<sub>β12</sub> soluble se pasa a través de la columna de inmunoafinidad, y la columna se lava en condiciones que permiten la absorbancia preferencial del polipéptido Hhip1 (es decir, tampones de alta fuerza iónica en presencia de detergentes). Después, la columna se eluye en condiciones que rompan la unión anticuerpo/polipéptido Hhip1 (por ejemplo, un tampón de pH bajo tal como aproximadamente pH 2-3, o una concentración alta de un caotrópico tal como urea o ion tiocianato), y se recoge el polipéptido Hhip1<sub>β12</sub>.  
50

La especificación escrita precedente se considera suficiente para permitir que un experto en la materia ponga en práctica la invención. El ámbito de la presente invención no se limita mediante las ilustraciones específicas divulgadas en el presente documento. De hecho, diversas modificaciones de la invención, además de las mostradas, y descritas en el presente documento, serán obvias para los expertos en la materia a partir de la descripción  
55 precedente, y caen dentro del ámbito de las reivindicaciones adjuntas.

#### **LISTADO DE SECUENCIAS**

60 <110> GENENTECH, INC. BOSANAC, Ivan HYMOWITZ, Sarah G. LAZARUS, Robert A. MAUN, Henry R SCALES, Suzanna J. WEN, Xiaohui

<120> VARIANTE DE LA PROTEÍNA HHIP1 Y MÉTODOS Y USOS DE LA MISMA

<130> P4202R1

65

<140> PCT/US 09/000000

ES 2 564 055 T3

<141> 01-06-2009

<150> 61/057762

<151> 30-05-2008

5 <160> 83

<170> PatentIn versión 3.5

10 <210> 1  
<211> 2680  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

15 <400> 1

gagaagctgc agccgcccgc agaggagacc tcagcatcat cttagagccca gcgctggccc 60

tgectccgcc tgccccgcgc ccgcccgcgc cgtttctggt cctgctactg tcccacctaa 120

acaactcccg ttacaocggac aagtgaacat ctgtggctgt cctctccttt tcttccctct 180

cttccaactc cttctctctc tcccacttcc cagccgcagc agaaagcccc caaccctact 240

gacactggca caactgcaaa cgggtgtcatc cgcacaactt tatctcgctc ctggggctcc 300

cctaaggcat tggaccctate gccgcgtctt ttatTTTTTg caaagttgca tcgctgtaca 360

tatTTTTgtc cccgccacct ccctctgtct ctggagtgcc ctacagcccc gaaaactctc 420

cctggagctg cgccttagtg cccctgctgg gcagtgggct tccccccat cctcccgcgc 480

ccagccctg ctgctctggg cagacgatgc tgaagatgct ctctttaaag ctgctgctgc 540

tggccgtggc tctgggcttc tttgaaggag atgctaagtt tggggaaaga aacgaagggg 600

gcccagcaag gaggagaagg tgctgaatg ggaaccccc gaagcgctg aaaaggagag 660

acaggaggat gatgtcccag ctggagctgc tgagtggggg agagatgctg tgcggtggct 720

tctaccctcg gctgtctctg tgcttgccga gtgacagccc ggggctaggg cgcctggaga 780

ataagatatt ttctgttacc aacaacacag aatgtgggaa gttactggag gaaatcaaat 840

gtgcactttg ctctccacat tctcaaagcc tgttccactc acctgagaga gaagtcttgg 900

aaagagacct agtacttctc ctgctctgca aagactattg caaagaattc ttttacctt 960

ES 2 564 055 T3

gccgaggcca tattccaggt ttcccttcaaa caactgcgga tgagttttgc ttttactatg 1020  
 caagaaaaga tgggtgggttg tgctttccag attttccaag aaaacaagtc agaggaccag 1080  
 catctaacta cttggaccag atggaagaat atgacaaagt ggaagagatc agcagaaagc 1140  
 acaaacacaa ctgcttctgt attcaggagg ttgtgagtgg gctgcgccag cccgttgggtg 1200  
 ccctgcatag tggggatggc tcgcaacgtc tcttcattct ggaaaaagaa ggttatgtga 1260  
 agatacttac ccctgaagga gaaattttca aggagcctta tttggacatt cacaaacttg 1320  
 ttcaaagtgg aataaaggga ggagatgaaa gaggactgct aagcctcgca ttccatccca 1380  
 attacaagaa aaatggaaag ttgtatgtgt cctataccac caaccaagaa cgggtgggcta 1440  
 tcgggcctca tgaccacatt cttaggggtt tggaatacac agtatccaga aaaaatccac 1500  
 accaagttga tttgagaaca gccagagtct ttcttgaagt tgcagaactc cacagaaagc 1560  
 atctgggagg acaactgctc tttggccctg acggcttttt gtacatcatt cttgggtgatg 1620  
 ggatgattac actggatgat atggaagaaa tggatgggtt aagtgatttc acaggctcag 1680  
 tgctacggct ggatgtggac acagacatgt gcaacgtgcc ttattccata ccaaggagca 1740  
 acccactt caacagcacc aaccagcccc ccgaagtgtt tgctcatggg ctccacgatc 1800  
 caggcagatg tgctgtggat agacatccca ctgatataaa catcaattta acgatactgt 1860  
 gttcagactc caatggaaaa aacagatcat cagccagaat tctacagata ataaagggga 1920  
 aagattatga aagtgagcca tcaacttttag aattcaagcc attcagtaat ggtccttttg 1980  
 ttggtggatt tgtataccgg ggctgccagt cagaaagatt gtatggaagc tacgtgtttg 2040  
 gagatcgtaa tgggaatttc ctaactctcc agcaaagtcc tgtgacaaag cagtggcaag 2100  
 aaaaaccact ctgtctcggc actagtgggt cctgtagagg ctacttttcc ggtcacatct 2160  
 tgggatttgg agaagatgaa ctaggtgaag ttacatttt atcaagcagt aaaagtatga 2220  
 ccagactca caatggaaaa ctctacaaaa ttgtagatcc caaaagacct ttaatgctg 2280  
 agaatgcag agccacggta caacctgcac agacactgac ttcagagtgc tccaggetct 2340  
 gtcgaaaagg ctactgcacc cccacgggaa agtgctgctg cagtccaggc tgggaggggg 2400  
 acttctgcag aactgcaaaa tgtgagccag catgtcgtca tggaggtgtc tgtgttagac 2460  
 cgaacaagtg cctctgtaaa aaaggatata ttggtcctca atgtgaacaa gtggacagaa 2520  
 acatccgcag agtgaccagg gcaggtattc ttgatcagat cattgacatg acatcttact 2580  
 tgctggatct aacaagttac attgtatagt ttctgggact gtttgaatat totattccaa 2640  
 tgggcattta tttttatcc tgtcattaa aaaaaaaaaa 2680

<210> 2  
 <211> 700  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 2

ES 2 564 055 T3

Met Leu Lys Met Leu Ser Phe Lys Leu Leu Leu Leu Ala Val Ala Leu  
1 5 10 15

Gly Phe Phe Glu Gly Asp Ala Lys Phe Gly Glu Arg Asn Glu Gly Ser  
20 25 30

Gly Ala Arg Arg Arg Arg Cys Leu Asn Gly Asn Pro Pro Lys Arg Leu  
35 40 45

Lys Arg Arg Asp Arg Arg Met Met Ser Gln Leu Glu Leu Leu Ser Gly  
50 55 60

Gly Glu Met Leu Cys Gly Gly Phe Tyr Pro Arg Leu Ser Cys Cys Leu  
65 70 75 80

Arg Ser Asp Ser Pro Gly Leu Gly Arg Leu Glu Asn Lys Ile Phe Ser  
85 90 95

Val Thr Asn Asn Thr Glu Cys Gly Lys Leu Leu Glu Glu Ile Lys Cys  
100 105 110

Ala Leu Cys Ser Pro His Ser Gln Ser Leu Phe His Ser Pro Glu Arg  
115 120 125

Glu Val Leu Glu Arg Asp Leu Val Leu Pro Leu Leu Cys Lys Asp Tyr  
130 135 140

Cys Lys Glu Phe Phe Tyr Thr Cys Arg Gly His Ile Pro Gly Phe Leu  
145 150 155 160

Gln Thr Thr Ala Asp Glu Phe Cys Phe Tyr Tyr Ala Arg Lys Asp Gly  
165 170 175

Gly Leu Cys Phe Pro Asp Phe Pro Arg Lys Gln Val Arg Gly Pro Ala  
180 185 190

Ser Asn Tyr Leu Asp Gln Met Glu Glu Tyr Asp Lys Val Glu Glu Ile  
195 200 205

Ser Arg Lys His Lys His Asn Cys Phe Cys Ile Gln Glu Val Val Ser  
210 215 220

ES 2 564 055 T3

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

Arg Leu Phe Ile Leu Glu Lys Glu Gly Tyr Val Lys Ile Leu Thr Pro  
 245 250 255

Glu Gly Glu Ile Phe Lys Glu Pro Tyr Leu Asp Ile His Lys Leu Val  
 260 265 270

Gln Ser Gly Ile Lys Gly Gly Asp Glu Arg Gly Leu Leu Ser Leu Ala  
 275 280 285

Phe His Pro Asn Tyr Lys Lys Asn Gly Lys Leu Tyr Val Ser Tyr Thr  
 290 295 300

Thr Asn Gln Glu Arg Trp Ala Ile Gly Pro His Asp His Ile Leu Arg  
 305 310 315 320

Val Val Glu Tyr Thr Val Ser Arg Lys Asn Pro His Gln Val Asp Leu  
 325 330 335

Arg Thr Ala Arg Val Phe Leu Glu Val Ala Glu Leu His Arg Lys His  
 340 345 350

Leu Gly Gly Gln Leu Leu Phe Gly Pro Asp Gly Phe Leu Tyr Ile Ile  
 355 360 365

Leu Gly Asp Gly Met Ile Thr Leu Asp Asp Met Glu Glu Met Asp Gly  
 370 375 380

Leu Ser Asp Phe Thr Gly Ser Val Leu Arg Leu Asp Val Asp Thr Asp  
 385 390 395 400

Met Cys Asn Val Pro Tyr Ser Ile Pro Arg Ser Asn Pro His Phe Asn  
 405 410 415

Ser Thr Asn Gln Pro Pro Glu Val Phe Ala His Gly Leu His Asp Pro  
 420 425 430

Gly Arg Cys Ala Val Asp Arg His Pro Thr Asp Ile Asn Ile Asn Leu  
 435 440 445

Thr Ile Leu Cys Ser Asp Ser Asn Gly Lys Asn Arg Ser Ser Ala Arg  
 450 455 460

ES 2 564 055 T3

Ile Leu Gln Ile Ile Lys Gly Lys Asp Tyr Glu Ser Glu Pro Ser Leu  
465 470 475 480

Leu Glu Phe Lys Pro Phe Ser Asn Gly Pro Leu Val Gly Gly Phe Val  
485 490 495

Tyr Arg Gly Cys Gln Ser Glu Arg Leu Tyr Gly Ser Tyr Val Phe Gly  
500 505 510

Asp Arg Asn Gly Asn Phe Leu Thr Leu Gln Gln Ser Pro Val Thr Lys  
515 520 525

Gln Trp Gln Glu Lys Pro Leu Cys Leu Gly Thr Ser Gly Ser Cys Arg  
530 535 540

Gly Tyr Phe Ser Gly His Ile Leu Gly Phe Gly Glu Asp Glu Leu Gly  
545 550 555 560

Glu Val Tyr Ile Leu Ser Ser Ser Lys Ser Met Thr Gln Thr His Asn  
565 570 575

Gly Lys Leu Tyr Lys Ile Val Asp Pro Lys Arg Pro Leu Met Pro Glu  
580 585 590

Glu Cys Arg Ala Thr Val Gln Pro Ala Gln Thr Leu Thr Ser Glu Cys  
595 600 605

Ser Arg Leu Cys Arg Asn Gly Tyr Cys Thr Pro Thr Gly Lys Cys Cys  
610 615 620

Cys Ser Pro Gly Trp Glu Gly Asp Phe Cys Arg Thr Ala Lys Cys Glu  
625 630 635 640

Pro Ala Cys Arg His Gly Gly Val Cys Val Arg Pro Asn Lys Cys Leu  
645 650 655

Cys Lys Lys Gly Tyr Leu Gly Pro Gln Cys Glu Gln Val Asp Arg Asn  
660 665 670

Ile Arg Arg Val Thr Arg Ala Gly Ile Leu Asp Gln Ile Ile Asp Met  
675 680 685

Thr Ser Tyr Leu Leu Asp Leu Thr Ser Tyr Ile Val  
690 695 700

ES 2 564 055 T3

<210> 3  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 3

Met Leu Lys Met Leu Ser Phe Lys Leu Leu Leu Leu Ala Val Ala Leu  
 1 5 10 15

Gly Phe Phe

10 <210> 4  
 <211> 131  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 4

Met Met Ser Gln Leu Glu Leu Leu Ser Gly Gly Glu Met Leu Cys Gly  
 1 5 10 15

Gly Phe Tyr Pro Arg Leu Ser Cys Cys Leu Arg Ser Asp Ser Pro Gly  
 20 25 30

Leu Gly Arg Leu Glu Asn Lys Ile Phe Ser Val Thr Asn Asn Thr Glu  
 35 40 45

Cys Gly Lys Leu Leu Glu Glu Ile Lys Cys Ala Leu Cys Ser Pro His  
 50 55 60

Ser Gln Ser Leu Phe His Ser Pro Glu Arg Glu Val Leu Glu Arg Asp  
 65 70 75 80

Leu Val Leu Pro Leu Leu Cys Lys Asp Tyr Cys Lys Glu Phe Phe Tyr  
 85 90 95

Thr Cys Arg Gly His Ile Pro Gly Phe Leu Gln Thr Thr Ala Asp Glu  
 100 105 110

Phe Cys Phe Tyr Tyr Ala Arg Lys Asp Gly Gly Leu Cys Phe Pro Asp  
 115 120 125

Phe Pro Arg  
 130

20 <210> 5  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 5

ES 2 564 055 T3

Lys Gln Val Arg Gly Pro Ala  
 1 5

5 <210> 6  
 <211> 415  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 6

Ser Asn Tyr Leu Asp Gln Met Glu Glu Tyr Asp Lys Val Glu Glu Ile  
 1 5 10 15

Ser Arg Lys His Lys His Asn Cys Phe Cys Ile Gln Glu Val Val Ser  
 20 25 30

Gly Leu Arg Gln Pro Val Gly Ala Leu His Ser Gly Asp Gly Ser Gln  
 35 40 45

Arg Leu Phe Ile Leu Glu Lys Glu Gly Tyr Val Lys Ile Leu Thr Pro  
 50 55 60

Glu Gly Glu Ile Phe Lys Glu Pro Tyr Leu Asp Ile His Lys Leu Val  
 65 70 75 80

Gln Ser Gly Ile Lys Gly Gly Asp Glu Arg Gly Leu Leu Ser Leu Ala  
 85 90 95

Phe His Pro Asn Tyr Lys Lys Asn Gly Lys Leu Tyr Val Ser Tyr Thr  
 100 105 110

Thr Asn Gln Glu Arg Trp Ala Ile Gly Pro His Asp His Ile Leu Arg  
 115 120 125

Val Val Glu Tyr Thr Val Ser Arg Lys Asn Pro His Gln Val Asp Leu  
 130 135 140

Arg Thr Ala Arg Val Phe Leu Glu Val Ala Glu Leu His Arg Lys His  
 145 150 155 160

Leu Gly Gly Gln Leu Leu Phe Gly Pro Asp Gly Phe Leu Tyr Ile Ile  
 165 170 175

Leu Gly Asp Gly Met Ile Thr Leu Asp Asp Met Glu Glu Met Asp Gly  
 180 185 190

10

ES 2 564 055 T3

Leu Ser Asp Phe Thr Gly Ser Val Leu Arg Leu Asp Val Asp Thr Asp  
 195 200 205

Met Cys Asn Val Pro Tyr Ser Ile Pro Arg Ser Asn Pro His Phe Asn  
 210 215 220

Ser Thr Asn Gln Pro Pro Glu Val Phe Ala His Gly Leu His Asp Pro  
 225 230 235 240

Gly Arg Cys Ala Val Asp Arg His Pro Thr Asp Ile Asn Ile Asn Leu  
 245 250 255

Thr Ile Leu Cys Ser Asp Ser Asn Gly Lys Asn Arg Ser Ser Ala Arg  
 260 265 270

Ile Leu Gln Ile Ile Lys Gly Lys Asp Tyr Glu Ser Glu Pro Ser Leu  
 275 280 285

Leu Glu Phe Lys Pro Phe Ser Asn Gly Pro Leu Val Gly Gly Phe Val  
 290 295 300

Tyr Arg Gly Cys Gln Ser Glu Arg Leu Tyr Gly Ser Tyr Val Phe Gly  
 305 310 315 320

Asp Arg Asn Gly Asn Phe Leu Thr Leu Gln Gln Ser Pro Val Thr Lys  
 325 330 335

Gln Trp Gln Glu Lys Pro Leu Cys Leu Gly Thr Ser Gly Ser Cys Arg  
 340 345 350

Gly Tyr Phe Ser Gly His Ile Leu Gly Phe Gly Glu Asp Glu Leu Gly  
 355 360 365

Glu Val Tyr Ile Leu Ser Ser Ser Lys Ser Met Thr Gln Thr His Asn  
 370 375 380

Gly Lys Leu Tyr Lys Ile Val Asp Pro Lys Arg Pro Leu Met Pro Glu  
 385 390 395 400

Glu Cys Arg Ala Thr Val Gln Pro Ala Gln Thr Leu Thr Ser Glu  
 405 410 415

<210> 7  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

ES 2 564 055 T3

<400> 7

Met Ile Thr Leu Asp Asp Met Glu Glu Met Asp Gly Leu Ser Asp Phe  
 1 5 10 15

Thr Gly

5 <210> 8  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 8

Cys Ser Arg Leu Cys Arg Asn Gly Tyr Cys Thr Pro Thr Gly Lys Cys  
 1 5 10 15

Cys Cys Ser Pro Gly Trp Glu Gly Asp Phe Cys Arg Thr Ala  
 20 25 30

15 <210> 9  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 9

Lys Cys Glu Pro Ala Cys Arg His Gly Gly Val Cys Val Arg Pro Asn  
 1 5 10 15

Lys Cys Leu Cys Lys Lys Gly Tyr Leu Gly Pro Gln Cys Glu  
 20 25 30

25 <210> 10  
 <211> 33  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 10

Gln Val Asp Arg Asn Ile Arg Arg Val Thr Arg Ala Gly Ile Leu Asp  
 1 5 10 15

Gln Ile Ile Asp Met Thr Ser Tyr Leu Leu Asp Leu Thr Ser Tyr Ile  
 20 25 30

30 Val

<210> 11  
 <211> 475  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 11

ES 2 564 055 T3

Ser Asn Tyr Leu Asp Gln Met Glu Glu Tyr Asp Lys Val Glu Glu Ile  
 1 5 10 15

Ser Arg Lys His Lys His Asn Cys Phe Cys Ile Gln Glu Val Val Ser  
 20 25 30

Gly Leu Arg Gln Pro Val Gly Ala Leu His Ser Gly Asp Gly Ser Gln  
 35 40 45

Arg Leu Phe Ile Leu Glu Lys Glu Gly Tyr Val Lys Ile Leu Thr Pro  
 50 55 60

Glu Gly Glu Ile Phe Lys Glu Pro Tyr Leu Asp Ile His Lys Leu Val  
 65 70 75 80

Gln Ser Gly Ile Lys Gly Gly Asp Glu Arg Gly Leu Leu Ser Leu Ala  
 85 90 95

Phe His Pro Asn Tyr Lys Lys Asn Gly Lys Leu Tyr Val Ser Tyr Thr  
 100 105 110

Thr Asn Gln Glu Arg Trp Ala Ile Gly Pro His Asp His Ile Leu Arg  
 115 120 125

Val Val Glu Tyr Thr Val Ser Arg Lys Asn Pro His Gln Val Asp Leu  
 130 135 140

Arg Thr Ala Arg Val Phe Leu Glu Val Ala Glu Leu His Arg Lys His  
 145 150 155 160

Leu Gly Gly Gln Leu Leu Phe Gly Pro Asp Gly Phe Leu Tyr Ile Ile  
 165 170 175

Leu Gly Asp Gly Met Ile Thr Leu Asp Asp Met Glu Glu Met Asp Gly  
 180 185 190

Leu Ser Asp Phe Thr Gly Ser Val Leu Arg Leu Asp Val Asp Thr Asp  
 195 200 205

Met Cys Asn Val Pro Tyr Ser Ile Pro Arg Ser Asn Pro His Phe Asn  
 210 215 220

ES 2 564 055 T3

Ser Thr Asn Gln Pro Pro Glu Val Phe Ala His Gly Leu His Asp Pro  
 225 230 235 240

Gly Arg Cys Ala Val Asp Arg His Pro Thr Asp Ile Asn Ile Asn Leu  
 245 250 255

Thr Ile Leu Cys Ser Asp Ser Asn Gly Lys Asn Arg Ser Ser Ala Arg  
 260 265 270

Ile Leu Gln Ile Ile Lys Gly Lys Asp Tyr Glu Ser Glu Pro Ser Leu  
 275 280 285

Leu Glu Phe Lys Pro Phe Ser Asn Gly Pro Leu Val Gly Gly Phe Val  
 290 295 300

Tyr Arg Gly Cys Gln Ser Glu Arg Leu Tyr Gly Ser Tyr Val Phe Gly  
 305 310 315 320

Asp Arg Asn Gly Asn Phe Leu Thr Leu Gln Gln Ser Pro Val Thr Lys  
 325 330 335

Gln Trp Gln Glu Lys Pro Leu Cys Leu Gly Thr Ser Gly Ser Cys Arg  
 340 345 350

Gly Tyr Phe Ser Gly His Ile Leu Gly Phe Gly Glu Asp Glu Leu Gly  
 355 360 365

Glu Val Tyr Ile Leu Ser Ser Ser Lys Ser Met Thr Gln Thr His Asn  
 370 375 380

Gly Lys Leu Tyr Lys Ile Val Asp Pro Lys Arg Pro Leu Met Pro Glu  
 385 390 395 400

Glu Cys Arg Ala Thr Val Gln Pro Ala Gln Thr Leu Thr Ser Glu Cys  
 405 410 415

Ser Arg Leu Cys Arg Asn Gly Tyr Cys Thr Pro Thr Gly Lys Cys Cys  
 420 425 430

Cys Ser Pro Gly Trp Glu Gly Asp Phe Cys Arg Thr Ala Lys Cys Glu  
 435 440 445

Pro Ala Cys Arg His Gly Gly Val Cys Val Arg Pro Asn Lys Cys Leu  
 450 455 460

ES 2 564 055 T3

Cys Lys Lys Gly Tyr Leu Gly Pro Gln Cys Glu  
465 470 475

5 <210> 12  
<211> 475  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
  
<400> 12

ES 2 564 055 T3

Ser Asn Tyr Leu Asp Gln Met Glu Glu Tyr Asp Lys Val Glu Glu Ile  
 1 5 10 15

Ser Arg Lys His Lys His Asn Cys Phe Cys Ile Gln Glu Val Val Ser  
 20 25 30

Gly Leu Arg Gln Pro Val Gly Ala Leu His Ser Gly Asp Gly Ser Gln  
 35 40 45

Arg Leu Phe Ile Leu Glu Lys Glu Gly Tyr Val Lys Ile Leu Thr Pro  
 50 55 60

Glu Gly Glu Ile Phe Lys Glu Pro Tyr Leu Asp Ile His Lys Leu Val  
 65 70 75 80

Gln Ser Gly Ile Lys Gly Gly Asp Glu Arg Gly Leu Leu Ser Leu Ala  
 85 90 95

Phe His Pro Asn Tyr Lys Lys Asn Gly Lys Leu Tyr Val Ser Tyr Thr  
 100 105 110

Thr Asn Gln Glu Arg Trp Ala Ile Gly Pro His Asp His Ile Leu Arg  
 115 120 125

Val Val Glu Tyr Thr Val Ser Arg Lys Asn Pro His Gln Val Asp Leu  
 130 135 140

Arg Thr Ala Arg Val Phe Leu Glu Val Ala Glu Leu His Arg Lys His  
 145 150 155 160

Leu Gly Gly Gln Leu Leu Phe Gly Pro Asp Gly Phe Leu Tyr Ile Ile  
 165 170 175

Leu Gly Asp Gly Met Ile Thr Leu Asp Asp Met Glu Glu Met Asp Gly  
 180 185 190

Leu Ser Asp Phe Thr Gly Ser Val Leu Arg Leu Asp Val Asp Thr Asp  
 195 200 205

ES 2 564 055 T3

Met Cys Asn Val Pro Tyr Ser Ile Pro Arg Ser Asn Pro His Phe Asn  
 210 215 220

Ser Thr Asn Gln Pro Pro Glu Val Phe Ala His Gly Leu His Asp Pro  
 225 230 235 240

Gly Arg Cys Ala Val Asp Arg His Pro Thr Asp Ile Asn Ile Asn Leu  
 245 250 255

Thr Ile Leu Cys Ser Asp Ser Asn Gly Lys Asn Arg Ser Ser Ala Arg  
 260 265 270

Ile Leu Gln Ile Ile Lys Gly Lys Asp Tyr Glu Ser Glu Pro Ser Leu  
 275 280 285

Leu Glu Phe Lys Pro Phe Ser Asn Gly Pro Leu Val Gly Gly Phe Val  
 290 295 300

Tyr Arg Gly Cys Gln Ser Glu Arg Leu Tyr Gly Ser Tyr Val Phe Gly  
 305 310 315 320

Asp Arg Asn Gly Asn Phe Leu Thr Leu Gln Gln Ser Pro Val Thr Lys  
 325 330 335

Gln Trp Gln Glu Lys Pro Leu Cys Leu Gly Thr Ser Gly Ser Cys Arg  
 340 345 350

Gly Tyr Phe Ser Gly His Ile Leu Gly Phe Gly Glu Asp Glu Leu Gly  
 355 360 365

Glu Val Tyr Ile Leu Ser Ser Ser Lys Ser Met Thr Gln Thr His Asn  
 370 375 380

Gly Lys Leu Tyr Lys Ile Val Asp Pro Lys Arg Pro Leu Met Pro Glu  
 385 390 395 400

Glu Cys Arg Ala Thr Val Gln Pro Ala Gln Thr Leu Thr Ser Glu Cys  
 405 410 415

Ser Arg Leu Cys Arg Asn Gly Tyr Cys Thr Pro Thr Gly Lys Cys Cys  
 420 425 430

Cys Ser Pro Gly Trp Glu Gly Asp Phe Cys Arg Thr Ala Lys Cys Glu  
 435 440 445

ES 2 564 055 T3

Pro Ala Cys Arg His Gly Gly Val Cys Val Arg Pro Asn Lys Cys Leu  
 450 455 460

Cys Lys Lys Gly Tyr Leu Gly Pro Gln Cys Glu  
 465 470 475

5 <210> 13  
 <211> 445  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 13

Ser Asn Tyr Leu Asp Gln Met Glu Glu Tyr Asp Lys Val Glu Glu Ile  
 1 5 10 15

Ser Arg Lys His Lys His Asn Cys Phe Cys Ile Gln Glu Val Val Ser  
 20 25 30

Gly Leu Arg Gln Pro Val Gly Ala Leu His Ser Gly Asp Gly Ser Gln  
 35 40 45

Arg Leu Phe Ile Leu Glu Lys Glu Gly Tyr Val Lys Ile Leu Thr Pro  
 50 55 60

Glu Gly Glu Ile Phe Lys Glu Pro Tyr Leu Asp Ile His Lys Leu Val  
 65 70 75 80

Gln Ser Gly Ile Lys Gly Gly Asp Glu Arg Gly Leu Leu Ser Leu Ala  
 85 90 95

Phe His Pro Asn Tyr Lys Lys Asn Gly Lys Leu Tyr Val Ser Tyr Thr  
 100 105 110

Thr Asn Gln Glu Arg Trp Ala Ile Gly Pro His Asp His Ile Leu Arg  
 115 120 125

Val Val Glu Tyr Thr Val Ser Arg Lys Asn Pro His Gln Val Asp Leu  
 130 135 140

Arg Thr Ala Arg Val Phe Leu Glu Val Ala Glu Leu His Arg Lys His  
 145 150 155 160

Leu Gly Gly Gln Leu Leu Phe Gly Pro Asp Gly Phe Leu Tyr Ile Ile  
 165 170 175

Leu Gly Asp Gly Met Ile Thr Leu Asp Asp Met Glu Glu Met Asp Gly

10



ES 2 564 055 T3

Cys Ser Pro Gly Trp Glu Gly Asp Phe Cys Arg Thr Ala  
 435 440 445

5 <210> 14  
 <211> 415  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 14

Ser Asn Tyr Leu Asp Gln Met Glu Glu Tyr Asp Lys Val Glu Glu Ile  
 1 5 10 15

Ser Arg Lys His Lys His Asn Cys Phe Cys Ile Gln Glu Val Val Ser  
 20 25 30

Gly Leu Arg Gln Pro Val Gly Ala Leu His Ser Gly Asp Gly Ser Gln  
 35 40 45

Arg Leu Phe Ile Leu Glu Lys Glu Gly Tyr Val Lys Ile Leu Thr Pro  
 50 55 60

Glu Gly Glu Ile Phe Lys Glu Pro Tyr Leu Asp Ile His Lys Leu Val  
 65 70 75 80

Gln Ser Gly Ile Lys Gly Gly Asp Glu Arg Gly Leu Leu Ser Leu Ala  
 85 90 95

Phe His Pro Asn Tyr Lys Lys Asn Gly Lys Leu Tyr Val Ser Tyr Thr  
 100 105 110

Thr Asn Gln Glu Arg Trp Ala Ile Gly Pro His Asp His Ile Leu Arg  
 115 120 125

Val Val Glu Tyr Thr Val Ser Arg Lys Asn Pro His Gln Val Asp Leu  
 130 135 140

Arg Thr Ala Arg Val Phe Leu Glu Val Ala Glu Leu His Arg Lys His  
 145 150 155 160

Leu Gly Gly Gln Leu Leu Phe Gly Pro Asp Gly Phe Leu Tyr Ile Ile  
 165 170 175

Leu Gly Asp Gly Met Ile Thr Leu Asp Asp Met Glu Glu Met Asp Gly  
 180 185 190

10

ES 2 564 055 T3

Leu Ser Asp Phe Thr Gly Ser Val Leu Arg Leu Asp Val Asp Thr Asp  
 195 200 205

Met Cys Asn Val Pro Tyr Ser Ile Pro Arg Ser Asn Pro His Phe Asn  
 210 215 220

Ser Thr Asn Gln Pro Pro Glu Val Phe Ala His Gly Leu His Asp Pro  
 225 230 235 240

Gly Arg Cys Ala Val Asp Arg His Pro Thr Asp Ile Asn Ile Asn Leu  
 245 250 255

Thr Ile Leu Cys Ser Asp Ser Asn Gly Lys Asn Arg Ser Ser Ala Arg  
 260 265 270

Ile Leu Gln Ile Ile Lys Gly Lys Asp Tyr Glu Ser Glu Pro Ser Leu  
 275 280 285

Leu Glu Phe Lys Pro Phe Ser Asn Gly Pro Leu Val Gly Gly Phe Val  
 290 295 300

Tyr Arg Gly Cys Gln Ser Glu Arg Leu Tyr Gly Ser Tyr Val Phe Gly  
 305 310 315 320

Asp Arg Asn Gly Asn Phe Leu Thr Leu Gln Gln Ser Pro Val Thr Lys  
 325 330 335

Gln Trp Gln Glu Lys Pro Leu Cys Leu Gly Thr Ser Gly Ser Cys Arg  
 340 345 350

Gly Tyr Phe Ser Gly His Ile Leu Gly Phe Gly Glu Asp Glu Leu Gly  
 355 360 365

Glu Val Tyr Ile Leu Ser Ser Ser Lys Ser Met Thr Gln Thr His Asn  
 370 375 380

Gly Lys Leu Tyr Lys Ile Val Asp Pro Lys Arg Pro Leu Met Pro Glu  
 385 390 395 400

Glu Cys Arg Ala Thr Val Gln Pro Ala Gln Thr Leu Thr Ser Glu  
 405 410 415

<210> 15  
 <211> 588  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 564 055 T3

<400> 15

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

ES 2 564 055 T3

Ile Phe Lys Glu Pro Tyr Leu Asp Ile His Lys Leu Val Gln Ser Gly  
 245 250 255

Ile Lys Gly Gly Asp Glu Arg Gly Leu Leu Ser Leu Ala Phe His Pro  
 260 265 270

Asn Tyr Lys Lys Asn Gly Lys Leu Tyr Val Ser Tyr Thr Thr Asn Gln  
 275 280 285

Glu Arg Trp Ala Ile Gly Pro His Asp His Ile Leu Arg Val Val Glu  
 290 295 300

Tyr Thr Val Ser Arg Lys Asn Pro His Gln Val Asp Leu Arg Thr Ala  
 305 310 315 320

Arg Val Phe Leu Glu Val Ala Glu Leu His Arg Lys His Leu Gly Gly  
 325 330 335

Gln Leu Leu Phe Gly Pro Asp Gly Phe Leu Tyr Ile Ile Leu Gly Asp  
 340 345 350

Gly Met Ile Thr Leu Asp Asp Met Glu Glu Met Asp Gly Leu Ser Asp  
 355 360 365

Phe Thr Gly Ser Val Leu Arg Leu Asp Val Asp Thr Asp Met Cys Asn  
 370 375 380

Val Pro Tyr Ser Ile Pro Arg Ser Asn Pro His Phe Asn Ser Thr Asn  
 385 390 395 400

Gln Pro Pro Glu Val Phe Ala His Gly Leu His Asp Pro Gly Arg Cys  
 405 410 415

Ala Val Asp Arg His Pro Thr Asp Ile Asn Ile Asn Leu Thr Ile Leu  
 420 425 430

Cys Ser Asp Ser Asn Gly Lys Asn Arg Ser Ser Ala Arg Ile Leu Gln  
 435 440 445

Ile Ile Lys Gly Lys Asp Tyr Glu Ser Glu Pro Ser Leu Leu Glu Phe  
 450 455 460

Lys Pro Phe Ser Asn Gly Pro Leu Val Gly Gly Phe Val Tyr Arg Gly  
 465 470 475 480

ES 2 564 055 T3

Cys Gln Ser Glu Arg Leu Tyr Gly Ser Tyr Val Phe Gly Asp Arg Asn  
485 490 495

Gly Asn Phe Leu Thr Leu Gln Gln Ser Pro Val Thr Lys Gln Trp Gln  
500 505 510

Glu Lys Pro Leu Cys Leu Gly Thr Ser Gly Ser Cys Arg Gly Tyr Phe  
515 520 525

Ser Gly His Ile Leu Gly Phe Gly Glu Asp Glu Leu Gly Glu Val Tyr  
530 535 540

Ile Leu Ser Ser Ser Lys Ser Met Thr Gln Thr His Asn Gly Lys Leu  
545 550 555 560

Tyr Lys Ile Val Asp Pro Lys Arg Pro Leu Met Pro Glu Glu Cys Arg  
565 570 575

Ala Thr Val Gln Pro Ala Gln Thr Leu Thr Ser Glu  
580 585

<210> 16  
<211> 170  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
  
<400> 16

5

ES 2 564 055 T3

Glu Gly Asp Ala Lys Phe Gly Glu Arg Asn Glu Gly Ser Gly Ala Arg  
 1 5 10 15

Arg Arg Arg Cys Leu Asn Gly Asn Pro Pro Lys Arg Leu Lys Arg Arg  
 20 25 30

Asp Arg Arg Met Met Ser Gln Leu Glu Leu Leu Ser Gly Gly Glu Met  
 35 40 45

Leu Cys Gly Gly Phe Tyr Pro Arg Leu Ser Cys Cys Leu Arg Ser Asp  
 50 55 60

Ser Pro Gly Leu Gly Arg Leu Glu Asn Lys Ile Phe Ser Val Thr Asn  
 65 70 75 80

Asn Thr Glu Cys Gly Lys Leu Leu Glu Glu Ile Lys Cys Ala Leu Cys  
 85 90 95

Ser Pro His Ser Gln Ser Leu Phe His Ser Pro Glu Arg Glu Val Leu  
 100 105 110

Glu Arg Asp Leu Val Leu Pro Leu Leu Cys Lys Asp Tyr Cys Lys Glu  
 115 120 125

Phe Phe Tyr Thr Cys Arg Gly His Ile Pro Gly Phe Leu Gln Thr Thr  
 130 135 140

Ala Asp Glu Phe Cys Phe Tyr Tyr Ala Arg Lys Asp Gly Gly Leu Cys  
 145 150 155 160

Phe Pro Asp Phe Pro Arg Lys Gln Val Arg  
 165 170

5 <210> 17  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 17

Gln Leu Thr Lys Gln Arg Leu Val Asp Ala Asp Gly Ile Ile Asn Pro  
 1 5 10 15

Ser Ala

15 <210> 18  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

ES 2 564 055 T3

<400> 18

Gln Leu Thr Lys Gln Arg Leu Val Asp Ala Asp Gly Ile Ile Asn Pro  
 1 5 10 15

Ser Ala

5 <210> 19  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Gallus gallus*

10 <400> 19

Gln Leu Thr Lys Gln Arg Leu Val Asp Ala Asp Gly Ile Ile Asn Pro  
 1 5 10 15

Asn Ala

15 <210> 20  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Danio rerio*

20 <400> 20

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

Glu Val

25 <210> 21  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Drosophila melanogaster*

<400> 21

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

30 Arg Ala

<210> 22  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 35 <213> *Caenorhabditis elegans*

<400> 22

Arg Val Gly Lys Ile Arg Leu Val Asp Ala Ser Gly Ile Ile Asn Ser  
 1 5 10 15

40 Asp Gly

ES 2 564 055 T3

<210> 23  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 5  
 <400> 23  
           Gln Leu Thr Thr Arg Lys Leu Val Asp Arg Glu Gly Leu Ile Pro Pro  
           1                  5                  10                  15  
           Glu Leu  
 10  
 <210> 24  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 15  
 <400> 24  
           Gln Leu Thr Thr Arg Lys Leu Val Asp Lys Glu Gly Leu Ile Pro Pro  
           1                  5                  10                  15  
           Glu Leu  
 20  
 <210> 25  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Macaca mulatta*  
 25  
 <400> 25  
           Met Ile Thr Leu Asp Asp Met Glu Glu Met Asp Gly Leu Ser Asp Phe  
           1                  5                  10                  15  
           Thr Gly  
 30  
 <210> 26  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Pan troglodytes*  
 <400> 26  
           Met Ile Thr Leu Asp Asp Met Glu Glu Met Asp Gly Leu Ser Asp Phe  
           1                  5                  10                  15  
           Thr Gly  
 35  
 <210> 27  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Equus caballus*  
 40  
 <400> 27

ES 2 564 055 T3

Met Ile Thr Leu Asp Asp Met Glu Glu Met Asp Gly Leu Ser Asp Phe  
1 5 10 15

Thr Gly

5 <210> 28  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> *Monodelphis domestica*

<400> 28

Met Ile Thr Leu Asp Asp Met Glu Glu Met Asp Gly Leu Ser Asp Phe  
1 5 10 15

10 Thr Gly

15 <210> 29  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> *Mus musculus*

<400> 29

Met Ile Thr Leu Asp Asp Met Glu Glu Met Asp Gly Leu Ser Asp Phe  
1 5 10 15

20 Thr Gly

25 <210> 30  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> *Bos taurus*

<400> 30

Met Ile Thr Leu Asp Asp Met Glu Glu Met Asp Gly Leu Ser Asp Phe  
1 5 10 15

Thr Gly

30 <210> 31  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> *Canis familiaris*

35 <400> 31

Met Ile Thr Leu Asp Asp Met Glu Glu Met Asp Gly Leu Ser Asp Phe  
1 5 10 15

Thr Gly

40 <210> 32  
<211> 18  
<212> PRT

ES 2 564 055 T3

<213> *Rattus rattus*

<400> 32

Met Ile Thr Leu Asp Asp Met Glu Glu Met Asp Gly Leu Ser Asp Phe  
1 5 10 15

5 Thr Gly

<210> 33

<211> 18

<212> PRT

10 <213> *Ornithorhynchus anatinus*

<400> 33

Met Ile Thr Leu Asp Asp Met Glu Glu Met Asp Gly Leu Ser Asp Phe  
1 5 10 15

15 Thr Gly

<210> 34

<211> 18

<212> PRT

20 <213> *Fugu rubripes*

<400> 34

Met Ile Thr Leu Asp Asp Met Glu Glu Met Asp Gly Leu Ser Asp Phe  
1 5 10 15

25 Thr Gly

<210> 35

<211> 18

<212> PRT

<213> *Tetraodon fluviatilis*

30 <400> 35

Met Ile Thr Leu Asp Asp Met Glu Glu Met Asp Gly Leu Ser Asp Phe  
1 5 10 15

Thr Gly

<210> 36

35 <211> 18

<212> PRT

<213> *Danio rerio*

<400> 36

40

Met Ile Thr Leu Asp Asp Met Glu Glu Met Asp Gly Leu Ser Asp Phe  
1 5 10 15

Thr Gly

ES 2 564 055 T3

<210> 37  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Gallus gallus*  
 5  
 <400> 37  
 Met Ile Thr Leu Asp Asp Met Glu Glu Met Asp Gly Leu Ser Asp Phe  
 1 5 10 15  
 Thr Gly  
 10  
 <210> 38  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> *Xenopus laevis*  
 15  
 <400> 38  
 Met Ile Thr Ile Asp Asp Met Glu Glu Met Asp Gly Leu Ser Asp Phe  
 1 5 10 15  
 Thr Gly  
 20  
 <210> 39  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 30  
 <223> Ile, Leu o Val  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(5)  
 35  
 <223> Cualquier aminoácido  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 40  
 <223> Met o Leu  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 45  
 <223> Cualquier aminoácido  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 50  
 <223> Asp, Glu o Asn  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 55  
 <223> Cualquier aminoácido

ES 2 564 055 T3

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Asp, Ser o Glu  
 5  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (12)..(12)  
 <223> Leu o Ile  
 10  
 <400> 39  
  
 Xaa Gly Xaa  
 1 5 10  
  
 15 <210> 40  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 20 <220>  
 <223> Construcción sintética  
  
 <400> 40  
  
 Lys Phe Leu Val Asn Val Ala Leu Val Phe Met Val Val Tyr Ile Ser  
 1 5 10 15  
  
 Tyr Ile Tyr Ala  
 20 25  
  
 25 <210> 41  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
  
 30 <400> 41  
  
 Met Gly Gly Ala Ala Ala Arg Leu Gly Ala Val Ile Leu Phe Val Val  
 1 5 10 15  
  
 Ile Val Gly Leu His Gly Val Arg Gly  
 20 25  
  
 35 <210> 42  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
  
 40 <400> 42  
  
 Gln Val Thr Asp Lys Thr His Thr  
 1 5  
  
 45 <210> 43

ES 2 564 055 T3

<211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 43  
 Arg Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro Asp Lys Thr His Thr  
 10 1 5 10  
 <210> 44  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 20 <400> 44  
 Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys  
 1 5  
 <210> 45  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 30 <400> 45  
 Met Lys His His His His His His  
 1 5  
 35 <210> 46  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 40 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 <400> 46  
 45 Gly Asp Gly Met Ile Thr Leu Asp Asp Met Glu Glu Met Asp Gly Leu  
 1 5 10 15  
 Ser Asp Phe Thr Gly  
 20  
 <210> 47  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 50 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 55

ES 2 564 055 T3

<400> 47

Glu Asp Gly Ala Lys Phe Gly Glu  
1 5

5 <210> 48  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Construcción sintética

<400> 48

Tyr Leu Asp Gln Met Glu Glu  
1 5

15 <210> 49  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Construcción sintética

25 <400> 49

Lys Val Glu Glu Ile Ser Arg  
1 5

30 <210> 50  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Construcción sintética

<400> 50

Ser Gly Ala Arg Arg Arg  
1 5

40 <210> 51  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Construcción sintética

<400> 51

50 Ser Gly Gly Glu Met Leu Cys  
1 5

55 <210> 52  
<211> 2103  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 52

# ES 2 564 055 T3

atgctgaaga tgctctcctt taagctgctg ctgctggccg tggctctggg cttctttgaa	60
ggagatgcta agtttgggga aagaaacgaa gggagcggag caaggaggag aaggtgcctg	120
aatggaacc cccgaagcg cctgaaaagg agagacagga ggatgatgtc ccagctggag	180
ctgctgagtg ggggagagat gctgtgcggt ggcttctacc ctgctgtgtc ctgctgcctg	240
cggagtgaca gcccggggct agggcgccctg gagaataaga tattttctgt taccaacaac	300
acagaatgtg ggaagttact ggaggaaatc aaatgtgcac ttgctctcc acattctcaa	360
agcctgttcc actcacctga gagagaagtc ttggaaagag acctagtact tcctctgctc	420
tgcaaagact attgcaaaga attcttttac acttgccgag gccatattcc aggtttcctt	480
caaacaactg cggatgagtt ttgcttttac tatgcaagaa aagatggtgg gttgtgcttt	540
ccagattttc caagaaaaca agtcagagga ccagcatcta actacttga ccagatggaa	600
gaatatgaca aagtggaaga gatcagcaga aagcacaac acaactgctt ctgtattoag	660

ES 2 564 055 T3

gaggttgtga gtgggctgcg gcagcccgtt ggtgccctgc atagtgggga tggctcgcaa 720  
 ogtctcttca ttctggaaaa agaaggttat gtgaagatac ttaccctga aggagaaatt 780  
 ttcaaggagc cttatttga cattcacaaa cttgttcaaa gtggaataaa gggaggagat 840  
 gaaagaggac tgctaagcct cgcattccat cccaattaca agaaaaatgg aaagttgtat 900  
 gtgtcctata ccaccaacca agaacgggtg gctatcgggc ctcatgacca cattcttagg 960  
 gttgtggaat acacagtatc cagaaaaaat ccacaccaag ttgatttgag aacagccaga 1020  
 gtctttcttg aagttgcaga actccacaga aagcatctgg gaggacaact gctctttggc 1080  
 cctgaaggct ttttgtacat cattcttggg gatgggatga ttacactgga tgatatggaa 1140  
 gaaatggatg ggtaagtga tttcacaggc tcagtgetac ggctggatgt ggacacagac 1200  
 atgtgcaacg tgccttattc cataccaagg agcaaccac acttcaacag caccaaccag 1260  
 cccccogaag tgtttgctca tgggctccac gatccaggca gatgtgctgt ggatagacat 1320  
 cccactgata taaacatcaa tttaacgata ctgtgttcag actccaatgg aaaaaacaga 1380  
 tcatcagcca gaattctaca gataataaag gggaaagatt atgaaagtga gccatcactt 1440  
 ttagaattca agccattcag taatggctct ttggttggtg gatttgata ccggggctgc 1500  
 cagtcagaaa gattgtatgg aagctacgtg tttggagatc gtaatgggaa tttcctaact 1560  
 ctccagcaaa gtctctgtgac aaagcagtgg caagaaaaac cactctgtct cggcactagt 1620  
 gggctcctgta gaggtactt ttccggtcac atcttgggat ttggagaaga tgaactaggt 1680  
 gaagtttaca ttttatcaag cagtaaaagt atgaccaga ctcacaatgg aaaactctac 1740  
 aaaattgtag atcccaaaag acctttaatg cctgaggaat gcagagccac ggtacaacct 1800  
 gcacagacac tgacttcaga gtgctccagg ctctgtcgaa acggctactg cccccacg 1860  
 ggaaagtgct gctgcagtcc aggctgggag ggggacttct gcagaactgc aaaatgtgag 1920  
 ccagcatgct gtcattggag tgtctgtgtt agaccgaaca agtgectctg taaaaagga 1980  
 tatcttggct ctcaatgtga acaagtggac agaaacatcc gcagagtgc cagggcaggt 2040  
 attcttgatc agatcattga catgacatct tacttgctgg atctaacaag ttacattgta 2100  
 tag 2103

<210> 53  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 53

5

10

Gly Cys Gln Leu Thr Lys Gln Arg Leu Val Asp Ala Asp Gly Ile Ile  
 1 5 10 15  
 Asn Pro Cys Gly  
 20





5  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(5)  
 <223> Cualquier aminoácido

10  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Cualquier aminoácido

15  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Asp, Glu o Asn

20  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Cualquier aminoácido

25  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Asp, Ser o Glu

30  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (12)..(12)  
 <223> Leu o Ile

<400> 58

Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Met Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa  
 1 5 10

35  
 <210> 59  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40  
 <220>  
 <223> Construcción sintética

45  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(5)  
 <223> Cualquier aminoácido

50  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Cualquier aminoácido

55  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(8)  
 <223> Asp, Glu o Asn

60  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Cualquier aminoácido

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE

ES 2 564 055 T3

<222> (10)..(10)  
 <223> Asp, Ser o Glu  
  
 <220>  
 5 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (12)..(12)  
 <223> Leu o Ile  
  
 <400> 59  
 10  
  
 Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa  
 1 5 10  
  
 <210> 60  
 <211> 12  
 15 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 20  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(5)  
 <223> Cualquier aminoácido  
 25  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Cualquier aminoácido  
 30  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Cualquier aminoácido  
 35  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Asp, Ser o Glu  
 40  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (12)..(12)  
 <223> Leu o Ile  
 45  
  
 <400> 60  
  
 Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Met Xaa Glu Xaa Xaa Gly Xaa  
 1 5 10  
  
 50 <210> 61  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 55 <220>  
 <223> Construcción sintética  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(5)  
 <223> Cualquier aminoácido  
 60

ES 2 564 055 T3

5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Cualquier aminoácido

10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Cualquier aminoácido

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Asp, Ser o Glu

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (12)..(12)  
 <223> Leu o Ile

<400> 61

Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Asp Xaa Xaa Gly Xaa  
 1 5 10

25 <210> 62  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Construcción sintética

35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(5)  
 <223> Cualquier aminoácido

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Cualquier aminoácido

45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Cualquier aminoácido

50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (12)..(12)  
 <223> Leu o Ile

<400> 62

Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Met Xaa Glu Xaa Asp Gly Xaa  
 1 5 10

55 <210> 63  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 564 055 T3

<223> Construcción sintética  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 5 <222> (2)..(5)  
 <223> Cualquier aminoácido  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 10 <222> (7)..(7)  
 <223> Cualquier aminoácido  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 15 <222> (9)..(9)  
 <223> Cualquier aminoácido  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 20 <222> (12)..(12)  
 <223> Leu o Ile  
 <400> 63  
 Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Asp Xaa Asp Gly Xaa  
 25 1 5 10  
 <210> 64  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 30 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(5)  
 <223> Cualquier aminoácido  
 40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Cualquier aminoácido  
 45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Cualquier aminoácido  
 50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (12)..(12)  
 <223> Leu o Ile  
 55 <400> 64  
 Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Asp Xaa Ser Gly Xaa  
 1 5 10  
 <210> 65  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 60 <213> Secuencia artificial

ES 2 564 055 T3

<220>  
 <223> Construcción sintética

5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(5)  
 <223> Cualquier aminoácido

10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Cualquier aminoácido

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Cualquier aminoácido

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (12)..(12)  
 <223> Leu o Ile

25 <400> 65  
 Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Asp Xaa Glu Gly Xaa  
 1 5 10

30 <210> 66  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Construcción sintética

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(5)  
 <223> Cualquier aminoácido

45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Cualquier aminoácido

50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Cualquier aminoácido

<400> 66  
 Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Met Xaa Glu Xaa Asp Gly Leu  
 1 5 10

55 <210> 67  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> Construcción sintética

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(5)  
 <223> Cualquier aminoácido  
 5  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Cualquier aminoácido  
 10  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Cualquier aminoácido  
 15  
 <400> 67  
  
 Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Asp Xaa Asp Gly Leu  
 1 5 10  
 20  
 <210> 68  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(5)  
 <223> Cualquier aminoácido  
 30  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Cualquier aminoácido  
 35  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Cualquier aminoácido  
 40  
 <400> 68  
  
 Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Asp Xaa Ser Gly Leu  
 1 5 10  
 45  
 <210> 69  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(5)  
 <223> Cualquier aminoácido  
 55  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Cualquier aminoácido  
 60



ES 2 564 055 T3

Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Asp Xaa Ser Gly Ile  
 1 5 10

5 <210> 72  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Construcción sintética

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(5)  
 <223> Cualquier aminoácido

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Cualquier aminoácido

25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 <223> Cualquier aminoácido

<400> 72

Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Asp Xaa Glu Gly Ile  
 1 5 10

30 <210> 73  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Construcción sintética

<400> 73

Ile Thr Leu Asp Asp Met Glu Glu Met Asp Gly Leu  
 1 5 10

40 <210> 74  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Construcción sintética

50 <400> 74

Leu Thr Lys Gln Arg Leu Val Asp Ala Asp Gly Leu  
 1 5 10

55 <210> 75  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 564 055 T3

<223> Construcción sintética

<400> 75

5                   Leu Thr Thr Arg Lys Leu Val Asp Arg Glu Gly Leu  
                  1                                   5                                   10

<210> 76

<211> 12

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

15 <400> 76

                  Leu Leu Thr Asn Arg Leu Val Asn Ser Asp Gly Ile  
                  1                                   5                                   10

<210> 77

20 <211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Construcción sintética

<400> 77

                  Leu Thr Thr Arg Lys Leu Val Asp Lys Glu Gly Leu  
                  1                                   5                                   10

30 <210> 78

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Construcción sintética

<220>

40 <221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(5)

<223> Cualquier aminoácido

<220>

45 <221> MISC\_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Cualquier aminoácido

<220>

50 <221> MISC\_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Cualquier aminoácido

<400> 78

55

                  Leu Val Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Ile Xaa  
                  1                                   5

<210> 79

<211> 9

ES 2 564 055 T3

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Construcción sintética  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(5)  
 10 <223> Cualquier aminoácido  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 15 <223> Cualquier aminoácido  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (9)..(9)  
 20 <223> Cualquier aminoácido  
  
 <400> 79  
  
 Leu Val Asp Xaa Xaa Gly Xaa Ile Xaa  
 1 5  
 25  
 <210> 80  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 35 <223> Cualquier aminoácido  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 40 <223> Cualquier aminoácido  
  
 <400> 80  
 45  
 Leu Val Asp Ala Xaa Gly Xaa Ile Asn  
 1 5  
  
 <210> 81  
 <211> 10  
 50 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Construcción sintética  
 55  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> Cualquier aminoácido  
 60  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)

ES 2 564 055 T3

<223> Cualquier aminoácido

<400> 81

5 Leu Val Asp Ala Xaa Gly Xaa Ile Asn Pro  
1 5 10

<210> 82

<211> 10

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Construcción sintética

15 <400> 82

Leu Val Asp Ala Asp Gly Ile Ile Asn Pro  
1 5 10

<210> 83

20 <211> 508

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 83

25

Ser Asn Tyr Leu Asp Gln Met Glu Glu Tyr Asp Lys Val Glu Glu Ile



ES 2 564 055 T3

Thr Ile Leu Cys Ser Asp Ser Asn Gly Lys Asn Arg Ser Ser Ala Arg  
 260 265 270

Ile Leu Gln Ile Ile Lys Gly Lys Asp Tyr Glu Ser Glu Pro Ser Leu  
 275 280 285

Leu Glu Phe Lys Pro Phe Ser Asn Gly Pro Leu Val Gly Gly Phe Val  
 290 295 300

Tyr Arg Gly Cys Gln Ser Glu Arg Leu Tyr Gly Ser Tyr Val Phe Gly  
 305 310 315 320

Asp Arg Asn Gly Asn Phe Leu Thr Leu Gln Gln Ser Pro Val Thr Lys  
 325 330 335

Gln Trp Gln Glu Lys Pro Leu Cys Leu Gly Thr Ser Gly Ser Cys Arg  
 340 345 350

Gly Tyr Phe Ser Gly His Ile Leu Gly Phe Gly Glu Asp Glu Leu Gly  
 355 360 365

Glu Val Tyr Ile Leu Ser Ser Ser Lys Ser Met Thr Gln Thr His Asn  
 370 375 380

Gly Lys Leu Tyr Lys Ile Val Asp Pro Lys Arg Pro Leu Met Pro Glu  
 385 390 395 400

Glu Cys Arg Ala Thr Val Gln Pro Ala Gln Thr Leu Thr Ser Glu Cys  
 405 410 415

Ser Arg Leu Cys Arg Asn Gly Tyr Cys Thr Pro Thr Gly Lys Cys Cys  
 420 425 430

Cys Ser Pro Gly Trp Glu Gly Asp Phe Cys Arg Thr Ala Lys Cys Glu  
 435 440 445

Pro Ala Cys Arg His Gly Gly Val Cys Val Arg Pro Asn Lys Cys Leu  
 450 455 460

Cys Lys Lys Gly Tyr Leu Gly Pro Gln Cys Glu Gln Val Asp Arg Asn  
 465 470 475 480

Ile Arg Arg Val Thr Arg Ala Gly Ile Leu Asp Gln Ile Ile Asp Met  
 485 490 495

ES 2 564 055 T3

Thr Ser Tyr Leu Leu Asp Leu Thr Ser Tyr Ile Val  
500 505

## REIVINDICACIONES

1. Un oligopéptido aislado que consiste en una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEC ID N°: 7, 17-24, 38, 46 y 53-82; en donde dicho oligopéptido se une a un polipéptido Hedgehog e inhibe la unión de dicho polipéptido Hedgehog a una proteína patched y en donde cada posición X en la secuencia de aminoácidos de las SEC ID N°: 56-72 es o bien idéntica a, o es una sustitución conservadora del aminoácido en la posición correspondiente de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 7 y en donde cada posición X en la secuencia de aminoácidos de las SEC ID N°: 78-82 es o bien idéntica a, o es una sustitución conservadora del aminoácido en la correspondiente posición de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 17; en donde la sustitución conservadora es:
- valina por alanina;
  - lisina por arginina;
  - glutamina por asparagina;
  - ácido glutámico por ácido aspártico;
  - serina por cisteína;
  - asparagina por glutamina;
  - ácido aspártico por ácido glutámico;
  - alanina por glicina;
  - arginina por histidina;
  - leucina por isoleucina;
  - isoleucina por leucina;
  - arginina por lisina;
  - leucina por metionina;
  - leucina por fenilalanina;
  - alanina por prolina;
  - treonina por serina;
  - serina por treonina;
  - tirosina por triptófano;
  - fenilalanina por tirosina o leucina por valina.
2. Un oligopéptido que imita al bucle L2 de Hhip1 que comprende un péptido que se une a un polipéptido Hedgehog e inhibe la unión de dicho polipéptido Hedgehog a la proteína patched; en donde el oligopéptido es de entre 12-21 aminoácidos de longitud y comprende la secuencia de una cualquiera de las SEC ID N°: 17-24, 38, 46, 53, 54 y 73-77.
3. El oligopéptido de la reivindicación 2, en donde el oligopéptido tiene una longitud de 12 aminoácidos.
4. El oligopéptido de la reivindicación 2, en donde el oligopéptido tiene una longitud de 18 aminoácidos.
5. El oligopéptido de la reivindicación 2, en donde el oligopéptido tiene una longitud de 20 aminoácidos.
6. El oligopéptido de la reivindicación 2, en donde el oligopéptido tiene una longitud de 21 aminoácidos.
7. El oligopéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el oligopéptido es cíclico.
8. El oligopéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde el oligopéptido es lineal.
9. Una composición química que comprende el oligopéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
10. Un artículo manufacturado que comprende:
- (a) un envase y
  - (b) la composición química de la reivindicación 9 contenida dentro de dicho envase.
11. Un método *in vitro* para inhibir el crecimiento de una célula que expresa Hhip1 o Ptch, que comprende poner en contacto dicha célula con un agente que se une a dicha Hhip1 o Ptch, causando la unión de dicho agente a dicha Hhip1 o Ptch una inhibición del crecimiento de dicha célula, en donde dicho agente es un oligopéptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
12. Un agente para su uso en un método de tratamiento de un mamífero que tiene un tumor canceroso que comprende células que expresan una proteína Hhip1 o Ptch, comprendiendo dicho método administrar a un sujeto que necesita tal tratamiento una cantidad eficaz de dicho agente, en donde dicho agente es el oligopéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8.

- 5 13. Un agente para su uso en un método para tratar o prevenir la proliferación celular en las células que expresan la proteína Hhip1 o Ptch, comprendiendo dicho método administrar a un sujeto que necesita tal tratamiento una cantidad eficaz de dicho agente, en donde dicho agente es el oligopéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
14. Un anticuerpo anti-bucle L2 de Hhip1, en donde el bucle L2 de Hhip1 comprende la secuencia de la SEC ID N°: 7.
- 10 15. Un anticuerpo anti-bucle L2 de Hhip1 idiopático, en donde el bucle L2 de Hhip1 comprende la secuencia de la SEC ID N°: 7.
- 15 16. Un agente para su uso en un método de inhibición de Hedgehog, comprendiendo dicho método administrar a una célula productora de Hedgehog o a un tejido sensible a Hedgehog en un sujeto que necesita tal tratamiento, una cantidad eficaz de dicho agente, en donde dicho agente es el oligopéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
17. El agente de la reivindicación 16 para su uso en un método de inhibición de Hedgehog, en donde el oligopéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 46.

Figura 1A

```

1 gagaagctgc agccgcgggc agaggagacc tcagcaccat ctagagccca gcgctggccc
61 tgcctccggc tgcctccggc ccgcctgggc cgtttctggt cctgctactg tcccacctaa
121 acaactcccg ttacacggac aagtgaacat ctgtggctgt cctctccttt tcttctcct
181 ctccaactc cttctcctcc tcccacttcc cagccgcagc agaaagcccc caacccaact
241 gacaactggc caactgcaaa cgggtgcaac cgcacaactt tctctcctcc ctccggctcc
301 cctaaggcat tggaccatc ccgcctgctt ttattttttg caaagttgca toctgtaca
361 tatttttgc ccgcctcct cctctctct ctggagtgcc ctacagcccc gaaaactcct
421 cctggagctg cgcctagtg cctctctgg gcagtgggct tccccccat cctcccgcc
481 ccagccctg ctgcctggg cagacg

atg ctg aag atg ctg tcc ttt aag ctg ctg ctg ctg gcc gtg gct ctg ggc ttc ttt
M L K M L S F K L L L L A V A L G F F
5 10 15

gaa gga gat gct aag ttt ggg gaa aga aac gaa ggg agc gga gca agg agg aga agg
E G D A K F G E R N E G S G A R R R R
20 25 30 35

tgc ctg aat ggg aac ccc ccg aag cgc ctg aaa agg aga gac agg agg atg atg tcc
C L N G N P P K R L K R R D R R M M S
40 45 50 55

cag ctg gag ctg ctg agt ggg gga gag atg ctg tgc ggt gcc ttc tac cct cgg ctg
Q L E L L S G G E M L C G G F Y P R L
60 65 70 75

tcc tgc tgc ctg cgg agt gac age ccg ggg cta ggg cgc ctg gag aat aag ata ttt
S C C L R S D S P G L G R L E N K I F
80 85 90 95

tct gtt acc aac aac aca gaa tgt ggg aag tta ctg gag gaa atc aaa tgt gca ctt
S V T N N T E C G K L L E E I K C A L
100 105 110

tgc tct cca cat tct caa agc ctg ttc cac tca cct gag aga gaa gtc ttg gaa aga
C S P H S Q S L F H S P E R E V L E R
115 120 125 130

gac cta gta ctt cct ctg ctg tgc aaa gac tat tgc aaa gaa ttc ttt tac act tgc
D L V L P L L C K D Y C K E F F Y T C
135 140 145 150

cga gcc cat att cca ggc ttc ctt caa aca act ggc gat gag ttc tgc ttt tac tat
R G H I P G F L Q T T A D E F C F Y Y
155 160 165 170

gca aga aaa gat ggt ggg ttg tgc ttt cca gat ttt cca aga aaa caa gtc aga gga
A R K D G G L C F P D F P R K Q V R G
175 180 185 190

cca gca tct aac tac ttg gac cag atg gaa gaa tat gac aaa ctg gaa gag atc agc
P A S N Y L D Q M E E Y D K V E E I S
195 200 205

```

Figura 1B

```

aga aag cac aaa cac aac tgc ttc tgt att cag gag gtt gtg agt ggg ctg cgg cag
R K H K H N C F C I Q E V V S G T R Q
210 215 220 225

ccc gtt ggt gcc ctg cat agt ggg gat ggc ccg caa cgt ctc ttc att ctg gaa aaa
P V G A L H S G D G S Q R L F I L E K
230 235 240 245

gaa ggt tat gtg aag ata ctt acc cct gaa gga gaa att ttc aag gag cct tat ttg
E G Y V K I L T P E G E I F K E P Y L
250 255 260 265

gac all cac aaa cll gtl caa agl gga ala aag gga gga gal gaa aga gga ctg cla
D I H K L V Q S G I K G G D E R G L L
270 275 280 285

agc ctc gca ttc cat ccc aat tac aag aaa aat gga aag ttg tac gtg tcc tat acc
S L A F H P N Y K K K G K L Y V S Y T
290 295 300

acc aac caa gaa cgg tgg get atc ggg cct cat gac cac att ctt agg gtt gtg gaa
T N Q E R W A I G P H D H I L R V V E
305 310 315 320

tac aca gta tcc aga aaa aat cca cac caa gtt gat ttg aga aca gcc aga gtc ttt
Y T V S R K N P H Q V D L R T A R V F
325 330 335 340

ctt gaa gtt gca gaa ctc cac aga aag cat ctg gga gga caa ctg ctc ttt ggc cct
L E V A E L H R K H L G G Q L L F G P
345 350 355 360

gac ggc ttt ttg tac atc att ctt ggt gat ggg atg att aca ctg gat gat atg gaa
D G F L Y I I L G D G M I T I D D K E
365 370 375 ↑ *

gaa atg gat ggg tta agt gat ttc aca ggc tca gtg cta cgg ctg gat gtg gac aca
E M D G L S D F T G S V L R L D V D T
↑ * * 385 * 390 395

gac atg tgc aac gtg cct tat tcc ata cca agg agc aac cca cac ttc aac agc acc
D M C N V P Y S I P R S N P H F N S T
400 405 410 415

aac cag ccc ccc gaa gtg ttt gct cat ggg ctc cac gat cca gcc aga tgt gct gtg
N Q P P E V F A H G L H D P G R C A V
420 425 430 435

gal aga cat ccc act gal ata aac atc aat tta acg ala ctg tgt tca gac tcc aat
D R H P T D I N I N L T I L C S D S N
440 445 450 455

gga aaa aac aga tca tca gcc aga att cta cag ata ata aag cgg aaa gat tat gaa
G K N R S S A R I L Q I I K G K D Y E
460 465 470 475

```

Figura 1C

```

agt gag cca tca ctt tta gaa ttc aag cca ttc agt aat ggt cct ttg gtt ggt gga
S F P S L L F F K P F S N G P L V E G
          480                    485                    490

ttt gta tac cgg ggc tgc cag tca gaa aga ttg tat gga agc tac gtg ttt gga gat
F V Y R G C Q S E R L Y G S Y V F G D
495                    500                    505                    510

cgt aat ggg aat ttc cta act ctc cag caa agt cct gtg aca aag cag tgg caa gaa
R N G N F L T L Q Q S P V T K Q W Q E
          515                    520                    525                    530

aaa cca ctc tgt ctc ggc act agl ggg tcc tgt aga ggc tac ttc tcc ggt cac atc
K P L C L G T S G S C R G Y F S G H I
          535                    540                    545                    550

ttg gga ttt gga gaa gat gaa cta ggt gaa gtt tac att tta tca agc agt aaa agt
L G F G E D E L G E V Y I L S S S K S
          555                    560                    565                    570

atg acc cag act cac aat gga aaa ctc tac aaa att gta gat ccc aaa aga cct tta
M T Q C H N G K L Y K I V D P K R P L
          575                    580                    585

atg cct gag gaa tgc aga gcc acg gta caa cct gca cag aca ctg act tca gag tgc
M P E E C R A T V Q P A Q T L T S E C
590                    595                    600                    605

tcc agg ctc tgt cga aac ggc tac tgc acc ccc acc gga aag tgc tgc tgc agt cca
S R L C R N G Y C T P T G K C C C S P
          610                    615                    620                    625

ggc tgg gag ggg gac ttc tgc aga act gca aaa tgt gag cca gca tgt cgt cat gga
G W E G D F C R T A K C E P A C R H G
          630                    635                    640                    645

ggt gtc tgt gtt aga ccg aac aag tgc ctc tgt aaa aaa gga tac ctt ggt cct caa
G V C V R P N K C L C K K G Y L G P Q
          650                    655                    660                    665

tgt gaa caa gtg gac aga aac atc cgc aga gtg acc agg gca ggt att ctt gat cag
C E Q V D R N I R R V T R A G I L D Q
          670                    675                    680

atc att gac atg aca tcc tac ttg ctg gat cta aca agt tac att gta tag
I I D M T S Y L L D L T S Y I V ---
685                    690                    695                    700

```

Figura 2

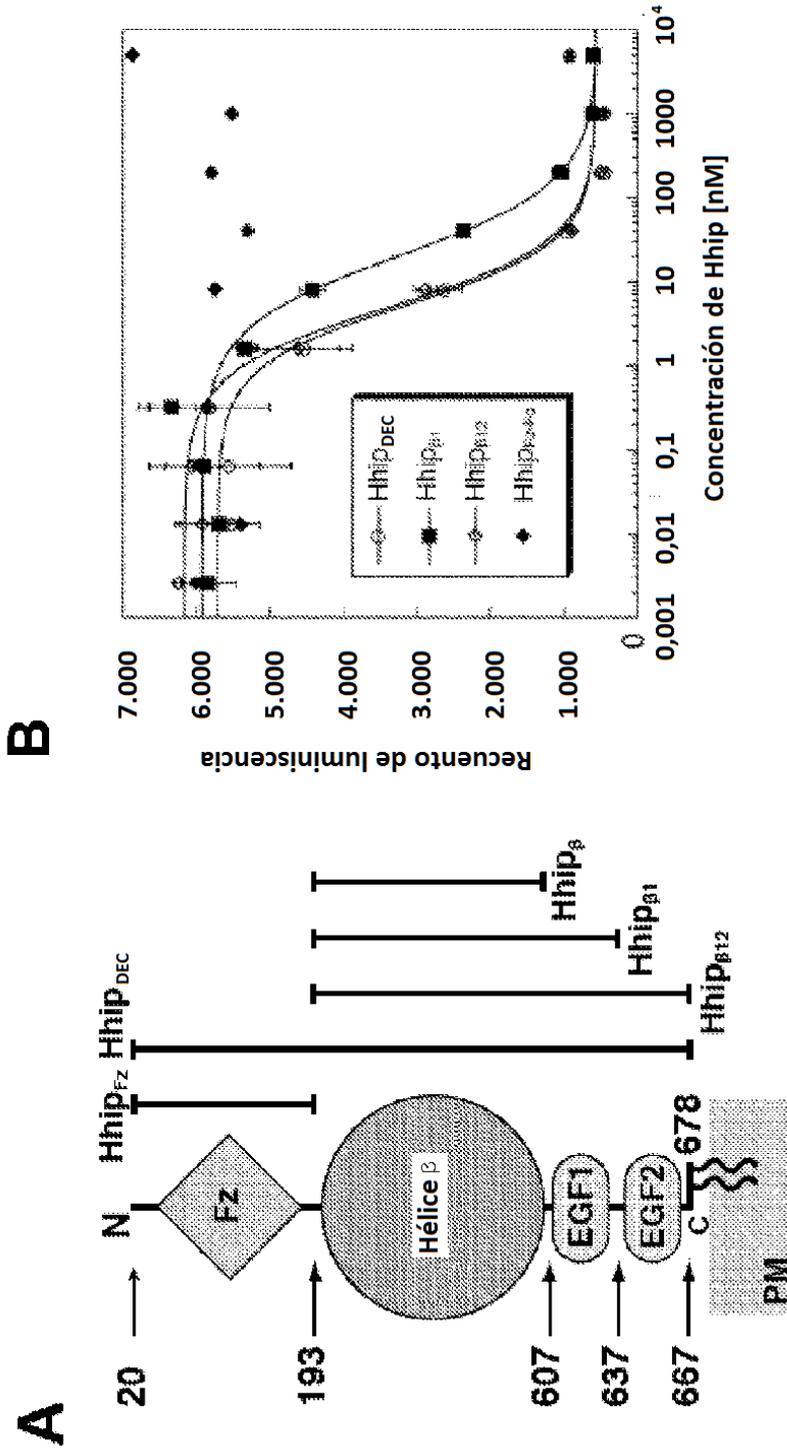
A

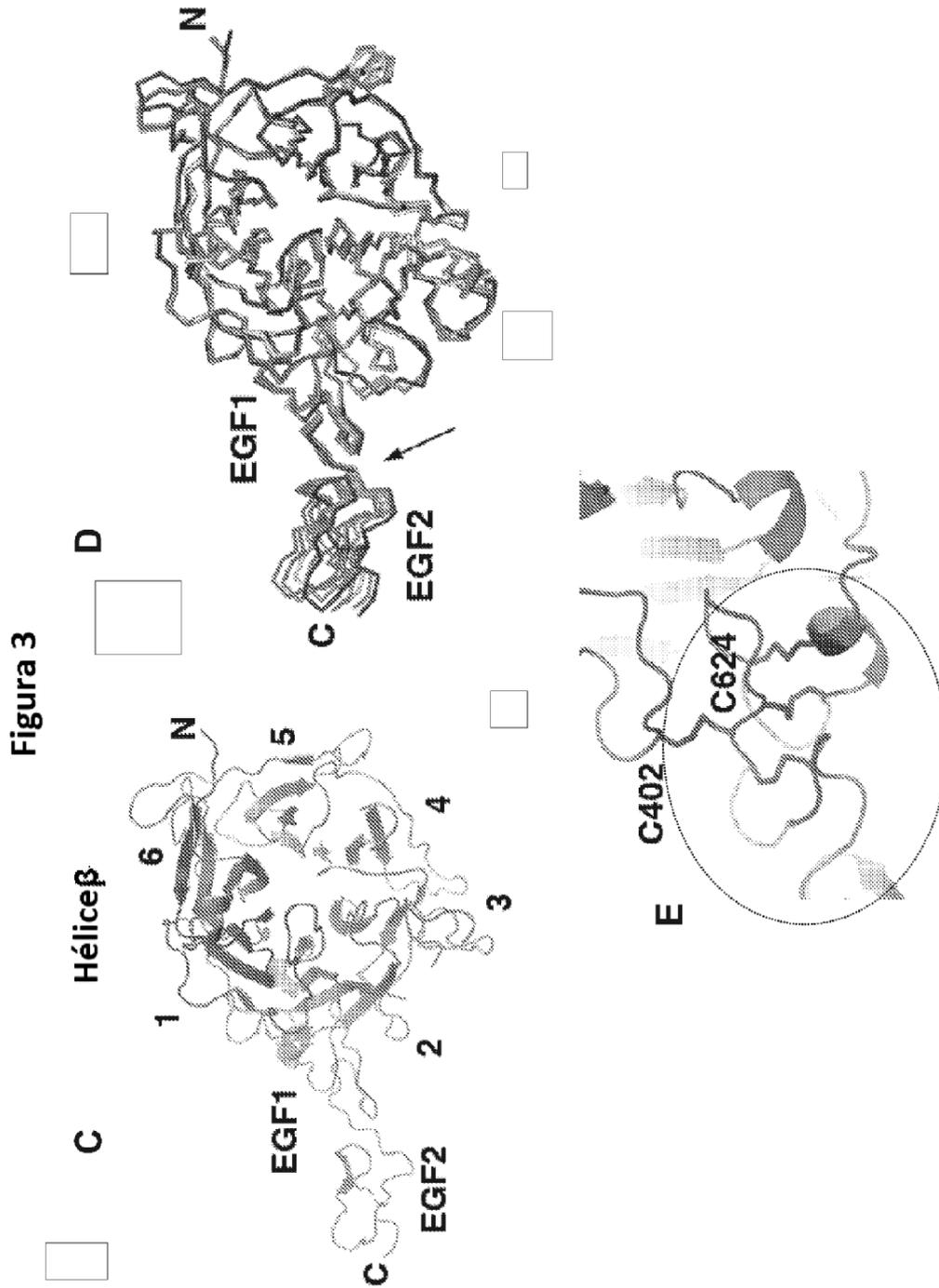
MLKMLSEFKLLLLLAVALGFF	19 (Líder)
EGDAKFGERNESGARRRRCLNGNPPKRLKR	50
RDRRMMSQLELLSGGEMLCGGFYPRISCCLRSDSPGLGRLENKIFSVTNN	100
TECGKLLLEELKCALCSPHSQSLFHSFPEREVLERDLVLPPLLCKDYCKEFFF	150 (Dominio Fz)
TCRGIHPGFLQTTADEFCFYARKDGGLCFFDFPRKQVRGPA	192
SNYLDQME	200
EYDKVEEISRKHHKNCFCIQEVVSGLRQPVGALHSGDGSQRLFILEKEGY	250
VKILTPEGEIFKEPYLDIHKLVQSGIKGGDERGLLSLAFHPNYKKNGKLY	300 (Hélice β)
VSYYTNTQFRWAIGPEDHILRVVEYTVSRKNPHQVDLRTARVFLVAVLHR	350
KHLGGQLLEGPDGFLYIILGDGMITLDDMEEMDGLSDFTG	400 (Bucle L2)
MCNVYPYSIPRSNPHFNSTNQPEVFAHGLHDPGRCAVDRHPTDININLTI	450
LCSDSNGKNRSSARILQIIKGDYSESPSLEFKPFSNGPLVGGFVYRGC	500
QSERLYGSYVFGDRNGNFLTQQSPVTKQWQFKPICLGTSGSCRGYFSGH	550
ILGFGEDLGEVYILSSSKSMTQTHNGKLYKIVDPKRPLMPBEGRATVQP	600
AQTLTSE	607
CSRLCRNGYCTPTGKCCSPGWEGDFORTA	637 (EGF1)
KCEPACRHGGVCV	650
RPNKCLCKKGYLGPQCE	667 (EGF2)
QVDRNIRRVTFRAGILDQIIDMTSYLLELTSYEV	700 (GPI & Dominios)
Citosólico	

B

<b>Hip1</b> (humana)	<b>MITLDDMEEMDGLSDFTG</b>
<b>Ptch</b> (humana)	<b>QLTKQRLVDADGIINPSA</b>
<b>Ptch</b> (ratón)	<b>QLTKQRLVDADGIINPSA</b>
<b>Ptch</b> (pollo)	<b>QLTKQRLVDADGIINPNA</b>
<b>Ptch</b> (pez cebra)	<b>QLTSRRLVDGDGLIPPEV</b>
<b>Ptch</b> (mosca)	<b>LVLTNRLVNSDGIINQRA</b>
<b>Ptch</b> (gusano)	<b>RVGKIRLVDASGIINSDG</b>
<b>Ptch2</b> (humana)	<b>QLTTRKLVDRGLIPPEL</b>
<b>Ptch2</b> (ratón)	<b>QLTTRKLVDKGLIPPEL</b>

Figura 3





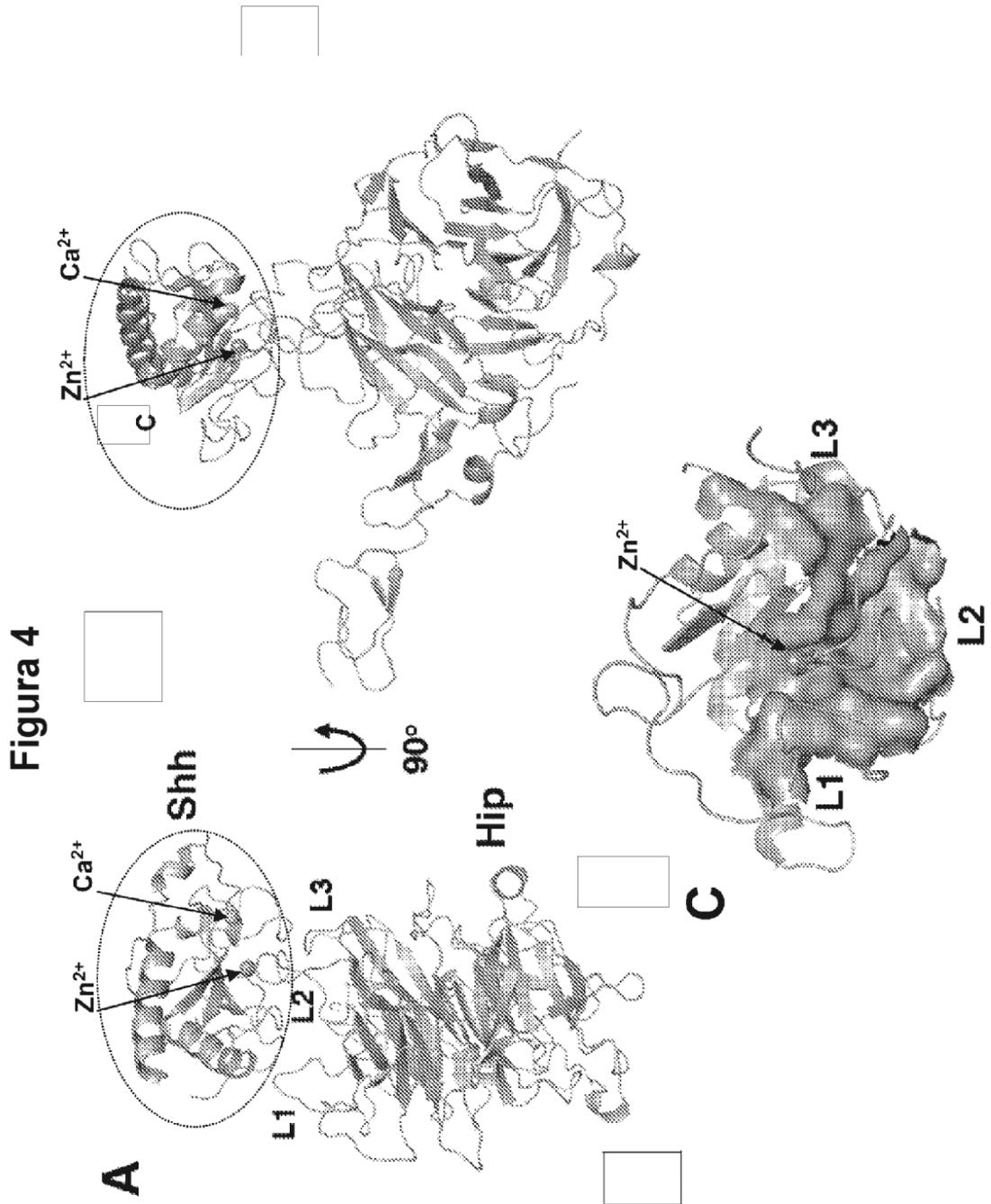


Figura 4

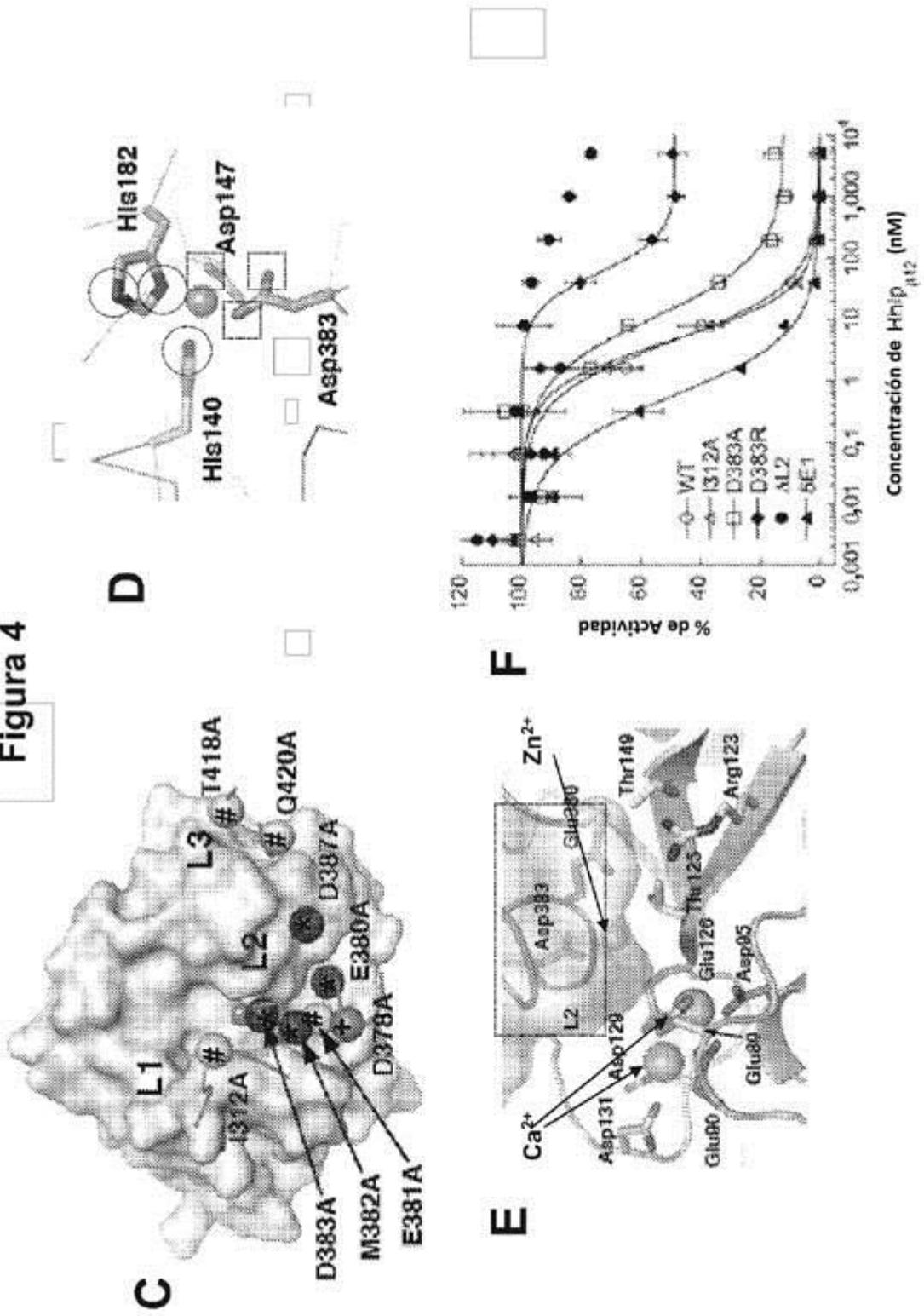


Figura 5

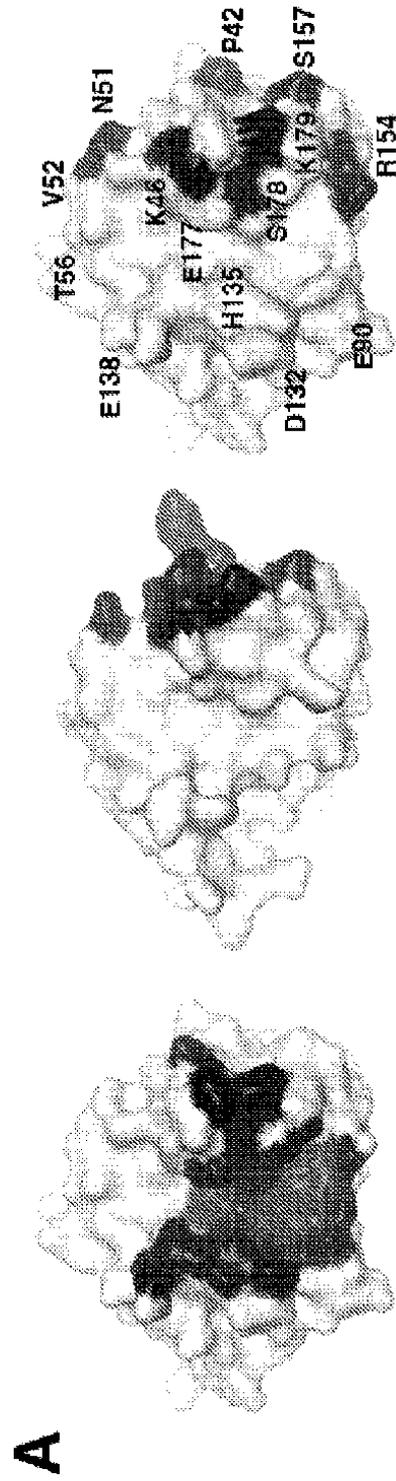


Figura 5

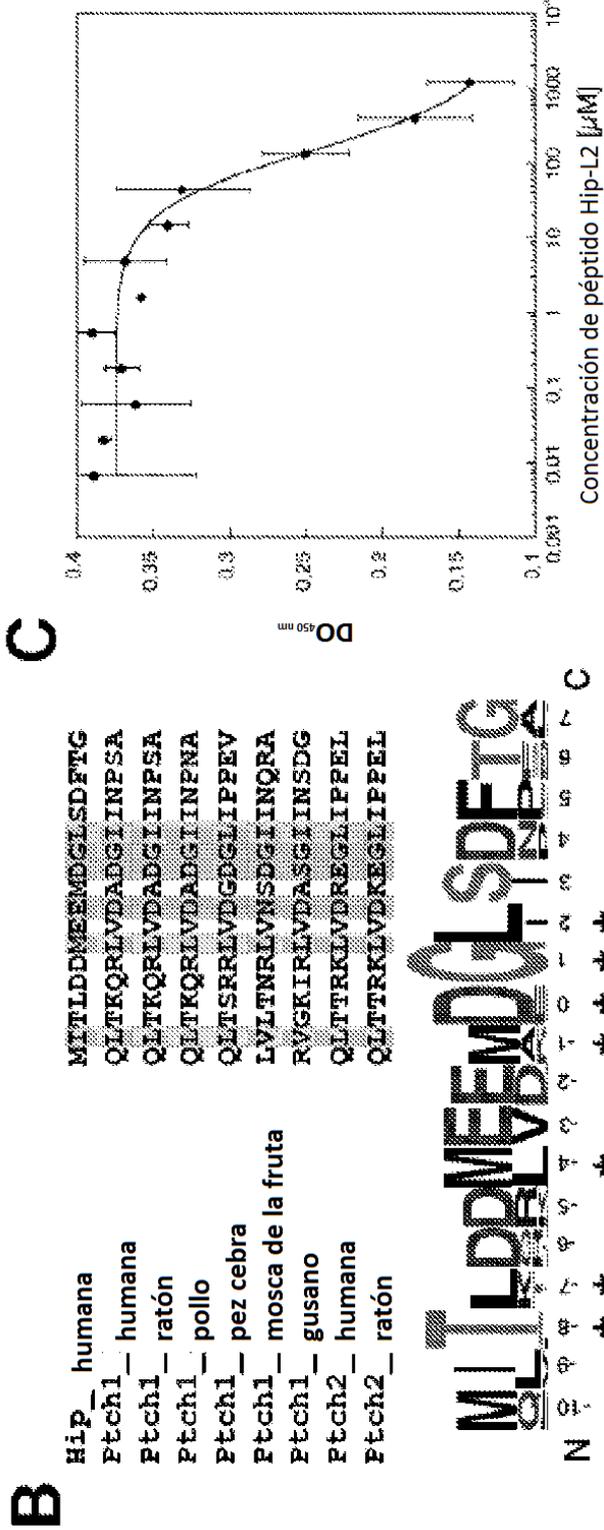


Figura 5

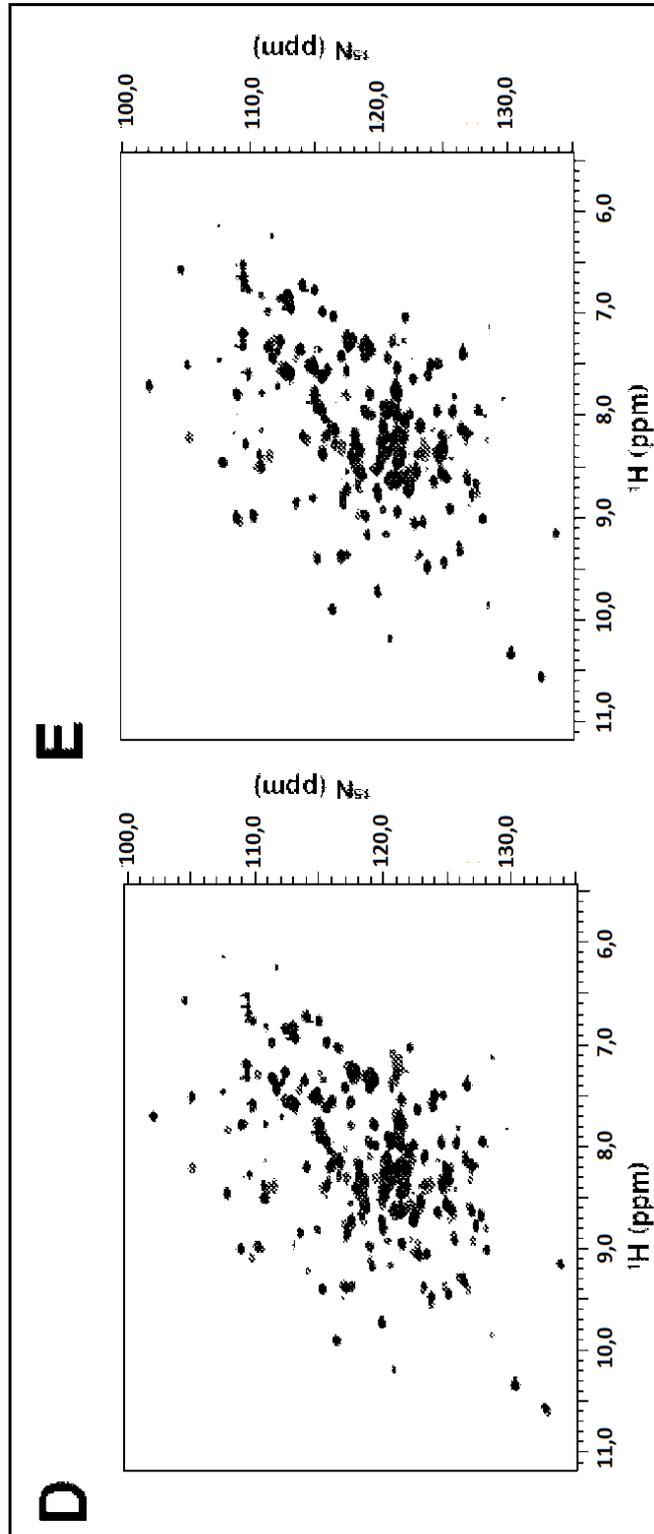
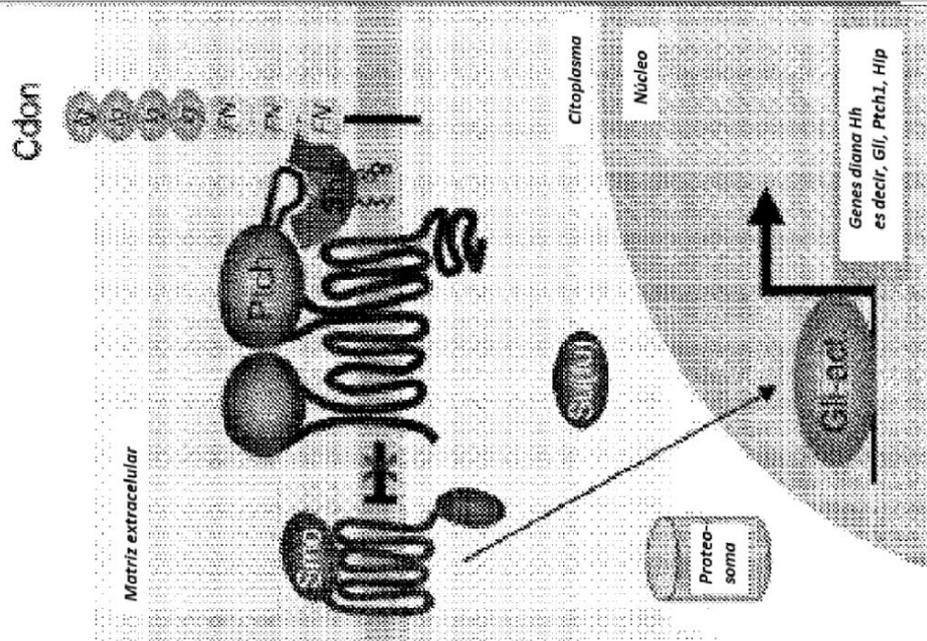


Figura 6

Señalización de Hh activa



**Figura 7**

Señalización de Hh inhibida

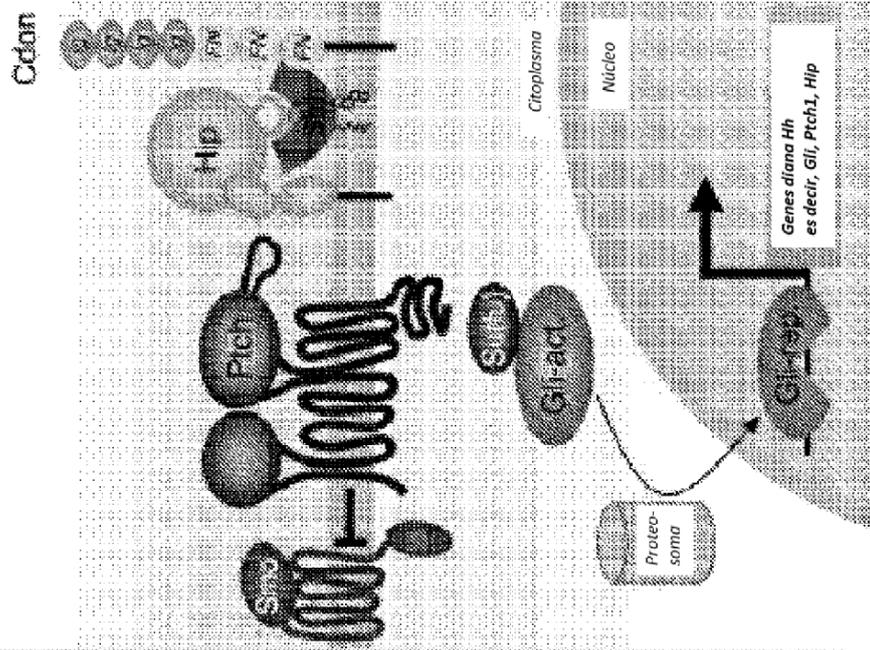




Figura 9

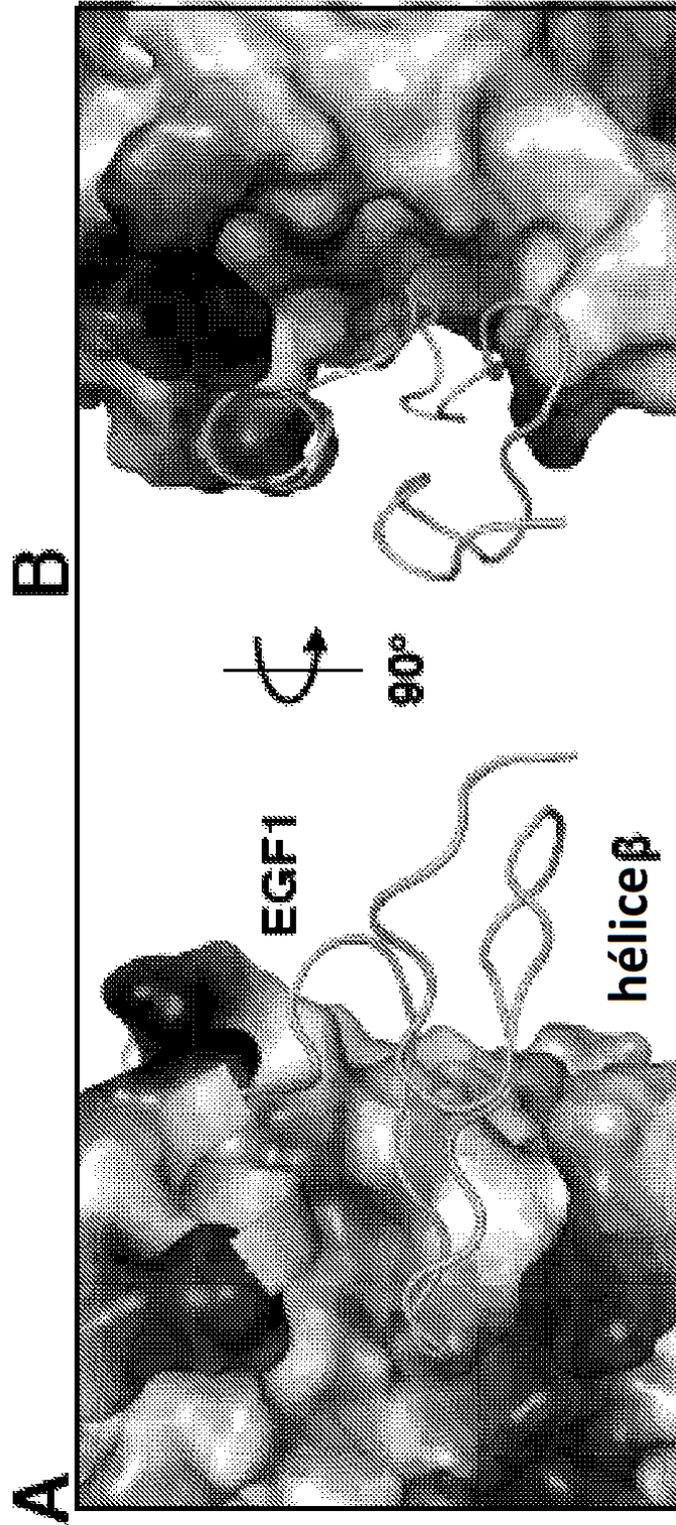
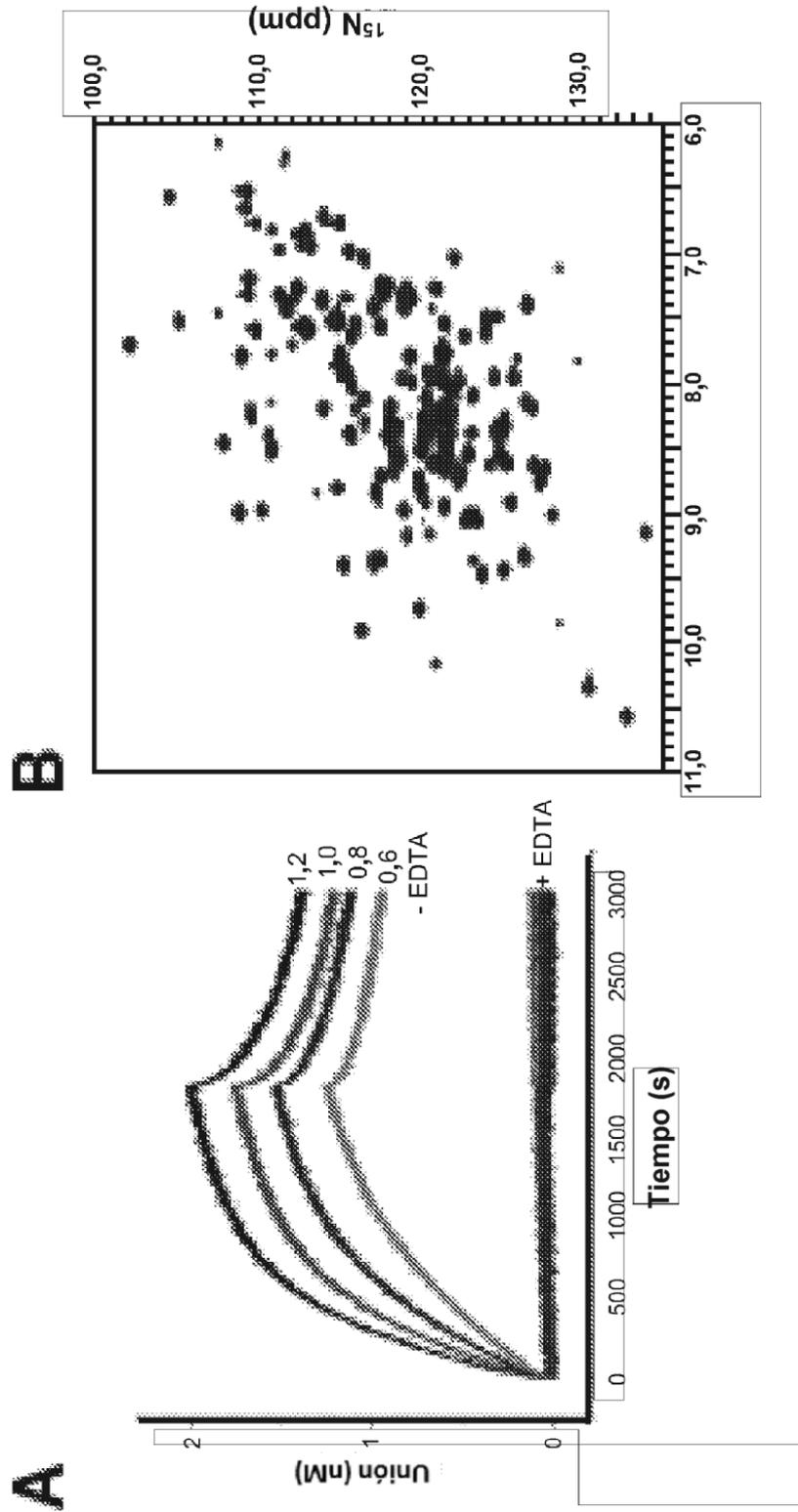


Figura 10



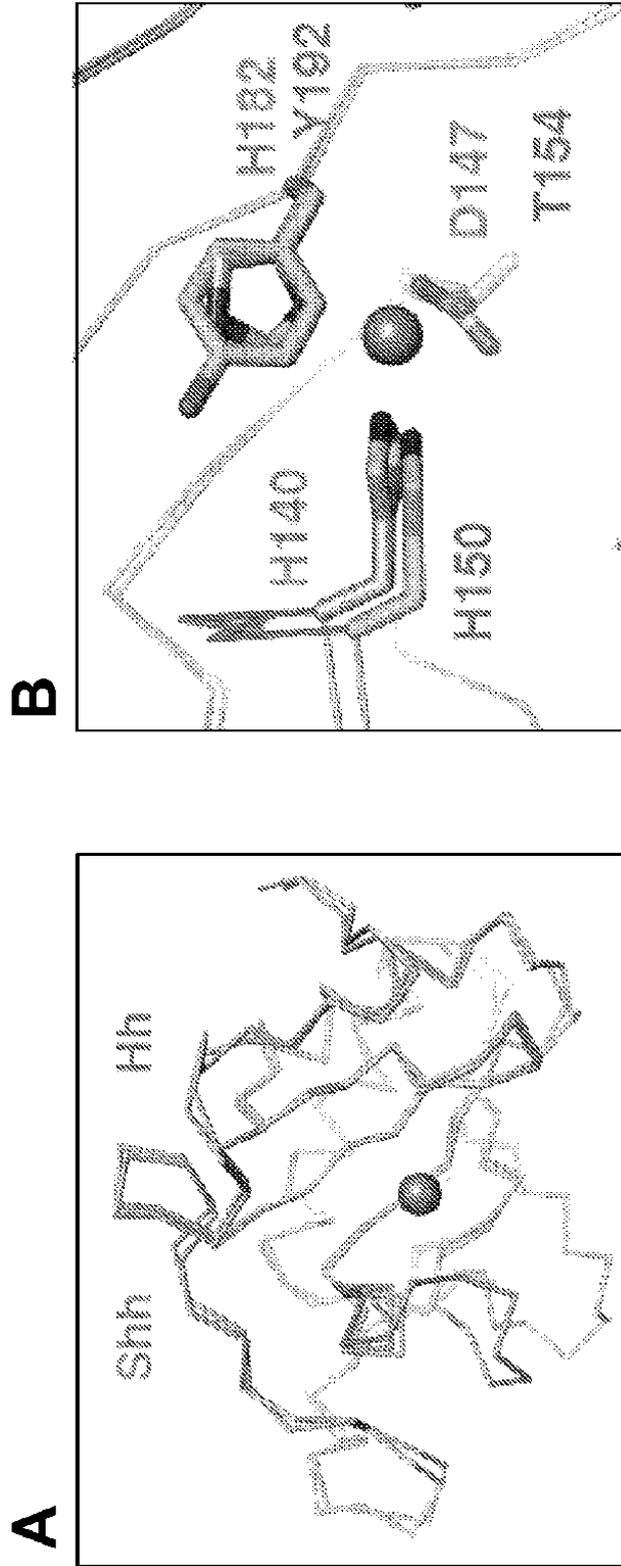


Figura 10

Figura 11

**A**

Hip_Homo	MI TDD DMM EEM D GLESDITG
Hip_Macac	MI TDD DMM EEM D GLESDITG
Hip_Pan	MI TDD DMM EEM D GLESDITG
Hip_Equus	MI TDD DMM EEM D GLESDITG
Hip_Monod	MI TDD DMM EEM D GLESDITG
Hip_Mus	MI TDD DMM EEM D GLESDITG
Hip_Bos	MI TDD DMM EEM D GLESDITG
Hip_Canis	MI TDD DMM EEM D GLESDITG
Hip_Rattus	MI TDD DMM EEM D GLESDITG
Hip_Drait	MI TDD DMM EEM D GLESDITG
Hip_Fugu	MI TDD DMM EEM D GLESDITG
Hip_Yetra	MI TDD DMM EEM D GLESDITG
Hip_Danio	MI TDD DMM EEM D GLESDITG
Hip_Gallu	MI TDD DMM EEM D GLESDITG
Hip_Xenop	MI TDD DMM EEM D GLESDITG

**B**

MI TDD DMM EEM D GLESDITG	MI TDD DMM EEM D GLESDITG
---------------------------	---------------------------

MI TDD DMM EEM D GLESDITG

Figura 12

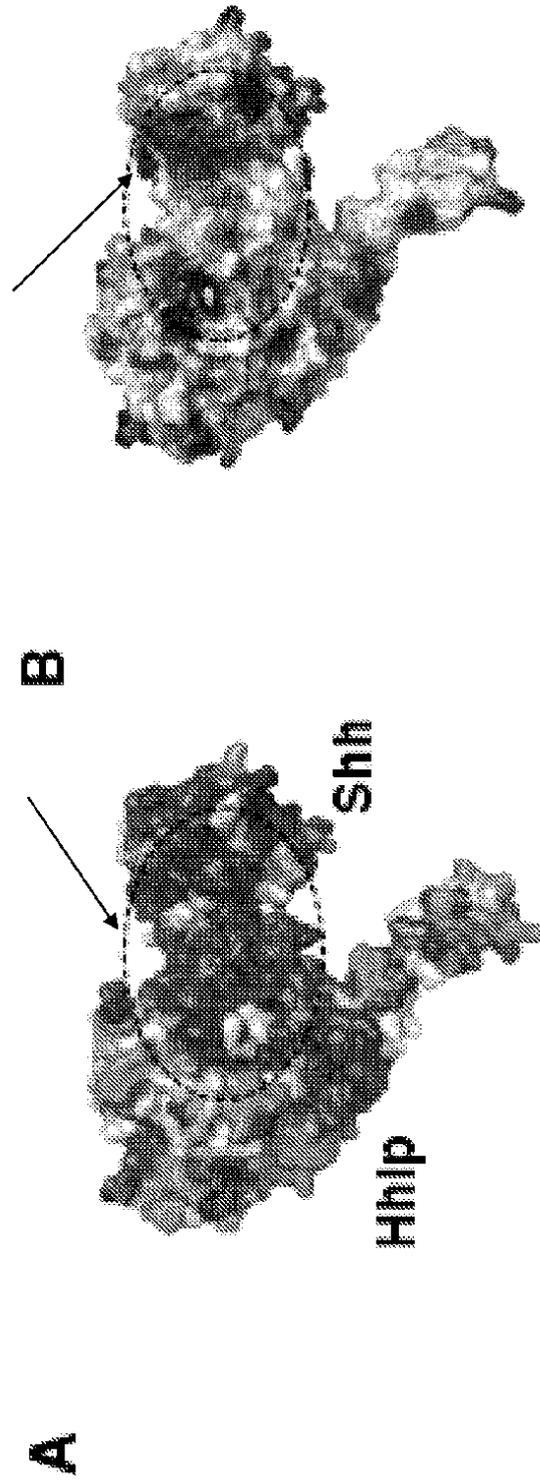


Figura 13

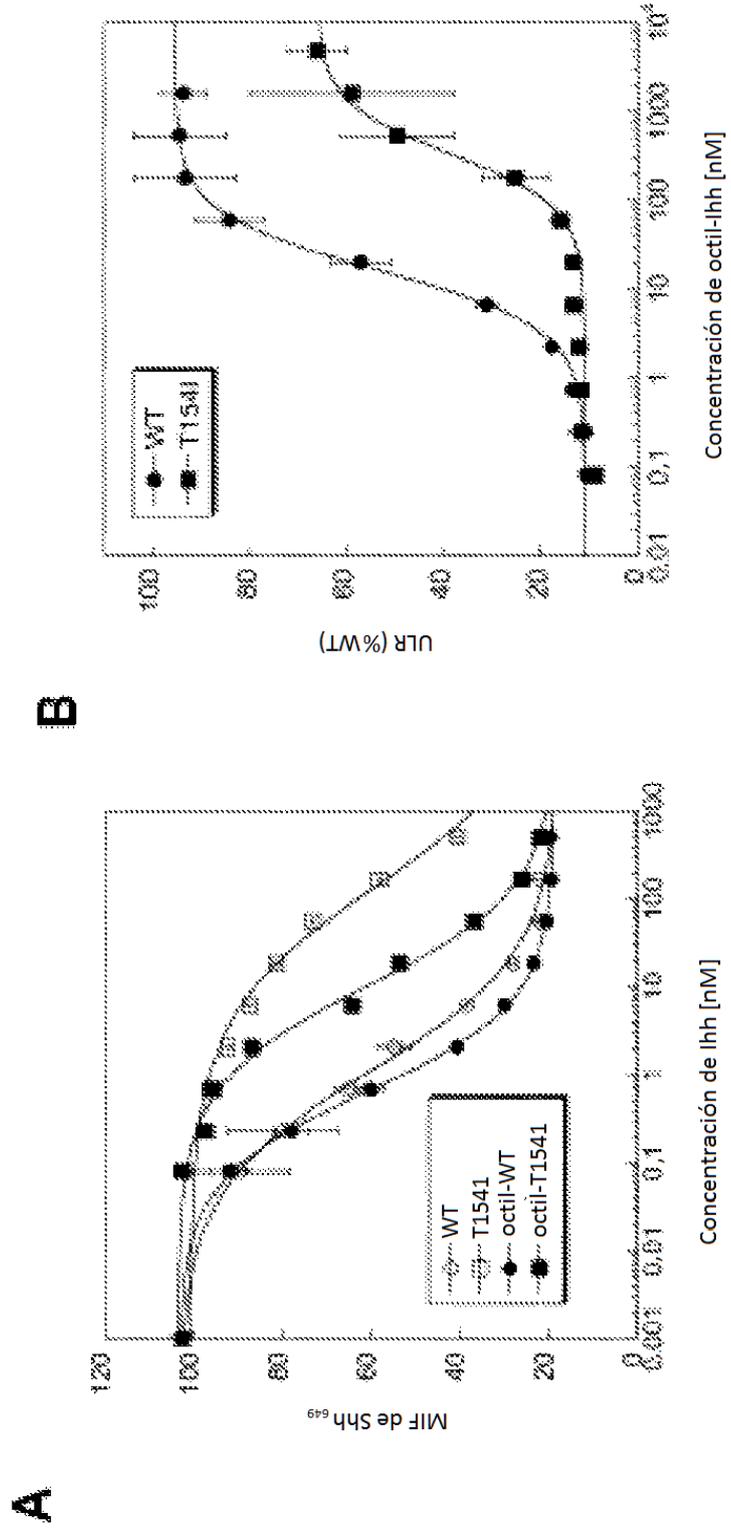


Figura 14

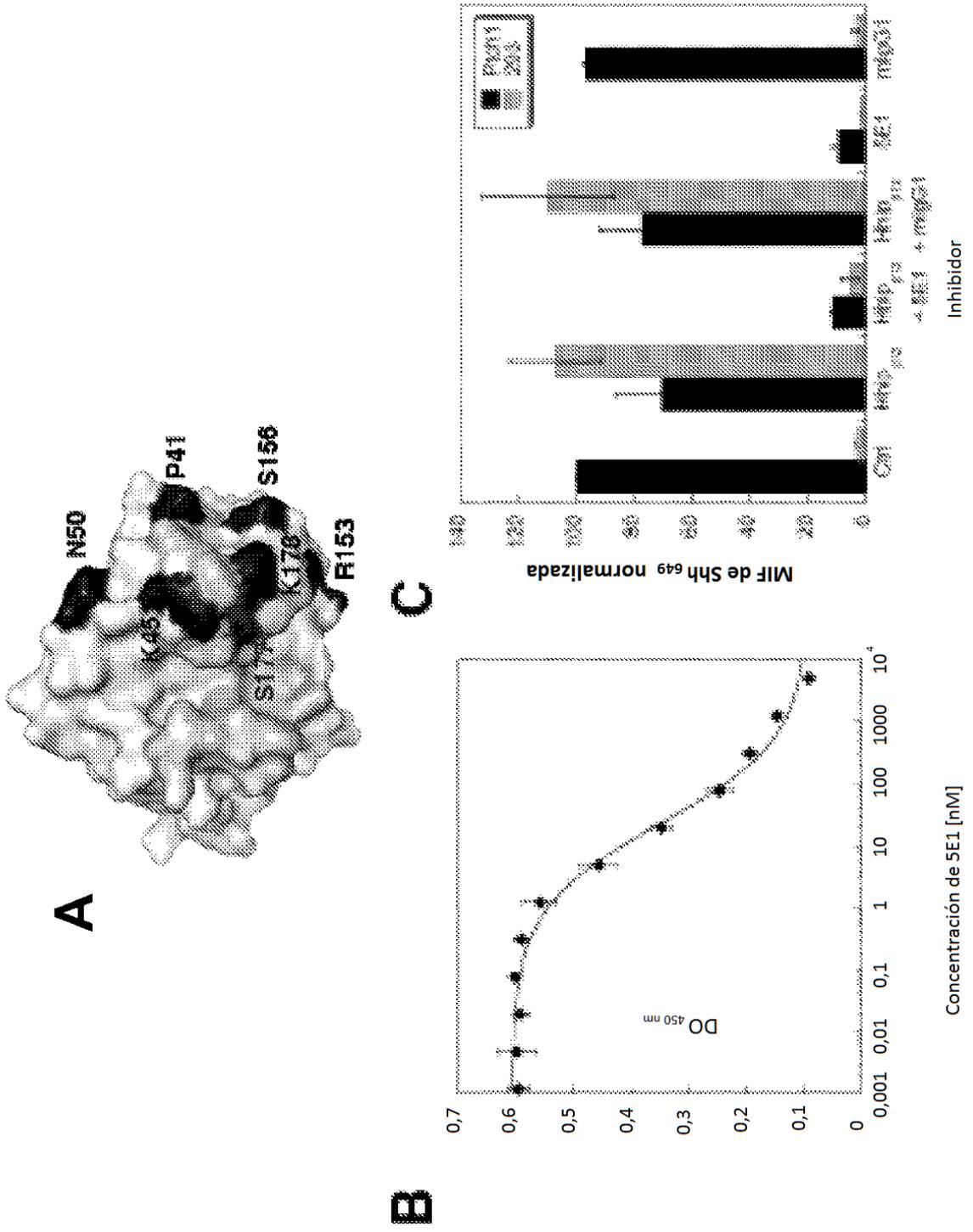


Figura 15

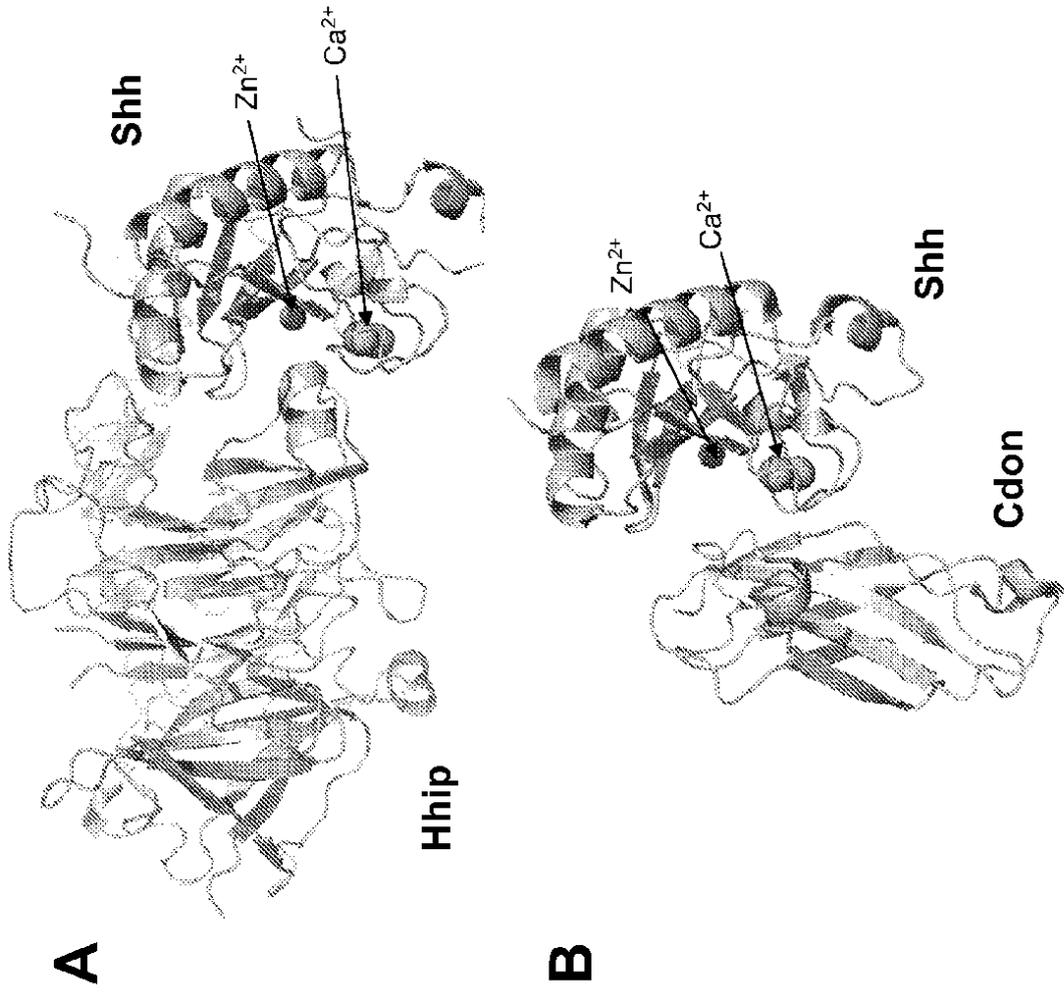


Figura 15

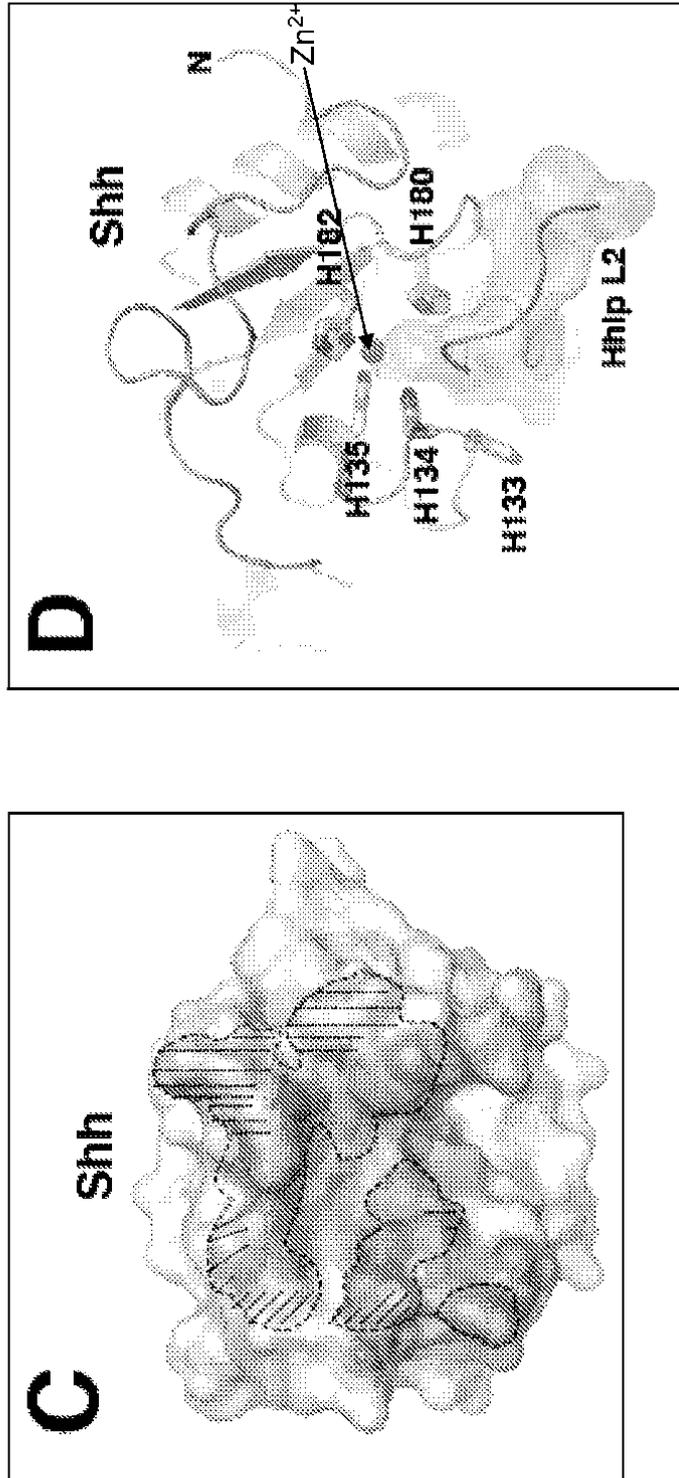


Figura 15

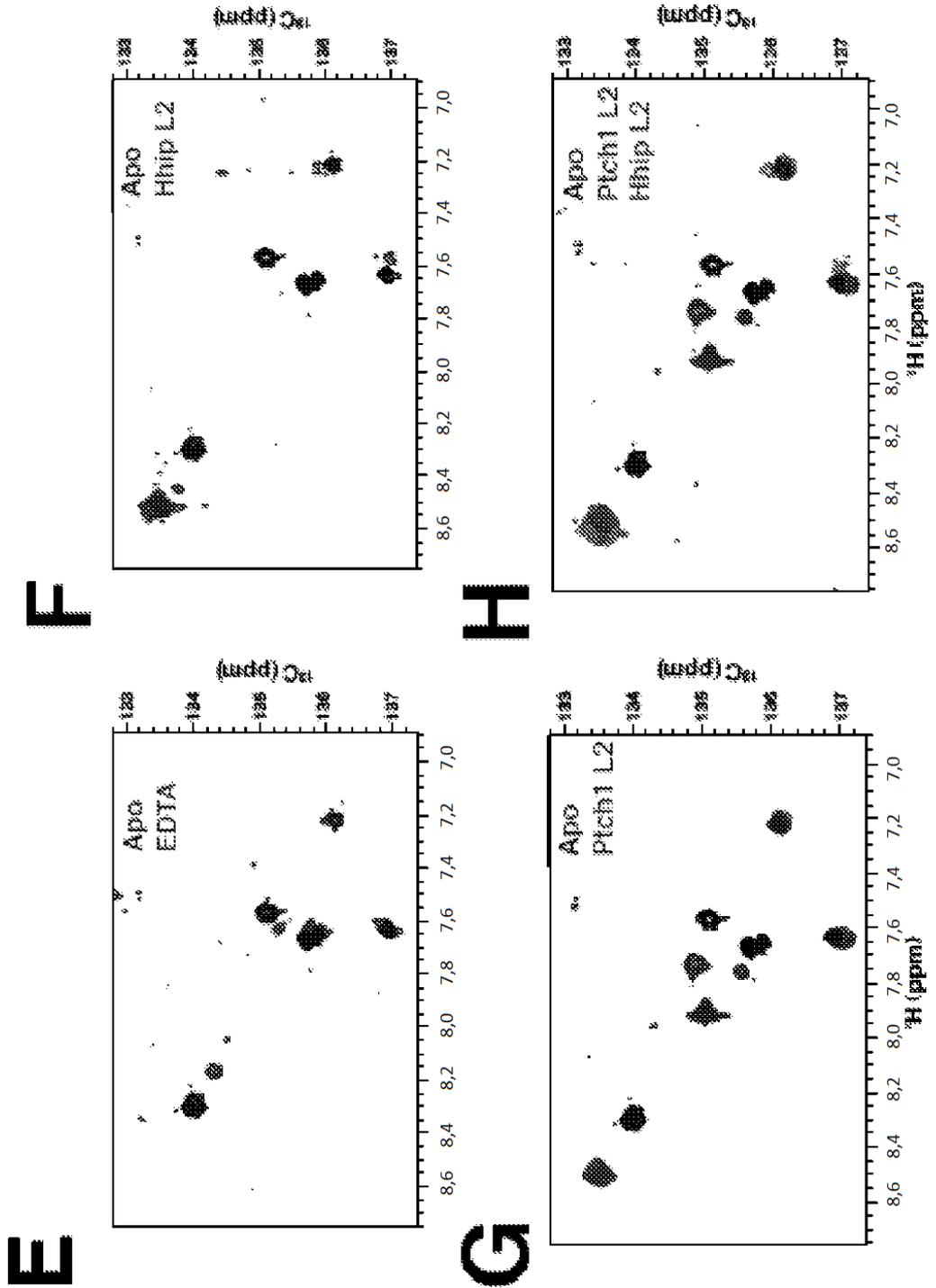


Figura 15

