

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 207**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C12Q 1/37 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.10.2010 E 10769133 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.01.2016 EP 2490718**

54 Título: **Métodos y composiciones para modular la activación con hepsina de la proteína estimuladora de macrófagos**

30 Prioridad:

22.10.2009 US 253990 P

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

18.03.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**GANESAN, RAJKUMAR y
KIRCHHOFER, DANIEL**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 564 207 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

Métodos y composiciones para modular la activación con hepsina de la proteína estimuladora de macrófagos

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere de manera general a los campos de la biología molecular y de la regulación por factores de crecimiento. Más concretamente, la invención se refiere a moduladores de la activación enzimática de la proteína estimuladora de macrófagos y a los usos de dichos moduladores.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La proteína estimuladora de macrófagos (PEM) media sus actividades biológicas mediante la unión y activación de la receptor tirosina quinasa Ron, un miembro de la familia del protooncogén Met (Leonard y Danilkovitch, 2000). La interacción de la PEM con su receptor conduce a la fosforilación del receptor y a la activación de la quinasa. La ruta de PEM/Ron se ha implicado en la tumorigénesis de diversos cánceres (ver, por ejemplo, Wagh *et al.*, 2008). La PEM es una proteína plasmática que resulta sintetizada constitutivamente de manera principal en las células parenquimales hepáticas, aunque también se expresa en el pulmón, glándula adrenal y placenta a niveles bajos. La PEM circula en la sangre en forma de un precursor de cadena sencilla inactivo (pro-PEM) que requiere el corte proteolítico en el enlace Ser-Lys-Leu-Arg483 ↓Val484 (SEC ID nº 1) para conseguir la actividad funcional (Skeel *et al.*, 1991) (Yoshimura *et al.*, 1993). La PEM activa es un heterodímero de subunidades α y β que se mantienen juntas mediante un enlace disulfuro. Es conocido que la PEM resulta activada en el sitio extravascular por varias serina proteasas similares a la tripsina (Bhatt *et al.*, 2007; Kawaguchi *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 1994b; Wang *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1994c).

25

La hepsina es un elemento de la familia de la serina proteasa transmembranal de tipo II (Netzel-Arnett *et al.*, 2003; Wu y Parry, 2007) y se ha identificado como uno de los genes regulados positivamente a nivel más alto en el cáncer de próstata (Dhanasekaran *et al.*, 2001; Luo *et al.*, 2001; Magee *et al.*, 2001; Stamey *et al.*, 2001; Stephan *et al.*, 2004; Welsh *et al.*, 2001). La tinción inmunohistoquímica reveló una expresión elevada en los tumores de estadio tardío y en lesiones óseas metastásicas (Morrissey *et al.*, 2008; Xuan *et al.*, 2006), sugiriendo que la hepsina desempeña un papel en la progresión tumoral. Además, basándose en el análisis de la expresión génica también se ha implicado la hepsina en el cáncer ovárico (Tanimoto *et al.*, 1997), en el carcinoma de células renales (Betsunoh *et al.*, 2007; Zacharski *et al.*, 1998) y en el cáncer de endometrio (Matsuo *et al.*, 2008). Beliveau *et al.* afirman que la hepsina no corta la pro-PEM (Beliveau *et al.*, FEBS J. 276:2213-26, 2009).

35

Existe una clara necesidad de una comprensión completa de los sustratos fisiológicos de la hepsina. La invención satisface esta necesidad y proporciona otros beneficios.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

40

Se da a conocer en la presente memoria que la hepsina convierte eficientemente la pro-proteína estimuladora de macrófagos (pro-PEM) en proteína estimuladora de macrófagos (PEM) mediante el corte del enlace peptídico Arg₄₈₃-Val₄₈₄. Tal como se indica en la presente memoria, un sustrato fisiológico para la hepsina es la pro-proteína estimuladora de macrófagos, que es un ligando de la receptor tirosina quinasa Ron, un miembro de la familia del protooncogén Met. En la presente memoria se demuestra que la hepsina corta la pro-PEM con una actividad potente, resultando en PEM activado que muestra actividades biológicas normales. La invención proporciona métodos y composiciones basadas por lo menos en parte en estos resultados, que se describen en detalle en la presente memoria. La hepsina y su interacción con pro-PEM es una diana única y ventajosa para un mayor ajuste fino en el diseño de enfoques profilácticos y/o terapéuticos contra condiciones patológicas asociadas a actividad biológica anormal o no deseada mediada por hepsina y/o PEM/Ron. De esta manera, la invención proporciona métodos, composiciones, kits y artículos fabricados para identificar y para usar sustancias que son capaces de modular la hepsina y/o la ruta biológica mediada por PEM/Ron mediante la modulación de las interacciones moleculares que participan en la regulación de la activación de PEM.

45

50

55

60

65

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, en un aspecto, la invención proporciona un método de cribado (o de identificación) de una sustancia inhibidora (es decir, antagonista) candidata que inhibe la activación por hepsina de pro-PEM, comprendiendo dicho método: (a) poner en contacto una sustancia candidata con una primera muestra que comprende hepsina y un sustrato pro-PEM, y (b) comparar la cantidad de activación de pro-PEM en la muestra con la cantidad de activación de pro-PEM en una muestra de referencia que comprende cantidades similares de hepsina y sustrato pro-PEM a las de la primera muestra pero que no ha sido puesta en contacto con dicha sustancia candidata, de manera que una reducción de la cantidad de activación de pro-PEM en la primera muestra en comparación con la muestra de referencia indica que la sustancia candidata es capaz de inhibir la activación por hepsina de la pro-PEM. En una realización, la hepsina en una muestra se encuentra en una cantidad eficaz para activar dicho sustrato pro-PEM. Un sustrato pro-PEM adecuado para la utilización en dichos métodos puede encontrarse en varias formas, con la condición de que imite la característica del sitio de corte de hepsina en pro-PEM.

Entre los ejemplos de sustratos pro-PEM se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, PEM de cadena sencilla de longitud completa que comprende una forma de tipo salvaje del enlace peptídico Arg₄₈₃-Val₄₈₄ y cualquier fragmento de PEM que comprende dicho enlace peptídico. Dicho fragmento puede ser de cualquier longitud, por ejemplo de por lo menos (aproximadamente) 5, 7, 10, 15, 20 o 25 aminoácidos de longitud, o de entre (aproximadamente) 4 y 25, de entre 5 y 20, o de entre 7 y 15 aminoácidos de longitud. Generalmente y preferentemente, un sustrato pro-PEM comprende un enlace peptídico Arg₄₈₃-Val₄₈₄ capaz de ser cortado por la hepsina de tipo salvaje. En algunas realizaciones, el sustrato pro-PEM es un sustrato pro-PEM sintético.

En otro aspecto, la invención proporciona un método de cribado de una sustancia que bloquea la activación de pro-PEM por la hepsina, comprendiendo dicho método el cribado para una sustancia que se une (preferentemente, aunque no necesariamente, de manera específica) a hepsina o a pro-PEM y que bloquea la interacción específica (por ejemplo la unión) entre la hepsina y pro-PEM. En algunas realizaciones, la sustancia compite con la hepsina para la unión a PEM. En algunas realizaciones, la sustancia compite con la pro-PEM para la unión a la hepsina. En una realización, la sustancia comprende, consiste o consiste esencialmente de una secuencia de aminoácidos que presenta una similitud o identidad de secuencias de por lo menos aproximadamente 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99% con respecto a pro-PEM (por ejemplo humana), por ejemplo un fragmento de la PEM humana que comprende el residuo aminoácido Arg₄₈₃ unido a Val₄₈₄. En algunas realizaciones en las que la sustancia comprende, consiste o consiste esencialmente de dicha secuencia de aminoácidos, el fragmento se encuentra mutado o no presenta por lo menos una parte de la secuencia de PEM asociada a actividad, por ejemplo la activación de Ron.

Tal como resultará evidente para el experto en la materia, los ensayos de cribado consistentes con los indicados anteriormente pueden comprender además una primera etapa de cribado para la formación de complejo hepsina-PEM con el fin de obtener un primer grupo de sustancias moduladoras candidatas, seguido de una segunda etapa de cribado basada en la capacidad del primer grupo de sustancias moduladoras candidatas de modular la activación de pro-PEM y/o la conversión de pro-PEM en una forma que es biológicamente activa. Son lecturas adecuadas cualesquiera que resulte evidente para el experto en la materia, basado en el conocimiento de la formación del complejo de enzima-sustrato y/o de las actividades biológicas asociadas a la ruta de señalización de hepsina/PEM/Ron. La formación del complejo enzima-sustrato puede medirse utilizando, por ejemplo, ensayos bioquímicos rutinarios (por ejemplo la electroforesis en gel, la cromatografía, la RMN, etc.).

En algunas realizaciones, un antagonista de anticuerpo comprende un anticuerpo anti-hepsina que bloquea la activación por hepsina de pro-PEM. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-hepsina comprende: (a) una cadena ligera que comprende: (i) HVR-L1 que comprende la secuencia RASQSVSSAVA (SEC ID nº 2); (ii) HVR-L2 que comprende la secuencia SASSLYS (SEC ID nº 3), e (iii) HVRL3 que comprende la secuencia QQYSSYYLLT (SEC ID nº 4), y/o (b) una cadena pesada que comprende: (i) HVR-H1 que comprende la secuencia GFNFYSYMH (SEC ID nº 5); (ii) HVR-H2 que comprende la secuencia ASIYSSYGSTYYADSVKG (SEC ID nº 6), e (iii) HVR-H3 que comprende la secuencia ARSDWSYKSGYTQKIYSKGLDY (SEC ID nº 7). En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-hepsina comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQKPGKAPKLLIYSASSLYSGVPSRFS GSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSSYYLLTFGQGTKVEIK (SEC ID nº 8) y/o una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNFYSYMHWRQAPGKGLEWVASIYSSYYGSTYYA DSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCARSDWSYKSGYTQKIYSKGLDYWGQ GTLVTVSS (SEC ID nº 9). En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En otras realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal. En algunas realizaciones, el anticuerpo se selecciona de entre el grupo que consiste de un anticuerpo quimérico, un anticuerpo de afinidad madurada, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo humano. En determinadas realizaciones, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂ o scFv.

En algunas realizaciones, la unión de una sustancia o molécula a la hepsina inhibe la activación por hepsina del sustrato de la hepsina. En algunas realizaciones, la unión de una sustancia o molécula a la hepsina inhibe competitivamente la activación por hepsina del sustrato de la hepsina. En una realización, la sustancia se une a la hepsina en ausencia de un compuesto que bloquea el sitio activo (por ejemplo catalítico) de la hepsina pero no se une a la hepsina en presencia del compuesto que bloquea el sitio activo de la hepsina.

En algunas realizaciones, la unión de dicha sustancia o molécula a la hepsina inhibe el crecimiento celular (tal como la proliferación, supervivencia, angiogénesis, morfogénesis y migración celulares) inducido por la PEM. En algunas realizaciones, la unión de dicha sustancia o molécula a la hepsina inhibe la activación del receptor Ron. En algunas realizaciones, la unión de una sustancia o molécula de la invención a la hepsina inhibe la unión a la hepsina del sustrato de la hepsina. En algunas realizaciones, la unión de una sustancia o molécula a la hepsina no inhibe la unión a la hepsina del sustrato de la hepsina. En algunas realizaciones, la unión de una sustancia o molécula de la invención a la hepsina inhibe la actividad de la hepsina, tal como la actividad enzimática de la hepsina. En algunas realizaciones, la actividad enzimática de la hepsina comprende el corte del sustrato polipeptídico de la hepsina. En una realización, el sustrato polipeptídico de la hepsina es pro-PEM.

En algunas realizaciones, se obtiene un antagonista mediante un método de cribado o identificación de la invención tal como se indica en la presente memoria.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 5 FIGURA 1: activación *in vitro* de la pro-PEM por la hepsina. La hepsina recombinante activó la pro-PEM de una manera dependiente de la dosis con la incubación durante 1 hora a 37°C. Se separaron los productos en un SDS-PAGE bajo condiciones reductoras. La secuenciación N-terminal de la banda de ~25 kDa (ilustrada) indicó que ésta era la cadena β y, de esta manera, que la hepsina había cortado la pro-PEM en el enlace Arg₄₈₃-Val₄₈₄. La figura 1 da a conocer la SEC ID nº 17.
- 10 FIGURA 2: activación de pro-PEM por la hepsina expresada en la superficie celular en células LnCap-34. Las células LnCap-34 que sobreexpresan establemente hepsina se sometieron a ayuno de suero y se trataron con ¹²⁵I-pro-PEM solo o en combinación con diferentes inhibidores durante 3 horas. Se utilizó la hepsina recombinante (10 nM) a modo de control positivo. Se observó un incremento significativo del procesamiento de pro-PEM tras 3 horas en comparación con el inicio del experimento. Los inhibidores KQLR (SEC ID nº 10), KD1 y el anticuerpo anti-hepsina Fab25 bloquearon eficazmente la activación de pro-PEM.
- 15 FIGURA 3: unión a Ron de PEM activada por hepsina. (a) Para el experimento de resonancia del plasmón superficial, se utilizó un chip CM5 en el que se había acoplado mediante aminas un anticuerpo anti-Fc específico, para capturar Ron-Fc sobre el biosensor. No se observó unión detectable de pro-PEM (1 μ M) a Ron, mientras que la PEM activada por hepsina mostró una unión de alta afinidad (K_D : 7 nM) a Ron; los datos se ajustaron a un modelo de unión 1:1. (b) En el experimento de ELISA para medir la unión de PEM a Ron, la concentración eficaz que se determinó que proporcionaba la unión semimáxima (EC_{50}) fue de 0,519 nM.
- 20 FIGURA 4: fosforilación de las quinasas S6 y MAP. Ni la hepsina ni pro-PEM solas resultaron eficaces en la activación de la ruta de señalización de Ron, mientras que el tratamiento con hepsina de pro-PEM mostró una fosforilación robusta de tanto la MAP quinasa como la quinasa S6 de una manera dependiente de la dosis.
- 25 FIGURA 5: ensayo de cambio de morfología de los macrófagos peritoneales. Tras la estimulación con PEM activada con hepsina, los macrófagos peritoneales experimentos claros cambios de forma celular, puestos de manifiesto en la protrusión y elongación. El efecto de la PEM activada por hepsina fue comparable al de una PEM disponible comercialmente, así como PEM activada por HGFA.
- 30 FIGURA 6: ensayo de quimiotaxis. El tratamiento de pro-PEM con hepsina condujo a un incremento significativo ($p < 0,001$) de la migración de los macrófagos peritoneales y el efecto fue comparable al de la PEM madura de un proveedor comercial. El pretratamiento con un inhibidor antihepsina (anticuerpo antihepsina Fab25) mostró una reducción marcada de la migración de los macrófagos.
- 35 FIGURA 7: inhibición de la síntesis de óxido nítrico. Los macrófagos de la médula ósea de ratón primarios mostraron una producción robusta de óxido nítrico en respuesta a LPS. La PEM activada por hepsina atenuó significativamente la producción de NO en macrófagos derivados de la médula ósea. El efecto de la PEM activada por hepsina fue comparable al de una PEM disponible comercialmente. El tratamiento con pro-PEM o pro-PEM mezclada con hepsina y anticuerpo antihepsina Fab25 no inhibió la producción robusta de ácido nítrico en respuesta a LPS.
- 40 FIGURA 8: una realización de una secuencia de aminoácidos de hepsina humana nativa (SEC ID nº 18).
- FIGURA 9: (A) y (B) Otra realización de una secuencia de aminoácidos de hepsina humana nativa (SEC ID nº 19).
- FIGURA 10: una realización de una secuencia de aminoácidos de pro-proteína estimuladora de macrófagos (pro-PEM) humana nativa (SEC ID nº 20).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

- 45 La invención proporciona métodos, composiciones, kits y artículos fabricados que comprenden moduladores de la ruta de señalización de PEM/Ron, incluyendo métodos de utilización de dichos moduladores. En la presente memoria se proporciona información sobre estos métodos, composiciones, kits y artículos fabricados.

50 *Técnicas generales*

- La práctica de la presente invención utiliza, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que se encuentran comprendidas dentro de los conocimientos del experto en la materia. Dichas técnicas se explican exhaustivamente en la literatura, tal como en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición (Sambrook *et al.*, 1989; "Oligonucleotide Synthesis" (M.J. Gait, ed., 1984)); Animal Cell Culture (R.L. Freshney, ed., 1987); Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); Ausubel, F.M., *et al.*(editores), Current Protocols in Molecular Biology (1987) y actualizaciones periódicas); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis *et al.*, ed., 1994); "A Practical Guide to Molecular Cloning" (Perbal Bernard V., 1988); "Phage Display: A Laboratory Manual" (Barbas *et al.*, 2001).
- 60

Definiciones

- 65 El término "hepsina" tal como se utiliza en la presente memoria comprende polipéptidos de secuencia nativa, variantes de polipéptido y fragmentos de un polipéptido de secuencia nativa y variantes de polipéptido (que se definen adicionalmente en la presente memoria) que son capaces de corte de pro-PEM de una manera similar a la

hepsina de tipo salvaje. El polipéptido hepsina indicado en la presente memoria puede ser el aislado a partir de una diversidad de fuentes, tales como de tipos de tejido humano o de otra fuente, o puede prepararse mediante métodos recombinantes o sintéticos. Las expresiones "hepsina", "polipéptido hepsina", "enzima hepsina" y "proteína hepsina" también incluyen variantes de un polipéptido hepsina tal como se da a conocer en la presente memoria.

Un "polipéptido hepsina de "secuencia nativa" comprende un polipéptido que presenta la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido hepsina correspondiente derivado de la naturaleza. En una realización, un polipéptido hepsina de secuencia nativa comprende la secuencia de aminoácidos de la figura 8. En una realización, un polipéptido hepsina de secuencia nativa comprende la secuencia de aminoácidos de la figura 9. Dicho polipéptido hepsina de secuencia nativa puede aislarse de la naturaleza o puede producirse por medios recombinantes o sintéticos. La expresión "polipéptido hepsina de secuencia nativa" comprende específicamente las formas truncadas o secretadas de origen natural del polipéptido hepsina específico (por ejemplo una secuencia de dominio extracelular), formas variantes de origen natural (por ejemplo formas de procesamiento alternativo) y variantes alélicas de origen natural del polipéptido.

La expresión "variante de polipéptido hepsina", o variaciones de la misma, se refiere a un polipéptido hepsina, generalmente un polipéptido hepsina activo, tal como se define en la presente memoria, que presenta una identidad de secuencia de aminoácidos de por lo menos aproximadamente 80% respecto a cualquiera de las secuencias de polipéptido hepsina de secuencia nativa dadas a conocer en la presente memoria. Entre dichas variantes del polipéptido hepsina se incluyen, por ejemplo, polipéptidos hepsina en los que se añaden, o se delecionan, uno o más residuos aminoácidos en el extremo N-terminal o C-terminal de la secuencia de aminoácidos nativa. Habitualmente una variante de polipéptido hepsina presenta una identidad de secuencia de aminoácidos de por lo menos aproximadamente 80%, alternativamente de por lo menos aproximadamente 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%, respecto a una secuencia de polipéptido hepsina de secuencia nativa tal como se da a conocer en la presente memoria. Habitualmente los polipéptidos variantes de hepsina presentan una longitud de por lo menos aproximadamente 10 aminoácidos, alternativamente de por lo 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 superior. Opcionalmente, los polipéptidos variantes de hepsina presentan no más de una sustitución conservadora de aminoácidos, en comparación con una secuencia de polipéptido hepsina nativo, alternativamente no más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones conservadoras de aminoácidos en comparación con la secuencia nativa del polipéptido hepsina.

La expresión "porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" con respecto a una secuencia peptídica o polipeptídica se define como el porcentaje de residuos aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos aminoácidos en la secuencia peptídica o polipeptídica de referencia, tras alinear las secuencias e introducir huecos, en caso necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencias, y no considerando ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencias. La alineación con fines de determinación del porcentaje de identidad de secuencias de aminoácidos puede realizarse de diversas maneras que se encuentran comprendidas dentro de los conocimientos del experto en la materia, por ejemplo utilizando software informático disponible públicamente, tal como BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). El experto en la materia podrá determinar los parámetros apropiados para medir las alineaciones, incluyendo cualesquiera algoritmos necesarios para conseguir la alineación máxima a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se comparan. Sin embargo, para los fines de la presente memoria, se generan los valores de % de identidad de secuencias de aminoácidos utilizando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 tal como se indica en la patente US nº 6.828.146.

El término "vector", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una molécula de ácidos nucleicos capaz de transportar otro ácido nucleico al que se encuentra unido. Un tipo de vector es un "plásmido", un bucle de ADN circular de doble cadena en el que pueden ligarse segmentos adicionales de ADN. Otro tipo de vector es un vector fago. Otro tipo de vector es un vector vírico, siendo posible ligar segmentos adicionales de ADN en el genoma vírico. Determinados vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped en la que han sido introducidos (por ejemplo vectores bacterianos con origen de replicación bacteriano y vectores de mamífero episómicos). Otros vectores (por ejemplo vectores de mamífero no episómicos) pueden integrarse en el genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula huésped, y replicarse de esta manera conjuntamente con el genoma del huésped. Además, determinados vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los que se encuentran ligados operablemente. Dichos vectores se denominan en la presente memoria "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores recombinantes"). En general, los vectores de expresión útiles en las técnicas de ADN recombinante con frecuencia se encuentran en forma de plásmidos. En la presente memoria, "plásmido" y "vector" pueden utilizarse intercambiamente, ya que el plásmido es la forma de vector que se utiliza más comúnmente.

El término "polinucleótido" o "ácido nucleico", tal como se utilizan intercambiamente en la presente memoria, se refiere a polímeros de nucleótidos de cualquier longitud, e incluye ADN y ARN. Los nucleótidos pueden ser desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, nucleótidos o bases modificados y/o los análogos de los mismos, o cualquier sustrato que pueda ser incorporado en un polímero por la ADN o ARN polimerasa, o mediante una reacción de

síntesis. Un polinucleótido puede comprender nucleótidos modificados, tales como nucleótidos metilados y sus análogos. En caso de encontrarse presente, la modificación de la estructura de los nucleótidos puede realizarse antes o después del ensamblaje del polímero. La secuencia de nucleótidos puede interrumpirse con componentes no nucleotídicos. Un polinucleótido puede ser adicionalmente modificado tras la síntesis, tal como mediante conjugación con un marcaje. Entre otros tipos de modificación se incluyen, por ejemplo, "caperuzas", la sustitución de uno o más nucleótidos de origen natural con un análogo, las modificaciones internucleótidas, tales como, por ejemplo, aquellas con enlaces sin carga (por ejemplo fosfonatos de metilo, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces con carga (por ejemplo fosforotioatos, fosforoditioatos, etc.), aquellos que contiene fracciones colgantes, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos de señal, pLy-L-lisina, etc.), aquellos con intercalantes (por ejemplo acridina, psoralén, etc.), aquellos que contienen quelantes (por ejemplo metales, metales radioactivos, boro, metales oxidantes, etc.), aquellos que contienen alquilantes, aquellos con enlaces modificados (por ejemplo ácidos nucleicos alfa-anoméricos, etc.), así como las formas no modificadas del polinucleótido o polinucleótidos. Además, puede sustituirse cualquiera de los grupos hidroxilo presentes ordinariamente en los azúcares, por ejemplo con grupos fosfonato, grupos fosfato, protegidos con grupos protectores estándares, o activados para preparar enlaces adicionales a nucleótidos adicionales, o pueden conjugarse con soportes sólidos o semisólidos. El OH 5' y 3'-terminal puede fosforilarse o sustituirse con aminas o fracciones de grupos de caperuza orgánicos de entre 1 y 20 átomos de carbono. Otros hidroxilos también pueden derivatizarse con grupos protectores estándares. Los polinucleótidos también pueden contener formas análogas de los azúcares ribosa o desoxirribosa que son generalmente conocidas de la técnica, incluyendo, por ejemplo, 2'-O-metilo, 2'-O-alilo, 2'-fluoro- o 2'-azido-ribosa, análogos de azúcar carbocíclico, azúcares α -anoméricos, azúcares epiméricos tales como arabinosa, xilosas o lixosas, azúcares piranosa, azúcares furanosa, sedoheptulosas, análogos acíclicos y análogos de nucleósidos abásicos, tales como ribósido de metilo. Puede sustituirse uno o más enlaces fosfodiéster por grupos de enlace alternativos. Entre estos grupos de enlace alternativos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, realizaciones en las que el fosfato se sustituye por P(O)S ("tioato"), P(S)S ("dilitioato"), (O)NR₂ ("amidato") P(O)R, P(O)OR', CO o CH₂ ("formacetal"), en los que R o R' es independientemente H o alquilo sustituido o no sustituido (1 a 20 C) que contiene opcionalmente un enlace éter (-O-), arilo, alquenoilo, cicloalquilo, cicloalquenoilo o araldilo. No es necesario que todos los enlaces en un polinucleótido sean idénticos. La descripción anterior se aplica a todos los polinucleótidos a los que se hace referencia en la presente memoria, incluyendo ARN y ADN.

El término "oligonucleótido", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere generalmente a polinucleótidos cortos, generalmente de cadena sencilla, generalmente sintéticos que presentan una longitud generalmente, aunque no necesariamente, inferior a aproximadamente 200 nucleótidos. Los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido" no son mutuamente exclusivos. La descripción anterior para los polinucleótidos es igualmente y totalmente aplicable a oligonucleótidos.

La expresión "proteína estimuladora de macrófagos" y "PEM" o "pro-proteína estimuladora de macrófagos" y "pro-PEM", tal como se utilizan en la presente memoria, a menos que se indique lo contrario especifica o contextualmente, se refiere a cualquier polipéptido PEM nativo o variante (natural o sintético) que es capaz, o de un polipéptido PEM que puede ser activado por la hepsina en PEM activada, que es capaz de activar plasminógeno bajo condiciones que permiten que se produzca dicho procedimiento. La expresión "PEM de tipo salvaje" generalmente se refiere a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una proteína PEM natural, por ejemplo tal como se indica en la figura 10 y se lista en SwissProt n° de acceso P26927 (las referencias listadas en este número de acceso se incorporan en la presente memoria como referencia).

Los términos "anticuerpo" e "inmunoglobulina" se utilizan intercambiamente en el sentido más amplio e incluyen anticuerpos monoclonales (por ejemplo de los anticuerpos monoclonales de longitud completa o intactos), anticuerpos policlonales, anticuerpos multivalentes, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo anticuerpos biespecíficos con la condición de que muestren la actividad biológica deseada) y pueden incluir además determinados fragmentos de anticuerpo (tal como se indica en mayor detalle en la presente memoria). Un anticuerpo puede ser humano, humanizado y/o de afinidad madurada.

La expresión "fragmentos de anticuerpo" comprende únicamente una parte de un anticuerpo intacto, en la que la parte preferentemente conserva por lo menos una, preferentemente la mayoría o la totalidad, de las funciones normalmente asociadas a dicha parte en el caso de encontrarse presente en un anticuerpo intacto. En una realización, un fragmento de anticuerpo comprende un sitio de unión a antígeno del anticuerpo intacto y, de esta manera, conserva la capacidad de unirse a un antígeno. En otra realización, un fragmento de anticuerpo, por ejemplo uno que comprende la región Fc, conserva por lo menos una de las funciones biológicas normalmente asociada a las región Fc en caso de encontrarse presente en un anticuerpo intacto, tal como la unión de FcRn, la modulación de la semivida del anticuerpo, la función ADCC y la unión del complemento. En una realización, un fragmento de anticuerpo es un anticuerpo monovalente que presenta una semivida *in vivo* sustancialmente similar a la de un anticuerpo intacto. Por ejemplo, dicho fragmento de anticuerpo puede comprender un brazo de unión a antígeno unido a una secuencia de Fc capaz de conferir estabilidad *in vivo* al fragmento.

La expresión "anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprende

- 5 la población comprenden secuencias de aminoácidos esencialmente idénticas excepto por posibles mutaciones naturales que pueden encontrarse presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único antígeno. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno.
- 10 Los anticuerpos monoclonales en la presente memoria incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o perteneciente a una clase o subclase particular de anticuerpos, mientras que el resto de la cadena o cadenas es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos fragmentos, con la condición de que muestren la actividad biológica deseada (patente US nº 4.816.567, y Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855, 1984).
- 15 Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de una inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpos receptores) en las que los residuos de una región hipervariable del receptor son sustituidos por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como el ratón, la rata, el conejo o primates no humanos, que presentan la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de región marco (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprende sustancialmente la totalidad de por lo menos uno, y típicamente dos, dominios variables en los que la totalidad, o sustancialmente la totalidad, de los bucles hipervariables corresponde a los de una inmunoglobulina no humana, y la totalidad, o sustancialmente la totalidad, de las FR corresponden a las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente puede comprender además por lo menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles ver Jones *et al.*, Nature 321:522-525, 1986; Riechmann *et al.*, Nature 332:323-329, 1988, y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596, 1992. Ver también los artículos de revisión siguientes y referencias citadas en los mismos: Vaswaniand Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115, 1998; Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038, 1995; Hurlle y Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433, 1994.
- 20 25 30
- 35 Un "anticuerpo humano" es un anticuerpo que presenta una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o que ha sido preparado utilizando cualquiera de las técnicas para preparar anticuerpos humanos tales como las dadas conocer en la presente memoria. Esta definición de anticuerpo humano excluye específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos.
- 40 Un anticuerpo "de afinidad madurada" es un anticuerpo con una o más alteraciones en una o más de las CDR del mismo que resultan en una mejora de la afinidad del anticuerpo para el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no presenta dicha alteración o alteraciones. Los anticuerpos de afinidad madurada preferentes presentan afinidades nanomolares o incluso picomolares para el antígeno diana. Los anticuerpos de afinidad madurada se producen mediante procedimientos conocidos de la técnica. Marks *et al.*, Bio/Technology 10:779-783, 1992, describe la maduración de la afinidad mediante el barajado de dominios VH y VL. La mutagénesis aleatoria de las CDR y/o residuos de marco se describe en: Barbas *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3809-3813, 1994; Schier *et al.*, Gene 169:147-155, 1995; Yelton *et al.*, J. Immunol. 155:1994-2004, 1995; Jackson *et al.*, J. Immunol. 154(7):3310-9, 1995, y Hawkins *et al.*, J. Mol. Biol. 226:889-896, 1992.
- 45 50 Un anticuerpo "bloqueante" o un anticuerpo "antagonista" es uno que inhibe o reduce la actividad biológica del antígeno al que se une. Los anticuerpos bloqueadores o anticuerpos antagonistas preferentes inhiben sustancialmente o por completo la actividad biológica del antígeno.
- 55 Un "anticuerpo agonista", tal como se utiliza en la presente memoria, es un anticuerpo que imita por lo menos una de las actividades funcionales de un polipéptido de interés.
- 60 Un "trastorno" es cualquier condición que resultaría beneficiada del tratamiento con una composición o método de la invención. Lo anterior incluye trastornos o enfermedades crónicos y agudos, incluyendo las condiciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Entre los ejemplos no limitativos de trastornos que deben tratarse en la presente memoria se incluyen los tumores malignos y benignos, las no leucemias y neoplasias linfoides, los trastornos neuronales, gliales, astrocitales, hipotalámicos y otros glandulares, macrofágicos, epiteliales, estromales y blastocélicos, y otros trastornos relacionados con la angiogénesis.
- 65 Las expresiones "trastorno proliferativo celular" y "trastorno proliferativo" se refieren a trastornos que se asocian a algún grado de proliferación celular anormal. En una realización, el trastorno proliferativo celular es el cáncer.

El término "tumor", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a todo crecimiento y proliferación celular neoplásica, sea maligna o benigna, y a todas las células y tejidos precancerosos y cancerosos. Las expresiones "cáncer", "canceroso", "trastorno proliferativo celular", "trastorno proliferativo" y "tumor" no son mutuamente exclusivas tal como se hace referencia a las mismas en la presente memoria.

Los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren o describen la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza típicamente por el crecimiento/proliferación celular no regulado y/o invasividad. Entre los ejemplos de cáncer se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Entre los ejemplos más particulares de dichos cánceres se incluyen el cáncer de células escamosas, el cáncer de pulmón de células pequeñas, el cáncer de pulmón de células no pequeñas, el adenocarcinoma pulmonar, el carcinoma escamoso de pulmón, el cáncer de peritoneo, el cáncer hepatocelular, el cáncer gastrointestinal, el cáncer pancreático, el glioblastoma, el cáncer cervical, el cáncer ovárico, el cáncer hepático, el cáncer de vejiga, el hepatoma, el cáncer de mama, el cáncer de colon, el cáncer colorrectal, el carcinoma endometrial o uterino, el carcinoma de glándulas salivares, el cáncer de riñón o renal, el cáncer de próstata, el cáncer vulvar, el cáncer de tiroides, el carcinoma hepático, y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "tratamiento" se refiere a la intervención clínica en un intento de alterar el curso natural del individuo o célula bajo tratamiento, y puede llevarse a cabo para la profilaxis o durante el curso de la patología clínica. Entre los efectos deseables del tratamiento se incluyen la prevención de la aparición o de la recurrencia de una enfermedad, el alivio de los síntomas, la reducción de cualquier consecuencia patológica directa o indirecta de la enfermedad, la prevención de la metástasis, la reducción de la tasa de progresión de la enfermedad, la mejora o mitigación del estado de enfermedad, y la remisión o mejora del pronóstico. En algunas realizaciones, los métodos y/o las composiciones de la invención resultan útiles para retrasar el desarrollo de una enfermedad o trastorno.

Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad que resulta eficaz a las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios para conseguir el resultado terapéutico o profiláctico deseado.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una molécula (por ejemplo un antagonista) de la invención puede variar según factores tales como el estado de enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad de la molécula (por ejemplo el antagonista) de inducir una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es una cantidad en la que cualesquiera efectos tóxicos o perjudiciales de la molécula (por ejemplo un antagonista) se ven superados por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado profiláctico deseado. Típicamente, aunque no necesariamente, debido a que se utiliza una dosis profiláctica en sujetos antes o durante un estadio más temprano de la enfermedad, la cantidad profilácticamente eficaz será inferior a la cantidad terapéuticamente eficaz.

La expresión "agente citotóxico" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una sustancia que inhibe o impide el funcionamiento de las células y/o provoca la destrucción de las células. La expresión pretende incluir isótopos radioactivos (por ejemplo At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isótopos radioactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos (por ejemplo metotrexato, adriamicina, alcaloides vinca (vincristina, vinblastina, etopósido), doxorubicina, melfalán, mitomicina C, clorambucilo, daunorubicina u otros agentes intercalantes), enzimas y fragmentos de los mismos, tales como enzimas nucleolíticos; antibióticos; toxinas, tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas, y los diversos agentes antitumorales o anticáncer dados a conocer posteriormente en la presente memoria. Se indican posteriormente en la presente memoria otros agentes citotóxicos. Un agente tumoricida causa la destrucción de las células tumorales.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico que resulta útil en el tratamiento del cáncer. Entre los ejemplos de agentes quimioterapéuticos se incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida Cytoxan®, sulfonatos de alquilo tales como busulfán, improsulfán y piposulfán, aziridinas tales como benzodopa, carbocuona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas, incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolmelamina; acetogeninas (especialmente bulatacina y bulatacinona); delta-9-tetrahidrocanabinol (dronabinol, Marinol®), beta-lapacina, lapacol, colchicinas, ácido betulínico, una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecán (Hycamtin®)); CPT-11 (irinotecán, Camptosar®), 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; espongiatina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clornafacina, colofosfoamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, hidrocloreuro de óxido de mecloretamina, melfalán, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza uracilo, nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos enediina (por ejemplo caliqueamicina, especialmente caliqueamicina gamma 11 y caliqueamicina omega 11 (ver, por ejemplo Agnew, Chem. Intl. Ed. Engl. 33: 183-186, 1994); dinemicina, incluyendo dinemicina A; una esperamicina, así como cromóforo neocarzinostatina y cromóforos relacionados

antibiótico de cromoproteína enedina), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluyendo Adriamycin®, morfolino-doxorrubicina, cianomorfolino-doxorrubicina, 2-pirrolino-doxorrubicina, inyección de liposomas de HCl de doxorubicina (Doxil®) y desoxidoxorrubicina), epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas tales como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puomicina, 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, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina, tales como fludarabina, 6-mercaptapurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, encitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; antiadrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedor de ácido fólico tal como ácido frolnico; aceglatona; glucósido aldofosfamida; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiiurea; lentinano.; lonidainina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo de polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina (Eldisine®, Fildesin®); dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); tiotepa; taxoides, por ejemplo paclitaxel (Taxol®), formulación de nanopartículas preparada con albúmina (Abraxane™) y docetaxel (Taxotere®); cloranbucilo; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina (Velban®); platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; vincristina (Oncovin®); oxaliplatino; leucovovina; vinorelbina (Navelbine®); novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides tales como ácido retinoico; sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriormente indicados, así como combinaciones de dos o más de los anteriormente indicados, tales como CHOP, una abreviatura (en inglés) de terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona, y FOLFOX, una abreviatura (en inglés) de régimen de tratamiento con oxaliplatino (Eloxatin®) en combinación con 5-FU y leucovovina.

También se encuentran incluidos en dicha definición los agentes antihormonales que actúan regulando, reduciendo, bloqueando o inhibiendo los efectos de hormonas que pueden inducir el crecimiento del cáncer y que con frecuencia presentan la forma de un tratamiento sistémico o de cuerpo completo. Pueden ser hormonas ellos mismos. Entre los ejemplos se incluyen antiestrógenos y moduladores selectivos de receptores de estrógenos (MSRE), incluyendo, por ejemplo, el tamoxifeno (incluyendo el tamoxifeno Nolvadex®), el raloxifeno (Evista®), el droloxifeno, el 4-hidroxitamoxifeno, el trioxifeno, el queoxifeno, LY1117018, la onapristona y el toremifeno (Fareston®); las antiprogesteronas; los reguladores negativos de receptores de estrógenos (RNRE); antagonistas de receptores de estrógenos tales como el fulvestrant (Faslodex®); agentes que funcionan suprimiendo o inactivando los ovarios, por ejemplo la hormona liberadora de hormona luteinizante (HLHL), agonistas tales como el acetato de leuprolido (Lupron® y Eligard®), acetato de goserelina, acetato de buserelina y tripterelina; otros antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida y bicalutamida; e inhibidores de la aromatasas que inhiben el enzima aromatasas, que regula la producción de estrógenos en las glándulas adrenales, tales como, por ejemplo, las 4(5)-imidazolas, la aminoglutetimida, el acetato de megesterol (Megase®), el exemestano (Aromasin®), formestanie, fadrozol, vorozol (Revisor®), letrozol (Femara®) y anastrozol (Arimidex®). Además, dicha definición de agentes quimioterapéuticos incluye bisfosfonatos tales como el clodronato (por ejemplo Bonafos® u Ostac®), el etidronato (Didrocal®), NE-58095, el ácido zoledrónico/zoledronato (Zometa®), el alendronato (Fosamax®), el pamidronato (Aredia®), el tiludronato (Skelid®) o el risedronato (Actonel®), así como la troxacitabina (un análogo 1,3-dioxolano del nucleósido citosina); oligonucleótidos antisentido, particularmente los que inhiben la expresión de genes en rutas de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante, tales como, por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (R-FCE); vacunas tales como la vacuna Theratope® y las vacunas de terapia génica, por ejemplo la vacuna Allovectin®, la vacuna Leuvectin® y la vacuna Vaxid®; el inhibidor de la topoisomerasa 1 (por ejemplo Lurtotecan®); rmRH (por ejemplo Abarelix®); el ditosilato de lapatinib (un inhibidor de molécula pequeña de tirosina quinasa dual de ErbB-2 y RFCE también conocido como GW572016); inhibidores de COX-2, tales como el celecoxib (Celebrex®; 4-(5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-ilo)benzenosulfonamida, y sales, ácido o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriormente indicados.

La expresión "agente inhibidor del crecimiento" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula cuyo crecimiento depende de la activación de PEM *in vitro* o *in vivo*. De esta manera, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduzca significativamente el porcentaje de células dependientes de PEM en etapa S. Entre los ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento se incluyen agentes que bloquean el avance del ciclo celular (en un punto diferente de la etapa S), tales como agentes que inducen la parada de G1 y la parada de la etapa M. Entre los bloqueantes clásicos de la etapa M se incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), los taxanos y los inhibidores de la topoisomerasa II, tales como la doxorubicina, la epirubicina, la daunorrubicina, el etopósido y la bleomicina. Los agentes que paran la G1 también se desbordan a la parada de la etapa S, por ejemplo agentes alquilantes del ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Puede encontrarse más

información en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn e Israel, editores, capítulo 1, titulado "Regulación del ciclo celular, oncogenes y fármacos antineoplásicos", de Murakami *et al.* (WB Saunders: Philadelphia, 1985), especialmente la página 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son fármacos anticáncer derivados ambos del tejo. El docetaxel (Taxotere®, Rhone-Poulenc Rorer), derivado del tejo europeo, es un análogo semisintético del paclitaxel (Taxol®, Bristol-Myers Squibb). El paclitaxel y el docetaxel inducen el ensamblaje de los microtúbulos a partir de dímeros de tubulina y estabilizan los microtúbulos mediante el bloqueo 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-trideoxi- α -L-lixo-hexapiranosil)oxi]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-8-(hidroxiacetil)-1-metoxi-5,12-naftacenodiona.

Composiciones y métodos de la invención

A. Anticuerpos

En una realización, la presente invención proporciona anticuerpos antagonistas que pueden resultar útiles en la presente memoria como agentes terapéuticos y/o diagnósticos. Entre los anticuerpos ejemplares se incluyen anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, biespecíficos y heteroconjugados.

1. Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales preferentemente se generan en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (s.c.) o intraperitoneales (i.p.) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede resultar útil conjugar el antígeno relevante (especialmente en el caso de que se utilicen péptidos sintéticos) con una proteína que sea inmunogénica en la especie que debe inmunizarse. Por ejemplo, el antígeno puede conjugarse con hemocianina de lapa americana (HLA), albúmina sérica, tiroglobulina bovina o inhibidor de la tripsina de la soja, utilizando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo éster de maleimidobenzoil-sulfosuccinimida (conjugación mediante los residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (mediante los residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, en el que R y R^1 son grupos alquilo diferentes.

Los animales se inmunizan contra el antígeno, conjugados inmunogénicos o derivados mediante combinación con, por ejemplo, 100 mg ó 5 mg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund y la inyección de la solución intradérmicamente en múltiples sitios. Un mes después, los animales reciben un refuerzo de aproximadamente 1/5 a 1/10 de la cantidad original de polipéptido o conjugado en coadyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. Siete a 14 días después, se extraen muestras de sangre de los animales y se somete a ensayo el suero para el título de anticuerpos. Los animales reciben un refuerzo hasta que el título alcanza un nivel estable. También pueden prepararse conjugados en cultivo celular recombinante en forma de proteínas de fusión. También pueden utilizarse convenientemente agentes agregantes tales como alúmina para intensificar la respuesta inmunológica.

2. Anticuerpos monoclonales

Pueden prepararse anticuerpos monoclonales utilizando el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, *Nature* 256:495, 1975, o mediante cualquier método de ADN recombinante (patente US nº 4.816.567).

En el método del hibridoma, se inmuniza un ratón u otro animal huésped apropiado (por ejemplo un hámster) tal como se ha indicado anteriormente para inducir los linfocitos que producen o que son capaces de producir los anticuerpos que se unen específicamente la proteína utilizada para la inmunización. Alternativamente, pueden inmunizarse los linfocitos *in vitro*. Tras la inmunización, se aíslan los linfocitos y después se fusionan con una línea celular de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar células de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, páginas 59 a 103, 1986).

Las células de hibridoma preparadas de esta manera se sembraron y cultivaron en un medio de cultivo adecuado que contenía preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células de mieloma parental no fusionadas (también denominadas parejas de fusión). Por ejemplo, en el caso de que las células de mieloma parental no presenten el enzima hipoxantina guanina fosforibosil-transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo selectivo de los hibridomas típicamente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), en el que las sustancias evitan el crecimiento de las células deficientes en HGPRT.

Las células de mieloma parejas de fusión preferentes son aquéllas que se fusionan eficientemente, dan soporte a una producción estable de nivel elevado de anticuerpos por parte de las células productoras de anticuerpos seleccionadas y/o son sensibles a un medio selectivo que selecciona contra las células parentales no fusionadas. Las líneas celulares de mieloma preferentes son las líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de los tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11, disponibles del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, USA, y SP-2 y derivados, por ejemplo las células X63-Ag8-653, disponibles de la American Type Culture Collection,

Manassas, Virginia, USA. Se han descrito líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol. 133:3001, 1984, y Brodeur *et al.*, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, páginas 51 a 63 (Marcel Dekker Inc., New York, 1987).

El medio de cultivo en el que las células de hibridoma crecen puede someterse a ensayo para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferentemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como un radioinmunoensayo (RIA) o un ensayo de inmunosorción ligada a enzima (ELISA).

La afinidad de unión de los anticuerpos monoclonales puede determinarse utilizando, por ejemplo, el análisis de Scatchard de Munson *et al.*, Anal. Biochem. 107:220, 1980.

Tras identificar 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 cultivarse mediante métodos estándares (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, páginas 59 a 103, 1986). Entre los medios de cultivo adecuados para este fin se incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o medio RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* en forma de tumores ascites en un animal, por ejemplo mediante inyección i.p. de las células en ratones.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden separarse convenientemente del medio de cultivo, líquido ascites o suero mediante procedimientos convencionales de purificación de anticuerpos tales como, por ejemplo, cromatografía de afinidad (por ejemplo utilizando sefarosa-proteína A o proteína G) o cromatografía de intercambio iónico, cromatografía en hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis, etc.

El ADN codificante de los anticuerpos monoclonales puede aislarse y secuenciarse fácilmente mediante procedimientos convencionales (por ejemplo mediante la utilización de sondas oligonucleótidas que sean capaces de unirse específicamente a genes codificantes de las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma pueden servir como fuente preferente de dicho ADN. Tras el aislamiento, el ADN puede insertarse en vectores de expresión, que seguidamente se transfectan en células huésped tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma que de otra manera no producirían proteínas anticuerpos, con el fin de conseguir la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Entre los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN codificante del anticuerpo se incluyen Skerra *et al.*, Curr. Opin. Immunol. 5:256-262, 1993; y Pluckthun, Immunol. Rev. 130:151-188, 1992.

En una realización adicional, los anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpo pueden aislarse a partir de bibliotecas fágicas de anticuerpos generadas utilizando las técnicas descritas en McCafferty *et al.*, Nature 348:552-554, 1990. Clackson *et al.*, Nature, 352:624-628, 1991, y Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222:581-597, 1991, describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, utilizando bibliotecas fágicas. Algunas publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo de nM) mediante barajado de cadenas (Marks *et al.*, Bio/Technology 10:779-783, 1992), así como la infección combinatorial y la recombinación *in vivo* como estrategia para construir bibliotecas fágicas de gran tamaño (Waterhouse *et al.*, Nucl. Acids Res. 21:2265-2266, 1993). De esta manera, dichas técnicas son alternativas viables a los métodos tradicionales de hibridoma de anticuerpo monoclonal para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

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

3. Anticuerpos humanos y humanizados

Los anticuerpos de la invención pueden comprender además anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Las formas humanizadas de los anticuerpos no humanos (por ejemplo murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de los mismos (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de los anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Entre los anticuerpos humanizados se incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpos receptores) en las que los residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor son sustituidos por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como el ratón, la rata o el conejo con la

especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de región marco (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los residuos no humanos correspondientes. Los anticuerpos humanizados pueden comprender además residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de CDR o de marco importadas. En general, el anticuerpo humanizado comprende sustancialmente la totalidad de por lo menos uno, y típicamente dos, dominios variables en los que la totalidad, o sustancialmente la totalidad, de las regiones de CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana, y la totalidad, o sustancialmente la totalidad, de las regiones FR corresponden a las de una secuencia de consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado óptimamente comprende además por lo menos una parte de una región constante de inmunoglobulina humana (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana [Jones *et al.*, Nature 321:522-525, 1986; Riechmann *et al.*, Nature 332:323-329, 1988, y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596, 1992].

Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos de la técnica. Generalmente un anticuerpo humanizado presenta uno o más residuos aminoácidos introducidos en el mismo a partir de una fuente que es no humana. Estos residuos aminoácidos no humanos con frecuencia se denominan residuos "importados", que típicamente se obtienen de un dominio variable "importado". La humanización puede llevarse a cabo esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores [Jones *et al.*, Nature 321:522-525, 1986; Riechmann *et al.*, Nature 332:323-327, 1988; Verhoeven *et al.*, Science 239:1534-1536, 1988] mediante la sustitución de las CDR de roedor o las secuencias de CDR de las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (la patente US nº 4.816.567), en la que se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen por residuos de sitios análogos de anticuerpos de roedor.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que deben utilizarse en la preparación de los anticuerpos humanizados resulta muy importante para reducir la antigenicidad y la respuesta de HAMA (anticuerpos humanos antiratón) en el que el anticuerpo está destinado a la utilización terapéutica humana. Según el método denominado "de ajuste óptimo", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba frente a la biblioteca completa de secuencias de dominio variable humanas conocidas. Se identifica la secuencia de dominio V humana más similar a la del roedor y se acepta la región marco humana (FR) dentro de la misma para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, J. Immunol. 151:2296, 1993; Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. 196:901, 1987). Otro método utiliza una región de marco particular derivada de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de cadenas ligeras o pesadas. Puede utilizarse el mismo marco para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285, 1992; Presta *et al.*, J. Immunol. 151:2623, 1993).

También resulta importante que los anticuerpos se humanicen conservando la afinidad de unión elevada para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, según un método preferente, pueden prepararse anticuerpos humanizados mediante un procedimiento de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina se encuentran normalmente disponibles y resultarán familiares al experto en la materia. Se encuentran disponibles programas informáticos que ilustran y muestran estructuras probables de conformación tridimensional de secuencias candidatas de inmunoglobulina seleccionadas. La inspección de estas visualizaciones permite analizar el papel probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen sobre la capacidad de la inmunoglobulina candidata para la unión a su antígeno. De esta manera, pueden seleccionarse y combinarse residuos de FR procedentes de secuencias del receptor e importadas, de manera que se consiga la característica de anticuerpo deseada, tal como una afinidad incrementada para el antígeno o antígenos diana. En general, los residuos de la región hipervariable se encuentran directa y más sustancialmente implicados en la influencia sobre la unión a antígeno.

Se encuentran contempladas diversas formas de anticuerpos humanizados. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como un Fab, que se conjuga opcionalmente con uno o más agentes citotóxicos con el fin de generar un inmunocnjugado. Alternativamente, el anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo intacto, tal como un anticuerpo IgG1 intacto.

A modo de alternativa a la humanización pueden generarse anticuerpos humanos. Por ejemplo, ahora resulta 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 endógena de inmunoglobulinas. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de región de unión (J_H) de cadena pesada de anticuerpo en ratones quiméricos y mutantes de línea germinal resulta en la inhibición total de la producción endógena de anticuerpos. La transferencia de la matriz génica de inmunoglobulina de línea germinal humana a dichos ratones mutantes de línea germinal resultará en la producción de anticuerpos humanos tras el reto antigénico. Ver, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2551, 1993; Jakobovits *et al.*, Nature

362:255-258, 1993; Bruggermann *et al.*, Year in Immun. 7:33, 1993, y patentes US nº 5.545.806, nº 5.569.825, nº 5.591.669 (todas de GenPharm) y nº 5.545.807, y el documento nº WO 97/17852.

5 Alternativamente, puede utilizarse la tecnología de expresión fágica (McCafferty *et al.*, Nature 348:552-553, 1990) para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpo *in vitro*, utilizando repertorios génicos de dominio variable (V) de inmunoglobulina procedentes de donantes no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, se clonan genes de dominio V de anticuerpo en el mismo marco de un gen de proteína mayor o menor de cubierta de un bacteriófago filamentosos, tal como M13 ó fd, y se expresan en forma de fragmentos de anticuerpo funcionales sobre la superficie de la partícula fágica. Debido a que la partícula filamentosos contiene una copia de ADN de cadena sencilla del genoma fágico, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también resultan en que la selección del gen codificante del anticuerpo muestre también estas propiedades. De esta manera, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. Puede llevarse a cabo la expresión fágica en una diversidad de formatos, tal como se describe en, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571, 1993. Pueden utilizarse varias fuentes de segmentos génicos V para la expresión fágica. Clackson *et al.*, Nature 352:624-628, 1991, aislaron una serie diversa de anticuerpos anti-oxazolona a partir de una biblioteca combinatorial aleatoria pequeña de genes V derivada de los bazo de ratones inmunizados. Puede construirse un repertorio de genes V procedente de donantes humanos no humanizados y pueden aislarse anticuerpos contra un abanico diverso de antígenos (incluyendo autoantígenos), siguiendo esencialmente las técnicas descritas en Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222:581-597, 1991; Griffith *et al.*, EMBO J. 12:725-734, 1993. Ver también las patentes US nº 5.565.332 y nº 5.573.905.

Tal como se ha comentado anteriormente, las células B activadas *in vitro* pueden generar anticuerpos humanos (ver las patentes US nº 5.567.610 y nº 5.229.275).

25 4. Fragmentos de anticuerpo

En determinadas circunstancias existen ventajas en utilizar fragmentos de anticuerpo y no anticuerpos completos. El menor tamaño de los fragmentos permite una rápida eliminación y puede conducir a un mejor acceso a los tumores sólidos.

30 Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, dichos fragmentos se han derivado mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (ver, por ejemplo, Morimoto *et al.*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117, 1992, y Brennan *et al.*, Science 229:81, 1985). Sin embargo, estos fragmentos ahora pueden producirse directamente utilizando células huésped recombinantes. Todos los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y scFv pueden expresarse y ser secretadas por *E. coli*, permitiendo de esta manera la fácil producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Pueden aislarse los fragmentos de anticuerpos a partir de las bibliotecas fágicas de anticuerpos comentadas anteriormente. Alternativamente, pueden recuperarse directamente los fragmentos Fab'-SH a partir de células de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, BioTechnology 10:163-167, 1992). Según otro enfoque, los fragmentos F(ab')₂ pueden aislarse directamente a partir de un cultivo de células huésped recombinantes. Los fragmentos Fab y F(ab')₂ con semividua *in vivo* incrementada que comprende residuos de epítipo de unión de receptor de reciclaje se describen en la patente US nº 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo resultarán evidentes para el experto en la materia. En otras realizaciones, el anticuerpo de elección es un fragmento Fv de cadena sencilla (scFv). Ver el documento nº WO 93/16185 y patentes US nº 5.571.894 y nº 5.587.458. Fv y sFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos que no presentan regiones constantes; de esta manera, resultan adecuados para una unión no específica reducida durante la utilización *in vivo*. Pueden construirse proteínas de fusión sFv para rendir fusión de una proteína efectora en el extremo amino-terminal o carboxi-terminal de un sFv. Ver Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, supra. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo tal como se indica en la patente US nº 5.641.870, por ejemplo. Dichos fragmentos lineales de anticuerpo pueden ser mono-específicos o biespecíficos.

5. Anticuerpos biespecíficos

55 Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que presentan especificidades de unión para por lo menos dos epítopos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos ejemplares pueden unirse a dos epítopos diferentes de hepsina, PEM y/o el complejo hepsina:PEM tal como se indica en la presente memoria. Otros anticuerpos similares pueden combinarse con un sitio de unión en dichas entidades con un sitio de unión para otro polipéptido. Alternativamente, puede combinarse un brazo de anticuerpo con un brazo que se une a una molécula inductora en un leucocito, tal como una molécula de receptor de célula T (por ejemplo CD3) o receptores de Fc para IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16), de manera que se concentren y localicen los mecanismos de defensa celular en la célula expresante y/o de unión a hepsina y/o PEM. También pueden utilizarse anticuerpos biespecíficos para localizar agentes citotóxicos en células que expresan y/o se unen a hepsina, PEM y/o al complejo hepsina:PEM. Estos anticuerpos presentan un brazo de unión a polipéptido y un brazo que se une al agente citotóxico (por ejemplo saporina, anti-interferón-α, alcaloide vinca, cadena A de la ricina, metotrexato o isótopo radioactivo-hapteno). Pueden prepararse anticuerpos biespecíficos en forma de anticuerpos de longitud completa o de fragmentos de anticuerpo (por ejemplo anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

El documento nº WO 96/16673 describe un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/anti-Fc γ RIII y la patente US nº 5.837.234 da a conocer un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/anti-Fc γ RI. Se muestra un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/Fc α en el documento nº WO 98/02463. La patente US nº 5.821.337 enseña un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/anti-CD3.

Los métodos para preparar anticuerpos biespecíficos son conocidos de la técnica. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos parejas de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, en la que las dos cadenas presentan especificidades diferentes (Millstein *et al.*, Nature 305:537-539, 1983). Debido a la colección aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las que únicamente una presenta la estructura biespecífica correcta. La publicación de la molécula correcta, que habitualmente se lleva a cabo mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante complicada, y los rendimientos de producto son bajos. Se dan a conocer procedimientos similares en el documento nº WO 93/08829 y en Trauneker *et al.*, EMBO J. 10:3655-3659, 1991.

Según otro enfoque, se fusionan dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. Preferentemente, la fusión es con un dominio constante de cadena pesada de Ig, que comprende por lo menos parte de las regiones de bisagra, C_H2 y C_H3. Resulta preferente que la primera región constante de cadena pesada (C_H1) que contiene el sitio necesario para la unión de cadena ligera se encuentre presente en por lo menos una de las fusiones. Los ADN codificantes de las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Lo anterior proporciona una mayor flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos polipeptídicos en realizaciones en el caso de que proporciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas utilizadas en la construcción proporcionen el rendimiento óptimo del anticuerpo biespecífico deseado. Sin embargo, resulta posible insertar las secuencias codificantes de dos o de las tres cadenas polipeptídicas en un solo vector de expresión en el caso de que la expresión de por lo menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales resulte en rendimientos elevados o en el caso de que las proporciones no presenten ningún efecto significativo sobre el rendimiento de la combinación de cadenas deseada.

En una realización preferente de dicho enfoque, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo y una pareja de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se ha encontrado que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado respecto de combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en únicamente una mitad de la molécula biespecífica proporciona un modo fácil de separación. Este enfoque se da a conocer en el documento nº WO 94/04690. Para más información sobre la generación de anticuerpos biespecíficos ver, por ejemplo, Suresh *et al.*, Methods in Enzymology 121:210, 1986.

Según otro enfoque descrito en la patente US nº 5.731.168, la interfaz entre una pareja de moléculas de anticuerpo puede manipularse para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfaz preferente comprende por lo menos una parte del dominio C_H3. En este método, se sustituye una o más cadenas laterales pequeñas de aminoácidos de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo por cadenas laterales de mayor tamaño (por ejemplo de tirosina o de triptófano). Se crean "cavidades" compensadoras de tamaño igual o similar a la cadena o cadenas laterales grandes en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo mediante la sustitución de cadenas laterales grandes de aminoácidos por otras más pequeñas (por ejemplo de alanina o de treonina). Lo anterior proporciona un mecanismo para incrementar el rendimiento de heterodímero sobre otros productos finales no deseados, tales como homodímeros.

Entre los anticuerpos biespecíficos se incluyen anticuerpos entrecruzados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado puede acoplarse a avidina y el otro, a biotina. Dichos anticuerpos se ha propuesto, por ejemplo, que dirigen células del sistema inmunológico a células no deseadas (patente US nº 4.676.980) y para el tratamiento de la infección por VIH (documentos nº WO 91/00360 y nº WO 92/200373 y la patente nº EP 03089). Pueden prepararse anticuerpos heteroconjugados utilizando cualquier método de entrecruzamiento conveniente. Los agentes y técnicas de entrecruzamiento adecuados son bien conocidos de la técnica y se dan a conocer en la patente US nº 4.676.980, conjuntamente con varias técnicas de entrecruzamiento.

Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo también han sido descritas en la literatura. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando el enlace químico. Brennan *et al.*, Science 229:81, 1985, describe un procedimiento en el que se cortan proteolíticamente anticuerpos intactos a fin de generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente acomplejante ditiol, arsenito sódico para estabilizar los ditioles vecinos y evitar la formación de disulfuros intermoleculares. Los fragmentos Fab' generados seguidamente se convierten en derivados tionitrobenzoato (TNB). A continuación, uno de los derivados Fab'-TNB se reconvierte en el 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.

Los últimos avances han facilitado la recuperación directa de los fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que pueden acoplarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, J. Exp. Med. 175: 217-225, 1992, describe la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico F(ab')₂ totalmente humanizada. Cada fragmento Fab' se secretó separadamente de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de esta manera era capaz de unirse a células que sobreexpresaban el receptor de ErbB2 y células T humanas normales, así como de inducir la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos contra dianas de tumor mamario humano. También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpo biespecífico directamente a partir de un cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucinas. Kostelny *et al.*, J. Immunol. 148:1547-1553, 1992. Los péptidos de cremallera de leucinas de las proteínas Fos y Jun se unen a las partes Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra formando monómeros y después se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también puede utilizarse para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpos" descrita por Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448, 1993, ha proporcionado un mecanismo alternativo para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico. Los fragmentos comprenden un V_H conectado a un V_L mediante un conector que es excesivamente corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, se fuerza que los dominios V_H y V_L de un fragmento se emparejen con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando de esta manera dos sitios de unión a antígeno. También se ha informado de otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico mediante la utilización de dímeros de Fv de cadena sencilla (sFv). Ver Gruber *et al.*, J. Immunol. 152:5368, 1994.

Los anticuerpos con más de dos valencias se encuentran contemplados. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos trispecíficos. Tutt *et al.*, J. Immunol. 147:60, 1991.

25 6. Anticuerpos heteroconjugados

Los anticuerpos heteroconjugados también se encuentran comprendidos dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos de dos anticuerpos unidos covalentemente. Dichos anticuerpos se ha propuesto, por ejemplo, que dirigen células del sistema inmunológico a células no deseadas (patente US nº 4.676.980) y para el tratamiento de la infección por VIH (documentos nº WO 91/00360 y nº WO 92/200373 y la patente nº EP 03089). Se encuentra contemplado que los anticuerpos pueden prepararse *in vitro* utilizando métodos conocidos en la química sintética de proteínas, incluyendo aquellos que implican agentes entrecruzantes. Por ejemplo, pueden construirse inmunotoxinas utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o mediante la formación de un enlace tioéter. Entre los ejemplos de reactivos adecuados para este fin se incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y los dados a conocer en, por ejemplo, la patente US nº 4.676.980.

35 7. Anticuerpos multivalentes

Un anticuerpo multivalente puede internalizarse (y/o catabolizarse) más rápidamente 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 de una clase diferente de IgM) con tres o más sitios de unión a antígeno (por ejemplo anticuerpos tetraivalentes), que pueden producirse fácilmente mediante la expresión recombinante de un ácido nucleico codificante de las cadenas polipeptídicas del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión a antígeno. El dominio de dimerización preferente comprende (o consiste de) una región Fc o una región bisagra. En este escenario, el anticuerpo comprende una región Fc y tres o más sitios de unión a antígeno en posición aminoterminal respecto a la región Fc. El anticuerpo multivalente preferente comprende (o consiste de) en la presente memoria entre tres y aproximadamente ocho, aunque preferentemente cuatro sitios de unión a antígeno. El anticuerpo multivalente comprende por lo menos una cadena polipeptídica (y preferentemente dos cadenas polipeptídicas) en las que la cadena o cadenas polipeptídicas comprenden dos o más dominios variables. Por ejemplo, la cadena o cadenas polipeptídicas puede comprender VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc, en la que VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena polipeptídica de una región Fc, X1 y X2 representa un aminoácido o polipéptido, y n es 0 o 1. Por ejemplo, la cadena o cadenas polipeptídicas puede comprender: VH-CH1-conector flexible-VH-CH1-cadena de región Fc, o VH-CH1-VH-CH1-cadena de región Fc. El anticuerpo multivalente en la presente memoria preferentemente comprende además por lo menos dos (y preferentemente cuatro) polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. El anticuerpo multivalente en la presente memoria puede comprender, por ejemplo, entre aproximadamente dos y aproximadamente ocho polipéptidos de dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos de dominio variable de cadena ligera contemplados en la presente memoria comprenden un dominio variable de cadena ligera y, opcionalmente, comprenden además un dominio CL.

60 8. Ingeniería de función efectora

Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, por ejemplo para incrementar la citotoxicidad mediada por células dependiente de antígenos (ADCC) y/o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) del anticuerpo. Lo anterior puede conseguirse mediante la introducción de una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. Alternativa o adicionalmente, pueden introducirse uno

o más residuos de cisteína en la región Fc, permitiendo de esta manera la formación de enlaces disulfuro entre cadenas en dicha región. El anticuerpo homodimérico generado de esta manera puede presentar una capacidad de internalización mejorada y/o una eliminación celular mediada por el complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) incrementadas. Ver Caron *et al.*, J. Exp Med. 176:1191-1195, 1992, y Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922, 1992. También pueden prepararse anticuerpos homodiméricos con una actividad antitumoral incrementada utilizando entrecruzantes heterobifuncionales tal como se indica en Wolff *et al.*, Cancer Research 53:2560-2565, 1993. Alternativamente, puede manipularse un anticuerpo que presenta regiones Fc duales y puede presentar de esta manera una lisis del complemento y capacidades de ADCC incrementadas. Ver Stevenson *et al.*, Anti-Cancer Drug Design 3:219-230, 1989. Con el fin de incrementar la semivida en suero del anticuerpo, puede incorporarse un epítipo de unión a receptor de reciclaje en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo), tal como se indica en la patente US nº 5.739.277, por ejemplo. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "epítipo de unión de receptor de reciclaje" 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 incrementar la semivida en suero *in vivo* de la molécula de IgG.

9. Inmunoconjugados

La invención se refiere además a inmunoconjugados o conjugados de anticuerpo-fármaco (CAF) que comprenden un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico, tal como un agente quimioterapéutico, un fármaco, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (por ejemplo una toxina enzimáticamente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, o fragmentos de las mismas), o un isótopo radioactivo (es decir, un radioconjugado).

La utilización de conjugados de anticuerpo-fármaco para la administración local de agentes citotóxicos o citostáticos, es decir, fármacos para eliminar o inhibir las células tumorales en el tratamiento del cáncer (Syrgos y Epenetos, Anticancer Research 19:605-614, 1999; Niculescu-Duvaz y Springer, Adv. Drg. Del. Rev. 26:151-172, 1997; patente US nº 4.975.278) teóricamente permite la administración dirigida de la fracción farmacológica en tumores, y la acumulación intracelular en los mismos, en donde la administración sistémica de dichos agentes farmacológicos no conjugados puede resultar en niveles inaceptables de toxicidad para las células normales, además de las células tumorales que se busca eliminar (Baldwin *et al.*, Lancet (15 de marzo de 1986):603-05; Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en: Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, A. Pinchera *et al.*(eds.), páginas 475-506, 1985). De esta manera se busca la eficacia máxima con la mínima toxicidad. Se ha informado que tanto los anticuerpos policlonales como los anticuerpos monoclonales resultan útiles en estas estrategias (Rowland *et al.*, Cancer Immunol. Immunother. 21:183-87, 1986). Entre los fármacos utilizados en dichos métodos se incluyen la daunomicina, la doxorubicina, el metotrexato y la vindesina (Rowland *et al.*, supra, 1986). Entre las toxinas utilizadas en conjugados de anticuerpo-toxina se incluyen toxinas bacterianas tales como la toxina diftérica, toxinas vegetales tales como la ricina, toxinas de molécula pequeña tales como la geldanamicina (Mandler *et al.*, J. of the Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581, 2000; Mandler *et al.*, Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028, 2000; Mandler *et al.*, Bioconjugate Chem. 13:786-791, 2002), maitansinoides (patente nº EP 1391213; Liu *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623, 1996) y caliqueamicina (Lode *et al.*, Cancer Res. 58:2928, 1998; Hinman *et al.*, Cancer es. 53:3336-3342, 1993). Las toxinas pueden producir sus efectos citotóxicos y citostáticos mediante mecanismos entre los que se incluyen la unión a tubulinas, la unión al ADN o la inhibición de la topoisomerasa. Algunos fármacos citotóxicos tienden a ser inactivos o menos activos al conjugarse con anticuerpos grandes o ligandos de receptores de proteína.

ZEVALIN® (ibritumomab tiuxetán, Biogen/Idec) es un conjugado de anticuerpo-isótopo radioactivo compuesto de un anticuerpo monoclonal IgG1 kappa dirigido contra el antígeno CD20 observado sobre la superficie de los linfocitos B normales y malignos y los isótopos radioactivos ¹¹¹In o ⁹⁰Y unidos mediante un quelante de conector tiourea (Wiseman *et al.*, Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7):766-77, 2000; Wiseman *et al.*, Blood 99(12):4336-42, 2002; Witzig *et al.*, J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63, 2002; Witzig *et al.*, J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69, 2002). Aunque ZEVALIN presenta actividad contra el linfoma no de Hodgkin de células B (NHL), la administración resulta en citopenias severas y prolongadas en la mayoría de pacientes. MYLOTARG TM (gemtuzumab ozogamicina, Wyeth Pharmaceuticals), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto de un anticuerpo de CD33_hu unido a caliqueamicina, fue autorizado en 2000 para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda mediante inyección (Drugs of the Future 25(7):686, 2000; patentes US nº 4.970.198, nº 5.079.233, nº 5.585.089, nº 5.606.040, nº 5.693.762, nº 5.739.116, nº 5.767.285 y nº 5.773.001). Cantuzumab mertansina (Immunogen, Inc.), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto del anticuerpo de C242_hu unido mediante el conector disulfuro SPP a la fracción fármaco maitansinoide DM1, está avanzando a ensayos de fase II para el tratamiento de cánceres que expresan CanAg, tal como el de colon, pancreático, gástrico y otros. MLN-2704 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.), un conjugado de anticuerpo-fármaco compuesto del anticuerpo monoclonal de antígeno membranar específico antipróstata (AMEP) unido a la fracción fármaco maitansinoide DM1, se encuentra en desarrollo para el tratamiento potencial de los tumores de próstata. Los péptidos auristatina, la auristatina E (AE) y la monometil-lauristatina (MMAE), análogos sintéticos de la dolastatina, se conjugaron con los anticuerpos monoclonales quiméricos cBR96 (específicos de Lewis-Y en los carcinomas) y cAC10 (específicos de CD30 en las neoplasias hematológicas) (Doronina *et al.*, Nature Biotechnology 21(7):778-784, 2003) y se encuentran bajo desarrollo terapéutico.

Los agentes quimioterapéuticos que resultan útiles en la generación de dichos inmunocombinados han sido descritos anteriormente en la presente memoria. Entre las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden utilizarse se incluyen la cadena A diftérica, los fragmentos activos no ligantes de la toxina diftérica, la cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de la ricina, la cadena A de la abrina, la cadena A de la modeccina, la alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, las proteínas diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, la curcina, la crotina, el inhibidor de *Saponaria officinalis*, la gelonina, la mitogelina, la restrictocina, la fenomicina, la enomicina y los tricotecenos. Se encuentra disponible una diversidad de radionucleidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Entre los ejemplos se incluyen ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y y ^{186}Re . Los combinados del anticuerpo y agente citotóxico se preparan mediante la utilización de una diversidad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoi)hexanodiamina), derivados bis-diazonio (tales como bis-(p-diazonio-benzoi)etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina tal como se describe en Vitetta *et al.*, Science 238: 1098, 1987. El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentríaminapentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante ejemplar para la conjugación de nucleótidos radioactivos al anticuerpo. Ver el documento nº WO 94/11026.

Los combinados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, tales como caliqueamicina, maitansinoides, un tricoteceno y CC1065, y los derivados de dichas toxinas que presentan actividad de toxina también se encuentran contemplados en la presente memoria.

Maitansina y maitansinoides

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

Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de la tubulina. La maitansina fue aislada por primera vez del arbusto de África oriental *Maytenus serrata* (patente US nº 3.896.111). Posteriormente se descubrió que determinados microbios también producen maitansinoides, tales como maitansinol y ésteres de maitansinol C-3 (patente US nº 4.151.042). El maitansinol sintético y los derivados y análogos del mismo se dan a conocer en, por ejemplo, las patentes US nº 4.137.230, nº 4.248.870, nº 4.256.746, nº 4.260.608, nº 4.265.814, nº 4.29nº 4.757, nº 4.307.016, nº 4.308.268, nº 4.308.269, nº 4.309.428, nº 4.313.946, nº 4.315.929, nº 4.317.821, nº 4.322.348, nº 4.331.598, nº 4.361.650, nº 4.364.866, nº 4.424.219, nº 4.450.254, nº 4.362.663, y nº 4.371.533, las exposiciones de los cuales se incorporan expresamente en la presente memoria como referencia.

Conjugados de maitansinoide-anticuerpo

En un intento de mejorar su índice terapéutico, la maitansina y los maitansinoides se han combinado con anticuerpos que se unen específicamente a los antígenos de las células tumorales. Los inmunocombinados que contienen maitansinoides y su utilización terapéutica se dan a conocer en, por ejemplo, las patentes US nº 5.208.020, nº 5.416.064 y en la patente europea nº EP 0 425 235 B1, las exposiciones de las cuales se incorporan expresamente como referencia en la presente memoria. Liu *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623, 1996, describen inmunocombinados que comprenden un maitansinoide denominado DM1 unido al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra el cáncer colorrectal humano. Se encontró que el combinado era altamente citotóxico hacia las células de cáncer de colon en cultivo y mostró actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento tumoral *in vivo*. Chari *et al.*, Cancer Research 52:127-131, 1992, describen inmunocombinados en los que se combinó un maitansinoide mediante un conector disulfuro con el anticuerpo murino A7 ligante de un antígeno sobre las líneas celulares humanas de cáncer de colon o de otro anticuerpo monoclonal murino, TA.1, que se une HER-2/oncogén neu. Se sometió a ensayo *in vitro* la citotoxicidad del combinado de TA.1-maitansinoide en la línea celular de cáncer de mama humano SK-BR-3, que expresa 3×10^5 antígenos de superficie HER-2 en cada célula. El combinado de fármaco alcanzó un grado de citotoxicidad similar al del fármaco maitansinoide libre, que pudo incrementarse mediante el incremento del número de moléculas de maitansinoide por cada molécula de anticuerpo. El combinado de A7-maitansinoide mostró una baja citotoxicidad sistémica en el ratón.

Conjugados de anticuerpo-maitansinoide (inmunocombinados)

Se prepararon combinados de anticuerpo-maitansinoide mediante la unión química de un anticuerpo a una molécula de maitansinoide sin reducir significativamente la actividad biológica del anticuerpo o de la molécula de maitansinoide. Una media de 3 a 4 moléculas de maitansinoide combinadas en cada molécula de anticuerpo ha demostrado eficacia en incrementar la citotoxicidad de las células diana sin afectar negativamente a la función o solubilidad del anticuerpo, aunque incluso una molécula de toxina/anticuerpo se esperaría que incrementase la citotoxicidad en comparación con la utilización del anticuerpo desnudo. Los maitansinoides son bien conocidos de la técnica y pueden sintetizarse mediante técnicas conocidas o aislarse a partir de fuentes naturales. Se dan a conocer maitansinoides adecuados en, por ejemplo, la patente US nº 5.208.020 y en otras publicaciones de patente y no de patente a las que se ha hecho referencia anteriormente en la presente memoria. Los maitansinoides preferentes son

el maitansinol y los 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 unión conocidos de la técnica para la preparación de conjugados de anticuerpo-maitansinoide, incluyendo, por ejemplo, los dados a conocer en las patentes US nº 5.208.020 o EP nº 0 425 235 B1, y en Chari *et al.*, Cancer Research 52:127-131, 1992. Entre los grupos de unión se incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles a ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles frente a peptidasa o grupos lábiles frente a esterasa, tal como se da a conocer en las patentes anteriormente identificadas, siendo preferentes los grupos disulfuro y tioéter.

Pueden prepararse conjugados del anticuerpo y un maitansinoide utilizando una diversidad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio) (PSPD), ciclohexán-1-carboxilato de succinimidil-4-(N-maleimidometilo), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados bis-diazonio (tales como bis-(p-diazonio-benzoil)etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Entre los agentes de acoplamiento particularmente preferentes se incluyen propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditio) (PSPD) (Carlsson *et al.*, Biochem. J. 173:723-737, 1978) y pentanoato de N-succinimidil-4-(2-piridiltio) (PSP) para proporcionar enlace disulfuro.

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

Caliqueamicina

Otro inmunoconjugado de interés comprende un anticuerpo conjugado con una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de antibióticos de la caliqueamicina es capaz de producir roturas en el ADN de doble cadena a concentraciones subpicomolares. Para la preparación de conjugados de la familia de la caliqueamicina, ver las patentes US nº 5.712.374, nº 5.714.586, nº 5.739.116, nº 5.767.285, nº 5.770.701, nº 5.770.710, nº 5.773.001 y nº 5.877.296 (todas de American Cyanamid Company). Entre los análogos estructurales II de caliqueamicina que pueden utilizarse se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, γ_1 , α_2 , α_3 , N-acetil- γ_1 , PSAG y θ^1 1 (Hinman *et al.*, Cancer Research 53:3336-3342, 1993; Lode *et al.*, Cancer Research 58:2925-2928, 1998, y las patentes US anteriormente indicadas de American Cyanamid). Otro fármaco antitumoral con el que puede conjugarse el anticuerpo es QFA, que es un antifolato. Tanto caliqueamicina como QFA presentan sitios intracelulares de acción y no cruzan con facilidad la membrana plasmática. Por lo tanto, la incorporación celular de estos agentes mediante internalización mediada por anticuerpos incrementa en gran medida sus efectos citotóxicos.

Otros agentes citotóxicos

Entre otros agentes antitumorales que pueden conjugarse con los anticuerpos de la invención se incluyen BCNU, estreptozaicina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocidos colectivamente como complejo LL-E33288 descritos en las patentes US nº 5.053.394 y nº 5.770.710, así como las esperamicinas (patente US nº 5.877.296).

Entre las toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que pueden utilizarse se incluyen la cadena A diftérica, los fragmentos activos no ligantes de la toxina diftérica, la cadena A de la exotoxina (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena A de la ricina, la cadena A de la abrina, la cadena A de la modeccina, la alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, las proteínas diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, la curcina, la crotina, el inhibidor de *Saponaria officinalis*, la gelonina, la mitogelina, la restrictocina, la fenomicina, la enomicina y los tricotecenos. Ver, por ejemplo, el documento nº 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 ADN endonucleasa, tal como una desoxirribonucleasa; ADNasa).

Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radioactivo. Se encuentra disponible una diversidad de isótopos radioactivos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Entre los ejemplos se incluyen At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} e isótopos radioactivos de Lu. Al utilizar el conjugado para la detección, puede comprender un átomo radioactivo para estudios escintigráficos, por ejemplo Tc^{99m} o I^{123} , o un marcaje de espín para la obtención de imágenes de resonancia magnética nuclear (RMN)

(también conocido como obtención de imágenes de resonancia magnética, IRM), tales como yodo-123 nuevamente, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Los radiomarcajes u otros marcajes pueden incorporarse en el conjugado de maneras conocidas. Por ejemplo, el péptido puede biosintetizarse o puede sintetizarse mediante síntesis química de aminoácidos utilizando precursores de aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Pueden unirse marcajes tales como ^{99m}Tc o ^{123}I , ^{186}Re , ^{188}Re y ^{111}In mediante un residuo de cisteína en el péptido. Puede unirse itrio-90 mediante un residuo de lisina. El método IODOGEN (Fraker *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57, 1978) puede utilizarse para incorporar yodo-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) describe otros métodos en detalle.

Pueden prepararse conjugados del anticuerpo y agente citotóxico utilizando una diversidad de agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales, tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (PSPD), ciclohexán-1-carboxilato de succinimidil-4-(N-maleimidometilo), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como bis(p-azidobenzoi)hexanodiamina), derivados bis-diazonio (tales como bis-(p-diazonio-benzoi)etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, puede prepararse una inmunotoxina de ricina tal como se describe en Vitetta *et al.*, Science 238:1098, 1987. El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilentriaminapentaacético (MX-DTPA) marcado con carbono 14 es un agente quelante ejemplar para la conjugación de nucleótidos radioactivos al anticuerpo. Ver el documento nº WO 94/11026. El conector puede ser un "conector cortable" que facilite la liberación de un fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede utilizarse un conector lábil a ácidos, un conector sensible a peptidasas, un conector fotolábil, un conector dimetilo o un conector que contiene disulfuro (Chari *et al.*, Cancer Research 52:127-131, 1992; patente US nº 5.208.020).

Los compuestos de la invención contemplan expresamente, aunque sin limitarse a ellos, CAF preparada con reactivos entrecruzantes: 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), los cuales se encuentran disponibles comercialmente (por ejemplo de Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A). Ver las páginas 467 a 498, 2003- 2004 Applications Handbook and Catalog.

Preparación de conjugados de anticuerpo-fármaco

En los conjugados de anticuerpo-fármaco (CAF) de la invención, se conjuga un anticuerpo (Ab) con una o más fracciones fármaco (F), por ejemplo entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20 fracciones de fármaco por cada anticuerpo, mediante un conector (C). Los CAF de fórmula I pueden prepararse mediante varias rutas, utilizando reacciones, condiciones y reactivos de química orgánica conocidos por el experto en la materia, incluyendo: (1) la reacción de un grupo nucleofílico de un anticuerpo con un reactivo conector bivalente, formando Ab-C, mediante un enlace covalente, seguido de la reacción con una fracción fármaco F, y (2) la reacción de un grupo nucleofílico de una fracción fármaco con un reactivo conector bivalente para formar F-C, mediante un enlace covalente, seguido de la reacción con el grupo nucleofílico de un anticuerpo. Ab-(C-F)_p I

Entre los grupos nucleofílicos se incluyen, aunque sin limitación: (i) grupos de amina N-terminal, (ii) grupos de amina de cadena lateral, por ejemplo lisina, (iii) grupos de tiol de cadena lateral, por ejemplo cisteína, y (iv) grupos hidroxilo o amino de azúcar, en el caso de que el anticuerpo se encuentre glucosilado. Los grupos amina, tiol e hidroxilo son nucleofílicos y capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos en fracciones conectores y reactivos conectores, incluyendo: (i) ésteres activos, tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformatos y haluros de ácido, (ii) haluros de alquilo y bencilo, tales como haloacetamidas, (iii) grupos aldehído, cetona, carboxilo y maleimida. Determinados anticuerpos presentan disulfuros intercadena reducibles, es decir, puentes de cisteína. Los anticuerpos pueden convertirse en reactivos para la conjugación con reactivos conectores mediante tratamiento con un agente reductor, tal como DTT (ditiotreitól). De esta manera, cada puente de cisteína formará, en teoría, dos nucleófilos tiol reactivos. Pueden introducirse grupos nucleofílicos adicionales en los anticuerpos mediante la reacción de las lisinas con 2-iminotiolano (reactivo de Traut), resultando en la conversión de una amina en un tiol.

Los conjugados de anticuerpo-fármaco de la invención también pueden producirse mediante modificación del anticuerpo para introducir fracciones electrofílicas que pueden reaccionar con sustituyentes nucleofílicos en el reactivo conector o fármaco. Los azúcares de los anticuerpos glucosilados pueden oxidarse, por ejemplo con reactivos oxidantes peryodato, para formar grupos aldehído o cetona que pueden reaccionar con el grupo amina de reactivos conectores o fracciones de fármaco. Los grupos de base de Schiff imina resultantes pueden formar un enlace estable o pueden reducirse, por ejemplo con reactivos borohidruro, para formar enlaces amina estables. En una realización, la reacción de la parte carbohidrato de un anticuerpo glucosilado con galactosa oxidada o metaperyodato sódico puede rendir grupos carbonilo (aldehído y cetona) en la proteína que pueden reaccionar con grupos apropiados en el fármaco (Hermanson, Bioconjugate Techniques). En otra realización, las proteínas que

contienen residuos N-terminales de serina o treonina pueden reaccionar con meta-peryodato sódico, resultando en la producción de un aldehído en lugar del primer aminoácido (Geoghegan y Stroh, *Bioconjugate Chem.* 3:138-146, 1992; patente US nº 5.362.852). Dicho aldehído puede reaccionar con una fracción fármaco o nucleófilo conector.

5 De manera similar, entre los grupos nucleofílicos de una fracción fármaco se incluyen, aunque sin limitación: los grupos amina, tiol, hidroxilo, hidrazida, oxima, hidrazina, tiosemicarbazona, carboxilato de hidrazina y arilhidrazida, capaces de reaccionar para formar enlaces covalentes con grupos electrofílicos en fracciones conectoras y reactivos conectores, incluyendo: (i) ésteres activos, tales como ésteres de NHS, ésteres de HOBt, haloformatos y haluros de ácido, (ii) haluros de alquilo y bencilo, tales como haloacetamidas, (iii) grupos aldehído, cetona, carboxilo y maleimida.

10 Alternativamente, puede prepararse una proteína de fusión que comprende el anticuerpo y agente citotóxico, por ejemplo mediante técnicas recombinantes o síntesis peptídica. La longitud del ADN puede comprender regiones respectivas codificantes de las dos partes del conjugado, contiguas entre sí o separadas por una región codificante de un péptido conector que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

15 En todavía otra realización, el anticuerpo puede conjugarse con un "receptor" (tal como estreptavidina) para la utilización en el pre-direccionamiento tumoral, en el que el conjugado de anticuerpo-receptor se administra en el paciente, seguido de la eliminación del conjugado no unido de la circulación utilizando un agente eliminador, y seguido de la administración de un "ligando" (por ejemplo avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo un radionucleótido).

10. Inmunoliposomas

25 Los anticuerpos dados a conocer en la presente memoria también pueden formularse en forma de inmunoliposomas. Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta de diversos tipos de lípido, fosfolípido y/o surfactante que resulta útil para la administración de un fármaco en un mamífero. Los componentes del liposoma comúnmente se disponen en una formación de bicapa, similar a la disposición de los lípidos en las membranas biológicas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante métodos conocidos de la técnica, tales como los descritos en Epstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3688, 1985; Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4030, 1980; patentes US nº 4.485.045 y nº 4.544.545, y documento nº WO 97/38731, publicado el 23 de octubre de 1997. Se dan a conocer liposomas con un tiempo de circulación incrementado en la patente US nº 5.013.556.

35 Pueden generarse liposomas particularmente útiles mediante el método de evaporación de fase inversa con una composición de lípidos que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Se extraen los liposomas a través de filtros de tamaño de poro definido, rindiendo liposomas con el diámetro deseado. Pueden conjugarse fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención con los liposomas tal como se indica en Martin *et al.*, *J. Biol. Chem.* 257:286-288, 1982, mediante una reacción de intercambio de disulfuros. Un agente quimioterapéutico se encuentra contenido opcionalmente dentro del liposoma. Ver Gabizon *et al.*, *J. National Cancer Inst.* 81(19):1484, 1989.

B. Oligopéptidos de unión

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

65 A este respecto, la expresión de bacteriófagos (fagos) es una técnica bien conocida que permite cribar grandes bibliotecas de oligopéptidos con el fin de identificar el elemento o elementos de dichas bibliotecas que son capaces

de unirse específicamente a una diana. La expresión fágica es una técnica mediante la que se expresan polipéptidos variantes como proteínas de fusión con la proteína de cubierta sobre la superficie de partículas de bacteriófago (Scott J.K. y Smith G.P., *Science* 249: 386, 1990). La utilidad de la expresión fágica reside en el hecho de que las bibliotecas grandes de variantes de proteína selectivamente aleatorizadas (o ADNc clonados aleatoriamente) pueden separarse rápida y eficientemente con aquellas secuencias que se unen a una molécula diana con una afinidad elevada. La expresión de bibliotecas de péptido (Cwirla S.E. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6378, 1990) o proteína (Lowman H.B. *et al.*, *Biochemistry* 30:10832, 1991; Clackson T. *et al.*, *Nature* 352:624, 1991; Marks J.D. *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581, 1991; Kang A.S. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:8363, 1991) sobre fagos se ha utilizado para cribar millones de polipéptidos u oligopéptidos para los que presentan propiedades de unión específica (Smith G. P., *Current Opin. Biotechnol.* 2:668, 1991). La separación de bibliotecas fágicas de mutantes aleatorios requiere una estrategia para construir y propagar un gran número de variantes, un procedimiento para la purificación por afinidad utilizando el receptor de la diana, y medios para evaluar los resultados de los enriquecimientos de unión. Patentes US nº 5.223.409, nº 5.403.484, nº 5.571.689 y nº 5.663.143.

Aunque la mayoría de métodos de expresión fágica han utilizado fagos filamentosos, también se conocen sistema de expresión de fago lambda (documento nº WO 95/34683, patente US nº 5.627.024), sistemas de expresión en el fago T4 (Ren *et al.*, *Gene* 215: 439, 1998; Zhu *et al.*, *Cancer Research* 58(15): 3209-3214, 1998; Jiang *et al.*, *Infection & Immunity* 65(11): 4770-4777, 1997; Ren *et al.*, *Gene* 195(2):303-311, 1997; Ren, *Protein Sci.* 5: 1833, 1996; Efimov *et al.*, *Virus Genes* 10: 173, 1995) y sistema de expresión en el fago T7 (Smith y Scott, *Methods in Enzymology* 217: 228-257, 1993; patente US nº 5.766.905).

Actualmente se han desarrollado muchas otras mejoras y variaciones del concepto básico de expresión fágica. Estas mejoras incrementan la capacidad de los sistemas de expresión de cribar las bibliotecas de péptidos para la unión a moléculas diana seleccionados y a expresar proteínas funcionales con el potencial de cribar dichas proteínas para propiedades deseadas. Se han desarrollado dispositivos de reacción combinatoriales para reacciones de expresión fágica (documento nº WO 98/14277) y se han utilizado bibliotecas de expresión fágica para analizar y controlar las interacciones bimoleculares (documentos nº WO 98/20169 y nº WO 98/20159) y las propiedades de los péptidos helicoidales restringidos (documento nº WO 98/20036). El documento nº WO 97/35196 describe un método de aislamiento de un ligando de afinidad en el que una biblioteca de expresión fágica se pone en contacto con una solución en la que el ligando se une a una molécula diana y una segunda solución en la que el ligando de afinidad no se une a la molécula diana, con el fin de aislar selectivamente ligandos de unión. El documento nº WO 97/46251 describe un método de selección de fagos (biopanning) de una biblioteca de expresión fágica aleatoria con un anticuerpo purificado por afinidad, seguido del aislamiento del fago de unión y un procedimiento de micropanning con pocillos de microplaca para aislar el fago de unión de alta afinidad. También se ha informado de la utilización de la proteína A de *Staphylococcus aureus* como etiqueta de afinidad (Li *et al.*, *Mol Biotech.* 9:187, 1998). El documento nº WO 97/47314 describe la utilización de bibliotecas sustractivas de sustratos para distinguir especificidades enzimáticas utilizando una biblioteca combinatorial que puede ser una biblioteca de expresión fágica. Un método para seleccionar los enzimas adecuados para la utilización en detergentes utilizando la expresión fágica se describe en el documento nº WO 97/09446. Se describen métodos adicionales de selección de proteínas de unión específica en las patentes US nº 5.498.538, nº 5.432.018 y documento nº WO 98/15833.

Los métodos para generar bibliotecas de péptidos y cribar estas bibliotecas también se dan a conocer en las patentes US nº nº nº 5.723.286, nº 5.432.018, nº 5.580.717, nº 5.427.908, nº 5.498.530, nº 5.770.434, nº 5.734.018, nº 5.698.426, nº 5.763.192 y nº 5.723.323.

C. Moléculas de unión pequeñas

Los moléculas de unión pequeñas preferentemente son moléculas orgánicas diferentes de oligopéptidos o anticuerpos tal como se definen en la presente memoria, que se unen, preferentemente de manera específica, a hepsina, PEM y/o al complejo hepsina:PEM tal como se indica en la presente memoria. Las moléculas orgánicas de unión pequeñas pueden identificarse y sintetizarse químicamente utilizando metodología conocida (ver, por ejemplo, las publicaciones de patente PCT nº WO 00/00823 y nº WO 00/39585). Las moléculas orgánicas de unión pequeñas habitualmente presentan un tamaño inferior a aproximadamente 2.000 daltons, alternativamente inferior a aproximadamente 1.500, 750, 500, 250 o 200 daltons, en las que dichas moléculas orgánicas pequeñas que son capaces de unión, preferentemente de manera específica, a una diana tal como se indica en la presente memoria pueden identificarse sin necesidad de experimentación indebida utilizando técnicas bien conocidas. A este respecto se indica que las técnicas de cribado de bibliotecas de moléculas orgánicas pequeñas para moléculas que son capaces de unirse a una diana son bien conocidas de la técnica (ver, por ejemplo, las publicaciones de patente PCT nº WO 00/00823 y nº WO 00/39585). Las moléculas orgánicas de unión pequeñas pueden ser, por ejemplo, aldehídos, cetonas, oximas, hidrazonas, semicarbazonas, carbazidas, aminas primarias, aminas secundarias, aminas terciarias, hidrazinas N-sustituidas, hidrazidas, alcoholes, éteres, tioles, tioéteres, disulfuros, ácidos carboxílicos, ésteres, amidas, ureas, carbamatos, carbonatos, cetales, tiocetales, acetales, tioacetales, haluros de arilo, sulfonatos de arilo, haluros de alquilo, sulfonatos de alquilo, compuestos aromáticos, compuestos heterocíclicos, anilinas, alquenos, alquinos, dioles, aminoalcoholes, oxazolidinas, oxazolininas, tiazolidinas, tiazolininas, enaminas, sulfonamidas, epóxidos, aziridinas, isocianatos, cloruros de sulfonilo, compuestos diazo, cloruros de ácido o similares.

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

Las técnicas para generar anticuerpos, oligopéptidos y moléculas pequeñas de la invención han sido descritas anteriormente. Pueden seleccionarse adicionalmente anticuerpos, oligopéptidos u otras moléculas pequeñas con determinadas características biológicas, según se desee.

Los efectos inhibidores de un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula pequeña de la invención pueden evaluarse mediante métodos conocidos de la técnica, por ejemplo utilizando células que expresan hepsina y/o pro-PEM, endógenamente o tras la transfección con el gen o genes respectivos. Por ejemplo, pueden tratarse líneas celulares tumorales apropiadas, y células transfectadas con hepsina y/o pro-polipéptido PEM con un anticuerpo monoclonal, oligopéptido u otra molécula pequeña de la invención a diversas concentraciones durante unos cuantos días (por ejemplo 2 a 7) y analizarse para la actividad o actividades biológicas que es conocido que están asociadas a la activación de PEM, incluyendo las actividades biológicas evaluadas según los Ejemplos, posteriormente. El anticuerpo, oligopéptido de unión o molécula orgánica de unión pequeña inhibirá la actividad de una célula tumoral expresante de hepsina y/o PM *in vitro* o *in vivo* en aproximadamente 25% a 100% en comparación con la célula tumoral no tratada, más preferentemente en aproximadamente 30% a 100%, y todavía más preferentemente en aproximadamente 50% a 100% o 70% a 100%, en una realización, a una concentración de anticuerpo de entre aproximadamente 0,5 y 30 µg/ml. La inhibición de la actividad puede medirse a una concentración de anticuerpo de entre aproximadamente 0,5 y 30 µg/ml o aproximadamente entre 0,5 nM y 200 nM en cultivo celular u otro sistema experimental adecuado, en el que la inhibición de la actividad se determina 1 a 10 días después de la exposición de las células tumorales al anticuerpo. El anticuerpo es inhibidor *in vivo* en el caso de que la administración del anticuerpo a una dosis de entre aproximadamente 1 µg/kg y aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal resulte en la reducción del tamaño tumoral, la reducción de la invasividad de las células tumorales, etc. en un periodo de entre aproximadamente 5 días y 3 meses desde la primera administración del anticuerpo, preferentemente en un periodo de entre aproximadamente 5 y 30 días.

Para cribar para anticuerpos, oligopéptidos u otras moléculas orgánicas pequeñas que se unen a un epítipo en una diana de interés, puede llevarse a cabo un ensayo rutinario de bloqueo cruzado, tal como el descrito en Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane, 1988. Dicho ensayo puede determinarse para determinar si un anticuerpo de ensayo, oligopéptido u otra molécula orgánica pequeña se une al mismo sitio o epítipo que un anticuerpo conocido. Alternativamente, o adicionalmente, puede llevarse a cabo el mapeado de los epítipos mediante métodos conocidos de la técnica. Por ejemplo, la secuencia del anticuerpo puede mutagenizarse, tal como mediante escaneo de alaninas, con el fin de identificar los residuos de contacto. El anticuerpo mutante se somete a ensayo inicialmente para la unión al anticuerpo policlonal para garantizar el pliegue correcto. En un método diferente, pueden utilizarse péptidos correspondientes a regiones diferentes de un polipéptido en ensayos competitivos con los anticuerpos de ensayo o con un anticuerpo de ensayo y un anticuerpo con un epítipo caracterizado o conocido.

E. Terapia de profármacos mediada por enzima dependiente de anticuerpos (TPEDA)

Los anticuerpos de la presente invención también pueden utilizarse en TPEDA mediante conjugación del anticuerpo con un enzima activador de profármaco que convierte un profármaco (por ejemplo un agente quimioterapéutico peptídico, ver el documento nº WO 81/01145) en un fármaco anticáncer activo. Ver, por ejemplo, el documento nº WO 88/07378 y la patente US nº 4.975.278.

El componente enzima del inmunoc conjugado útil para TPEDA incluye cualquier enzima capaz de actuar sobre un profármaco de manera que lo convierta en su forma más activa, citotóxica.

Entre los enzimas que resultan útiles en el método de la presente invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, la fosfatasa alcalina, útil para convertir los profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; la arilsulfatasa, útil para convertir los profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; la citosina desamidasa, útil para convertir la 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco anticáncer, 5-fluorouracilo; proteasa, tales como la proteasa de Serratia, la termolisina, la subtilisina, las carboxipeptidasas y las catepsinas (tales como las catepsinas B y L), que resultan útiles para convertir los profármacos que contienen péptido en fármacos libres; las D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir los profármacos que contienen sustituyentes de D-aminoácido; los enzimas de corte de carbohidratos, tales como la β-galactosidasa y la neuramidasa, útiles para convertir los profármacos glucosilados en fármacos libres; la β-lactamasa, útil para convertir los fármacos derivatizados con β-lactamos en fármacos libres, y las penicilina amidasas, tales como la penicilina V amidasa o la penicilina G amidasa, útiles para convertir los fármacos derivados en sus nitrógenos de amina con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Alternativamente, pueden utilizarse anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la técnica como "abzimas", para convertir los profármacos de la invención en fármacos activos libres (ver, por ejemplo, Massey, Nature 328:457-458, 1987). Los conjugados de anticuerpo-abzima pueden prepararse tal como se indica en la presente memoria para la administración del abzima en una población de células tumorales.

Los enzimas de la presente invención pueden unirse covalentemente a los anticuerpos mediante técnicas bien conocidas, tales como la utilización de los reactivos entrecruzantes heterobifuncionales comentados anteriormente.

Alternativamente, pueden construirse proteínas de fusión que comprenden por lo menos la región de unión a antígeno de un anticuerpo de la invención unido a por lo menos una parte funcionalmente activa de un enzima de la invención, utilizando técnicas de ADN recombinante bien conocidas de la técnica (ver, por ejemplo, Neuberger *et al.*, Nature 312:604-608, 1984).

5

F. Variantes de anticuerpo

Además de los anticuerpos indicados en la presente memoria, se encuentra contemplada la preparación de variantes de anticuerpo. Pueden prepararse variantes de anticuerpo mediante la introducción de cambios de nucleótido apropiados en el ADN codificante y/o mediante la síntesis del anticuerpo deseado. El experto en la materia apreciará que los cambios de aminoácidos pueden alterar procesos post-traduccionales del anticuerpo, tales como la modificación del número o posición de los sitios de glucosilación o la alteración de las características de anclaje a membrana.

Pueden realizarse variaciones en los anticuerpos indicados en la presente memoria, por ejemplo utilizando cualquiera de las técnicas y directrices para mutaciones conservadoras y no conservadoras indicadas en, por ejemplo, la patente US nº 5.364.934. Las variaciones pueden ser una sustitución, una delección o una inserción de uno o más codones codificantes del anticuerpo que resultan en un cambio en la secuencia de aminoácidos en comparación con el anticuerpo o polipéptido de secuencia nativa. Opcionalmente, la variación es mediante sustitución de por lo menos un aminoácido por cualquier otro aminoácido en uno o más de los dominios del anticuerpo. Puede encontrarse una guía para determinar qué residuo aminoácido puede insertarse, sustituirse o deleccionarse sin afectar negativamente la actividad deseada, mediante la comparación de la secuencia del anticuerpo con la de moléculas de proteína conocidas homólogas y minimizando el número de cambios en la secuencia de aminoácidos realizado en las regiones de homología elevada. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser el resultado de sustituir un aminoácido por otro aminoácido que presenta propiedades estructurales y/o químicas similares, tal como la sustitución de una leucina por una serina, es decir, sustituciones de aminoácidos conservadoras. Las inserciones o delecciones opcionalmente pueden ser del intervalo de entre aproximadamente 1 y 5 aminoácidos. La variación permitida puede determinarse realizando sistemáticamente inserciones, delecciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia y sometiendo a ensayo las variantes resultantes para la actividad mostrada por la secuencia parental.

En la presente memoria se proporcionan fragmentos de anticuerpo y de polipéptido. Dichos fragmentos pueden encontrarse truncados en el extremo N-terminal o C-terminal, o pueden no presentar residuos internos, por ejemplo en comparación con un anticuerpo o proteína nativo de longitud completa. Determinados fragmentos no presentan residuos aminoácidos que sean esenciales para una actividad biológica deseada del anticuerpo o polipéptido.

Pueden prepararse fragmentos de anticuerpo y de polipéptido mediante cualquiera de las técnicas convencionales. Los fragmentos de péptido deseados pueden sintetizarse químicamente. Un enfoque alternativo implica generar fragmentos de anticuerpo o polipéptido mediante digestión enzimática, por ejemplo mediante tratamiento de la proteína con un enzima que es conocido que corta las proteínas en sitios definidos por residuos aminoácidos particulares, o mediante digestión del ADN con enzimas de restricción adecuados y aislando el fragmento deseado. Todavía otra técnica adecuada implica aislar y amplificar un fragmento de ADN codificante de un fragmento de anticuerpo o polipéptido deseado, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos que definen los extremos deseados del fragmento de ADN se utilizan en los cebadores 5' y 3' en la PCR. Preferentemente, los fragmentos de anticuerpo y de polipéptido comparten por lo menos una actividad biológica y/o inmunológica con el anticuerpo o polipéptido nativo dado a conocer en la presente memoria.

En realizaciones particulares, se muestran sustituciones conservadoras en la Tabla, posteriormente, bajo el título de sustituciones preferentes. En el caso de que dichas sustituciones resulten en un cambio en la actividad biológica, se introducen cambios más sustanciales, denominados sustituciones ejemplares en dicha tabla, o tal como se indica adicionalmente después en referencia a las clases de aminoácidos, y se criban los productos.

Residuo original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferentes
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucine; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg

Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Se llevan a cabo modificaciones sustanciales de la función o de la identidad inmunológica del anticuerpo o polipéptido mediante la selección de sustituciones que difieren significativamente su efecto sobre el mantenimiento de: (a) la estructura del esqueleto polipeptídico en el área de la sustitución, por ejemplo en forma de hoja o de conformación de hélice, (b) la carga o la hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los aminoácidos pueden agruparse según las similitudes de las propiedades de sus cadenas laterales (en A.L. Lehninger, Biochemistry, segunda ed., páginas 73 a 75, Worth Publishers, New York, 1975):

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

Alternativamente, los residuos naturales pueden dividirse en grupos basándose en sus propiedades de cadena lateral comunes:

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

Las sustituciones no conservadoras implican intercambiar un elemento de una de dichas clases por uno de otra clase. Dichos residuos sustituidos también pueden introducirse en los sitios de sustitución conservadora o, más preferentemente, en los sitios (no conservados) restantes.

Pueden llevarse a cabo variaciones utilizando métodos conocidos de la técnica, tales como la mutagénesis mediada por oligonucleótidos (dirigida a sitio), el escaneo de alaninas y la mutagénesis por PCR. La mutagénesis dirigida a sitio [Carter *et al.*, Nucl. Acids Res. 13:4331, 1986; Zoller *et al.*, Nucl. Acids Res. 10:6487, 1987; la mutagénesis por inserción de casete (Wells *et al.*, Gene 34:315, 1985), la mutagénesis por selección de restricción (Wells *et al.*, Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415, 1986) u otras técnicas conocidas pueden llevarse a cabo con ADN clonado para producir el ADN de variante de anticuerpo o polipéptido.

El análisis por escaneo de aminoácidos también puede utilizarse para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua. Entre los aminoácidos de escaneo preferentes están los aminoácidos neutros relativamente pequeños. Entre dichos aminoácidos se incluyen la alanina, la glicina, la serina y la cisteína. La alanina es típicamente un aminoácido de escaneo preferente en dicho grupo debido a que elimina la cadena lateral más allá del carbono beta y es menos probable que altere la conformación de cadena principal de la variante (Cunningham y Wells, Science 244:1081-1085, 1989). La alanina también resulta típicamente preferente debido a que es el aminoácido más común. Además, se encuentra frecuentemente en posiciones tanto enterradas como expuestas (Creighton, The Proteins, W.H. Freeman & Co., N.Y.; Chothia, J. Mol. Biol. 150:1, 1976). En el caso de que la sustitución de alaninas no rinda cantidades adecuadas de variante, puede utilizarse un aminoácido isotérico.

También puede sustituirse cualquier residuo cisteína no implicado en el mantenimiento de la conformación correcta del anticuerpo o polipéptido, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar entrecruzamientos aberrantes. A la inversa, pueden añadirse uno o más enlaces de cisteína al anticuerpo o polipéptido para mejorar su estabilidad (particularmente en el caso de que el anticuerpo sea un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fv).

Un tipo particularmente preferente de variante por sustitución implica sustituir uno o más residuos de región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la variante o variantes resultantes seleccionadas para el desarrollo adicional presentarán propiedades biológicas mejoradas en comparación con el anticuerpo parental a partir del cual se generan. Una manera conveniente de generar dichas variantes por sustitución implica la maduración de afinidad utilizando la expresión fágica. Brevemente, se mutan varios sitios de región hipervariable (por ejemplo 6 o 7 sitios) con el fin de generar todas las sustituciones de amino posibles en cada sitio. Las variantes de anticuerpo generadas de esta manera se expresan de una manera monovalente a partir de partículas de fago filamentoso en forma de fusiones con producto del gen III

de M13 empaquetado dentro de cada partícula. Las variantes expresadas en fagos seguidamente se criban para su actividad biológica (por ejemplo la afinidad de unión), tal como se da a conocer en la presente memoria. Con el fin de identificar los sitios de región hipervariable candidatos para la modificación, puede llevarse a cabo la mutagénesis por escaneo de alaninas a fin de identificar los residuos de la región hipervariable que contribuyen significativamente a la unión de antígenos. Alternativamente, o adicionalmente, puede resultar beneficioso analizar una estructura cristalina de un complejo de antígeno-anticuerpo para identificar los puntos de contacto entre el anticuerpo y el polipéptido antígeno. Dichos residuos de contacto y residuos vecinos son candidatos para la sustitución según técnicas elaboradas en la presente memoria. Una vez se han generado dichas variantes, el panel de variantes se somete a cribado tal como se indica en la presente memoria y los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes pueden seleccionarse para el desarrollo posterior.

Las moléculas de ácidos nucleicos codificantes de las variantes de secuencia de aminoácidos del anticuerpo se preparan mediante una diversidad de métodos conocidos de la técnica. Entre estos métodos se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, el aislamiento a partir de una fuente natural (en el caso de variantes de secuencia de aminoácidos naturales) o la preparación mediante mutagénesis mediada por oligonucleótios (o dirigida a sitio), la mutagénesis por PCR y la mutagénesis por inserción de casete de una variante preparada anteriormente o de una versión no variante del anticuerpo.

G. Modificaciones de anticuerpos y polipéptidos

Las modificaciones covalentes de los anticuerpos y polipéptidos se encuentran comprendidos dentro del alcance de la presente invención. Un tipo de modificación covalente incluye hacer reaccionar residuos aminoácidos diana de un anticuerpo o polipéptido con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos N-terminales o C-terminales del anticuerpo o polipéptido. La derivatización con agentes bifuncionales resulta útil, por ejemplo, para entrecruzar un anticuerpo o polipéptido con una matriz de soporte o superficie insoluble en agua en el método de purificación de anticuerpos, o viceversa. Entre los agentes entrecruzantes utilizados comúnmente se 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.

Entre otras modificaciones se incluyen la desamidación de residuos glutaminilo y asparaginilo con los residuos glutamilo y aspartilo correspondientes, respectivamente, la hidroxilación de la prolina y la lisina, la fosforilación de los grupos hidroxilo de los residuos de 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, páginas 79 a 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 o polipéptido comprendido dentro del alcance de la presente invención comprende alterar el patrón nativo de glucosilación del anticuerpo o polipéptido. La expresión "alterar el patrón nativo de glucosilación" pretende referirse, para los fines de la presente memoria, a delecionar una o más fracciones carbohidrato presentes en el anticuerpo o polipéptido de secuencia nativa (eliminando el sitio de glucosilación subyacente o delecionando la glucosilación por medios químicos y/o enzimáticos) y/o añadir uno o más sitios de glucosilación que no se encuentran presentes en el anticuerpo o polipéptido de secuencia nativa. Además, la expresión incluye cambios cualitativos en la glucosilación de las proteínas nativas, implicando un cambio en la naturaleza y proporciones de las diversas fracciones carbohidrato presentes.

La glucosilación de los anticuerpos y otros polipéptidos típicamente se encuentra ligada a N o ligada a O. La expresión "ligada a N" se refiere a la unión del grupo carbohidrato a la cadena lateral de un residuo asparagina. Las secuencias de tripéptido asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática del grupo carbohidrato a la cadena lateral de la asparagina. De esta manera, la presencia de cualquier de dichas secuencias de tripéptido en un polipéptido crea un sitio potencial de glucosilación. La glucosilación ligada a O se refiere a la unión de unos de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un ácido hidroxiamino, más comúnmente serina o treonina, aunque también puede utilizarse la 5-hidroxiprolina o la 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glucosilación al anticuerpo o al polipéptido se consigue convenientemente mediante la alteración de la secuencia de aminoácidos de manera que contenga una o más de las secuencias de tripéptido anteriormente indicadas (para los sitios de glucosilación ligados a N). La alteración también puede llevarse a cabo mediante la adición o la sustitución de uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo o polipéptido original (para los sitios de glucosilación ligados a O). La secuencia de aminoácidos del anticuerpo o polipéptido puede alterarse opcionalmente mediante cambios al nivel del ADN, en particular mediante la mutación del ADN codificante del anticuerpo o polipéptido en bases preseleccionadas de manera que se generan codones que se traducirán en los aminoácidos deseados.

Otro medio para incrementar el número de fracciones carbohidrato en el anticuerpo o polipéptido es mediante acoplamiento químico o enzimático de glucósidos en el polipéptido. Dichos métodos se encuentran descritos en la técnica, por ejemplo en el documento n° WO 87/05330, publicado el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., páginas 259 a 306, 1981.

La eliminación de las fracciones carbohidrato presentes en el anticuerpo o en el polipéptido puede llevarse a cabo química o enzimáticamente o mediante sustitución por mutación de los codones codificantes de los residuos aminoácidos que sirven como dianas para la glucosilación. Las técnicas de desglucosilación química son conocidas de la técnica y se describen en, por ejemplo, Hakumuddin *et al.*, Arch. Biochem. Biophys. 259:52, 1987, y en Edge *et al.*, Anal. Biochem. 118:131, 1981. El corte enzimático de las fracciones carbohidrato en los polipéptidos puede llevarse a cabo mediante la utilización de una diversidad de endoglucosidasas y exoglucosidasas tal como describen Thotakura *et al.*, Meth. Enzymol. 138:350, 1987.

Otro tipo de modificación covalente del anticuerpo o polipéptido comprende unir el anticuerpo o polipéptido a uno de entre una diversidad de polímeros no proteicos, por ejemplo polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la manera indicada en las patentes US n° 4.640.835, n° 4.496.689, n° 4.301.144, n° 4.670.417, n° 4.791.192 o n° 4.179.337. El anticuerpo o polipéptido también puede atraparse en microcápsulas preparadas mediante, por ejemplo, técnicas de coacervado o mediante polimerización interfacial, por ejemplo microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración coloidal de fármacos (por ejemplo liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se dan a conocer en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16a edición, Osol A., editor, 1980.

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

En una realización, dicha molécula quimérica comprende una fusión del anticuerpo o polipéptido con un polipéptido de etiqueta que proporciona un epítipo al que puede unirse selectivamente un anticuerpo anti-etiqueta. La etiqueta epítipo generalmente se sitúa en el extremo amino- o carboxilo-terminal del anticuerpo o polipéptido. La presencia de dichas formas etiquetadas con epítipo del anticuerpo o polipéptido puede detectarse utilizando un anticuerpo contra el polipéptido de etiqueta. Además, la provisión de la etiqueta epítipo permite que el anticuerpo o polipéptido se purifique fácilmente mediante purificación de afinidad utilizando un anticuerpo anti-etiqueta u otro tipo de matriz de afinidad que se une a la etiqueta epítipo. Diversos polipéptidos de etiqueta y sus anticuerpos respectivos son conocidos de la técnica. Entre los ejemplos se incluyen las etiquetas 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.*, Mol. Cell. Biol. 8:2159-2165, 1988); la etiqueta c-myc y los anticuerpos del mismo 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 (Evan *et al.*, Molecular and Cellular Biology 5:3610-3616, 1985) y la etiqueta glucoproteína D (gD) del virus del herpes simple y su anticuerpo (Paborsky *et al.*, Protein Engineering 3(6):547-553, 1990). Entre otros polipéptidos de etiqueta se incluyen el péptido Flag (Hopp *et al.*, BioTechnology 6:1204-1210, 1988), el péptido epítipo KT3 (Martin *et al.*, Science 255:192-194, 1992), un péptido epítipo de α -tubulina (Skinner *et al.*, J. Biol. Chem. 266:15163-15166, 1991) y la etiqueta péptido proteína del gen 10 de T7 (Lutz-Freyermuth *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6393-6397, 1990).

En una realización alternativa, la molécula quimérica puede comprender una fusión del anticuerpo o polipéptido con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula quimérica (también denominada "inmuno adhesina"), dicha fusión podría ser la región Fc de una molécula de IgG. Entre las fusiones de Ig preferentemente se incluyen la sustitución de una forma soluble (con delección o inactivación del dominio transmembrana) de un anticuerpo o polipéptido en lugar de por lo menos una región variable dentro de una molécula de Ig. En una realización particularmente preferente, la fusión de inmunoglobulina incluye la bisagra, CH₂ y CH₃, o la bisagra y las regiones CH₁, CH₂ y CH₃ de una molécula de IgG1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulina ver también la patente US n° 5.428.130, publicada el 27 de junio de 1995.

H. Preparación de anticuerpos y polipéptidos

La descripción posteriormente se refiere principalmente a la producción de anticuerpos y polipéptidos mediante el cultivo de células transformadas o transfectadas con un vector que contiene ácidos nucleicos codificantes de anticuerpos y de polipéptidos. Evidentemente se encuentra contemplado que métodos alternativos, que son bien conocidos de la técnica, puedan utilizarse para preparar anticuerpos y polipéptidos. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos apropiada, o partes de la misma, pueden producirse mediante síntesis peptídica directa utilizando técnicas de fase sólida (ver, por ejemplo, Stewart *et al.*, Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA, 1969; Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2154, 1963). La síntesis *in vitro* de proteínas puede llevarse a cabo utilizando técnicas manuales o mediante automatización. La síntesis automatizada puede llevarse a cabo, por ejemplo, utilizando un sintetizador de péptidos de Applied Biosystems (Foster City, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Diversas partes del anticuerpo o polipéptido pueden sintetizarse químicamente de manera separada y combinarse utilizando métodos químicos o enzimáticos para producir el anticuerpo o polipéptido deseado.

1. Aislamiento de ADN codificante de anticuerpos o polipéptidos

El ADN codificante del anticuerpo o polipéptido puede obtenerse de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido que se cree que presenta el ARNm de anticuerpo o polipéptido y que lo expresa a un nivel detectable. De acuerdo con lo anterior, el ADN humano de anticuerpo o polipéptido puede obtenerse convenientemente de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido humano. El gen codificante de anticuerpo o polipéptido también puede obtenerse de una biblioteca genómica o mediante procedimientos sintéticos conocidos (por ejemplo síntesis automatizada de ácidos nucleicos).

Las bibliotecas pueden cribarse con sondas (tales como oligonucleótidos de por lo menos aproximadamente 20 a 80 bases) diseñadas para identificar el gen de interés o la proteína codificada por el mismo. El cribado de la biblioteca de ADNc o genómica con la sonda seleccionada puede llevarse a cabo utilizando procedimientos estándares, tales como las descritas en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Un medio alternativo para aislar el gen codificante del anticuerpo o polipéptido es utilizar la metodología de PCR (Sambrook *et al.*, *supra*; Dieffenbach *et al.*, PCR Primer: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, 1995).

Las técnicas para cribar una biblioteca de ADNc son bien conocidas de la técnica. Las secuencias oligonucleótidas seleccionadas como sondas deberían ser de suficiente longitud y suficientemente inequívocas para minimizar los falsos positivos. El oligonucleótido preferentemente se marca de manera que pueda detectarse con la hibridación con ADN en la biblioteca que se criba. Los métodos de marcaje son bien conocidos de la técnica y entre ellos se incluyen los marcajes radioactivos como ATP marcado con ³²P, la biotilación o el marcaje enzimático. Las condiciones de hibridación, incluyendo la astringencia moderada y la astringencia elevada, se proporcionan en Sambrook *et al.*, *supra*.

Las secuencias identificadas en dichos métodos de cribado de bibliotecas pueden compararse y alinearse con otras secuencias conocidas depositadas y disponibles en bases de datos públicas tales como GenBank u otras bases de datos de secuencias privadas. La identidad de secuencias (al nivel de los aminoácidos o de los nucleótidos) dentro de regiones definidas de la molécula o a lo largo de la secuencia de longitud completa pueden determinarse utilizando métodos conocidos de la técnica y tal como se indica en la presente memoria.

Los ácidos nucleicos que presentan secuencia codificante de proteína pueden obtenerse mediante el cribado de bibliotecas seleccionadas de ADNc o genómicas utilizando la secuencia de aminoácidos deducida que se da a conocer en la presente memoria por primera vez y, en caso necesario, utilizando procedimientos convencionales de extensión de cebador tal como se describen en Sambrook *et al.*, *supra*, para detectar precursores y procesar intermediarios de ARNm que podrían no haberse transcrito inversamente para producir ADNc.

2. Selección y transformación de células huésped

Las células huésped son transfectadas o transformadas con vectores de expresión o clonación indicados en la presente memoria para la producción de anticuerpos o polipéptidos y se cultivan en medios nutritivos convencionales modificados según resulte apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes codificantes de las secuencias deseadas. Las condiciones de cultivo, tales como los medios, la temperatura, el pH y similares, pueden ser seleccionadas por el experto en la materia sin necesidad de experimentación indebida. En general, los principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de los cultivos celulares pueden encontrarse en Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) y en Sambrook *et al.*, *supra*.

Los métodos de transfección de células eucarióticas y de transformación de células procarióticas son conocidos por el experto ordinario en la materia, por ejemplo CaCl₂, CaPO₄, mediada por liposomas y la electroporación. Dependiendo de la célula huésped utilizada, la transformación se lleva a cabo utilizando técnicas estándares apropiadas para dichas células. El tratamiento de calcio utilizando cloruro de calcio, tal como se indica en Sambrook *et al.*, *supra*, o la electroporación, se utilizan generalmente para los procariotas. La infección por *Agrobacterium tumefaciens* se utiliza para la transformación de determinadas células vegetales, tal como se indica en Shaw *et al.*, Gene 23:315, 1983, y en el documento n° WO 89/05859, publicado el 29 de junio de 1989. Para las células de mamífero sin dichas paredes celulares, puede utilizarse el método de precipitación con fosfato de calcio de Graham y van der Eb, Virology 52:456-457, 1978. Se han descrito los aspectos generales de las transfecciones del sistema de células huésped de mamífero en la patente US n° 4.399.216. Las transformaciones en levaduras se llevan a cabo típicamente según el método de van Solingen *et al.*, J. Bact. 130:946, 1977, y Hsiao *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:3829, 1979. Sin embargo, también pueden utilizarse otros métodos para introducir ADN en células, tales como la microinyección nuclear, la electroporación, la fusión de protoplastos bacterianos con células intactas, o policones, por ejemplo polibreno o poliornitina. Para diversas técnicas de transformación de células de mamífero ver Keown *et al.*, Methods in Enzymology 185:527-537, 1990, y Mansour *et al.*, Nature 336:348-352, 1988.

Entre las células huésped adecuadas para la clonación o expresión del ADN en los vectores en la presente memoria se incluyen células procarióticas, levaduras o eucarióticas superiores. Entre los procariotas adecuados se incluyen,

aunque sin limitación, eubacterias, tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo enterobacteriáceas tales como *E. coli*. Se encuentran disponibles públicamente diversas cepas de *E. coli*, tales como *E. coli* K12 cepa MM294 (ATCC nº 31.446), *E. coli* X1776 (ATCC nº 31.537), *E. coli* cepa W3110 (ATCC nº 27.325) y K5 772 (ATCC nº 53.635). Entre otras células huésped procarióticas adecuadas se incluyen enterobacteriáceas tales como *Escherichia*, por ejemplo *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como *Bacilli* tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo *B. licheniformis* 41P dada a conocer en DD nº 266.710, publicada el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. Estos ejemplos son ilustrativos y no limitativos. La cepa W3110 es un huésped o huésped parental particularmente preferente debido a que es una cepa huésped común para las fermentaciones de productos de ADN recombinante. Preferentemente, la célula huésped secreta cantidades mínimas de enzimas proteolíticos. Por ejemplo, la cepa W3110 puede modificarse para producir una mutación genética en los genes codificantes de proteínas endógenas al huésped, incluyendo los ejemplos de dichos huéspedes, *E. coli* W3110 cepa 9E4, que presenta el genotipo completo *tonA ptr3*; *E. coli* W3110 cepa 27C7 (ATCC nº 55.244), que presenta el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 DegP ompT kan^r*; *E. coli* W3110 cepa 37D6, que presenta el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan^r*; *E. coli* W3110 cepa 40B4, que es la cepa 37D6 con una mutación por delección *degP* no resistente a la canamicina, y una cepa de *E. coli* que presenta una proteasa periplásmica mutante dada a conocer en la patente US nº 4.946.783, publicada el 7 de agosto de 1990. Alternativamente, resultan adecuados métodos de clonación *in vitro*, por ejemplo, PCR u otras reacciones de polimerasa de ácidos nucleicos.

Pueden producirse en bacterias anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpos y proteínas de fusión de anticuerpos, en particular en el caso de que no se requiera la glucosilación y la función efectora de Fc, tal como cuando el anticuerpo terapéutico se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo una toxina) y el inmunocóncugado por sí mismo muestra efectividad en la destrucción de células tumorales. Los anticuerpos de longitud completa presentan una semivida en circulación más alta. La producción en *E. coli* es más rápida y con una mejor relación eficacia/coste. Para la expresión de fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias, ver, por ejemplo, la patente US nº 5.648.237 (Carter *et al.*), la patente US nº 5.789.199 (Joly *et al.*) y la patente US nº 5.840.523 (Simmons *et al.*), que describen la región de inicio de traducción (RIT) y las secuencias de señal para optimizar la expresión y secreción; dichas patentes se incorporan como referencia en la presente memoria. Tras la expresión, se aísla el anticuerpo a partir de la pasta de células de *E. coli* en una fracción soluble y puede purificarse mediante, por ejemplo, una columna de proteína A o G, dependiendo del isotipo. La purificación final puede llevarse a cabo de manera similar al procedimiento de purificación de anticuerpos expresados en, por ejemplo, células CHO.

Además de los procariotas, los microbios eucarióticos, tales como los hongos filamentosos o las levaduras, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para los vectores codificantes de anticuerpos o polipéptidos. *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo huésped eucariota inferior utilizado comúnmente. Entre otros se incluyen *Schizosaccharomyces pombe* (Beach y Nurse, Nature 290: 140, 1981; patente EP nº 139.383, publicada el 2 de mayo de 1985); huéspedes *Kluyveromyces* (patente US nº 4.943.529; Fleer *et al.*, Bio/Technology 9:968-975, 1991), tales como, por ejemplo, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt *et al.*, J. Bacteriol. 154(2):737-742, 1983), *K. fragilis* (ATCC nº 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC nº 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC nº 24.178), *K. waltii* (ATCC nº 56.500), *K. drosophilorum* (ATCC nº 36.906; Van den Berg *et al.*, Bio/Technology 8:135, 1990), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *yarrowia* (EP nº 402.226); *Pichia pastoris* (EP nº 183.070; Sreekrishna *et al.*, J. Basic Microbiol. 28:265-278, 1988); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP nº 244.234); *Neurospora crassa* (Case *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:5259-5263, 1979); *Schwanniomyces*, tales como *Schwanniomyces occidentalis* (EP nº 394.538, publicado 31 de octubre de 1990), y hongos filamentosos, tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (documento nº WO 91/00357, publicado el 10 de enero de 1991) y huéspedes *Aspergillus*, tales como *A. nidulans* (Ballance *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 112:284-289, 1983; Tilburn *et al.*, Gene 26:205-221, 1983; Yelton *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1470-1474, 1984) y *A. niger* (Kelly y Hynes, EMBO J. 4:475-479, 1985). Las levaduras metilotrópicas resultan adecuadas en la presente memoria y entre ellas se incluyen, aunque sin limitación, las levaduras capaces de crecimiento en metanol seleccionadas de entre los géneros que consisten en *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* y *Rhodotorula*. Puede encontrarse una lista de especies específicas que son ejemplares de dicha clase de levaduras en C. Anthony, The Biochemistry of Methylophilic 269, 1982.

Se derivan células huésped adecuadas para la expresión de anticuerpos o polipéptidos glucosilados a partir de organismos multicelulares. Entre los ejemplos de células de invertebrado se incluyen células de insecto tales como *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 baculovíricas y se han identificado células huésped de insecto permisivas correspondientes de huéspedes tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Se encuentran disponibles públicamente una diversidad de cepas víricas, por ejemplo la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y dichos virus pueden utilizarse como el virus en la presente memoria según la presente invención, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

Sin embargo, el interés ha sido mayor en las células de vertebrado, y la propagación de células de vertebrado en cultivo (cultivo de tejidos) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Son ejemplos de líneas celulares huésped de mamífero útiles la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC nº CRL 1651), la línea

renal embrionaria humana (293 ó células 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, J. Gen. Virol. 36:59, 1977), células renales de hámster neonato (BHK, ATCC nº CCL 10), células ováricas de hámster chino/DHFR- (CHO, Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216, 1980), células de sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251, 1980), células renales de mono (CV1, ATCC nº CCL 70), células renales de mono verde africano (VERO-76, ATCC nº CRL-1587), células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC nº CCL 2), células renales caninas (MDCK, ATCC nº CCL 34), células hepáticas de rata búfalo (BRL 3A, ATCC nº CRL 1442), células pulmonares humanas (W138, ATCC nº CCL 75), células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065), tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC nº CCL51), células TRI (Mather *et al.*, Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68, 1982), células MRC 5, células FS4 y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

Las células huésped son transformadas con los vectores de expresión o clonación indicados en la presente memoria para la producción de anticuerpos o polipéptidos y se cultivan en medios nutritivos convencionales modificados según resulte apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes codificantes de las secuencias deseadas.

3. Selección y utilización de un vector replicable

El ácido nucleico (por ejemplo ADNc o ADN genómico) codificante del anticuerpo o polipéptido puede insertarse en un vector replicable para la clonación (amplificación del ADN) o para la expresión. Se encuentran disponibles públicamente diversos vectores. El vector puede encontrarse, por ejemplo, en forma de un plásmido, cósmido, partícula vírica o fago. La secuencia de ácidos nucleicos apropiada puede insertarse en el vector mediante una diversidad de procedimientos. En general, el ADN se inserta en uno o más sitios de endonucleasa de restricción apropiados utilizando técnicas conocidas. Entre los componentes de vector se incluyen generalmente, aunque sin limitación, uno o más de entre una secuencia de señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento intensificador, un promotor y una secuencia de terminación de transcripción. La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de dichos componentes utiliza técnicas estándares de ligación que son conocidas por el experto en la materia.

El polipéptido puede producirse recombinantemente, no sólo directamente sino también en forma de un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia de señal u otro polipéptido con un sitio de corte específico en el extremo N-terminal de la proteína o polipéptido maduro. En general, la secuencia de señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN codificante de anticuerpo o polipéptido que se inserta en el vector. La secuencia de señal puede ser una secuencia de señal procariótica seleccionada, por ejemplo, de entre el grupo de la fosfatasa alcalina, la penicilasa, lpp o los líderes de la enterotoxina II termoestable. Para la secreción a partir de levaduras, la secuencia de señal puede ser, por ejemplo, el líder de invertasa de levadura, el líder de factor alfa (incluyendo los líderes de factor α de *Saccharomyces* o de *Kluyveromyces*, estando descritos estos últimos en la patente US nº 5.010.182) o el líder de fosfatasa ácida, el líder glucoamilasa de *C. albicans* (patente EP nº 362.179, publicada el 4 de abril de 1990) o la señal descrita en el documento nº WO 90/13646, publicada el 15 de noviembre de 1990. En la expresión en células de mamífero, las secuencias de señal de mamífero pueden utilizarse para dirigir la secreción de la proteína, tales como secuencias de señal de polipéptidos secretados de la misma especie o de especies relacionadas, así como líderes secretorios víricos.

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

Los vectores de expresión y de clonación típicamente contienen un gen de selección, también denominado marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que: (a) confieren resistencia a los antibióticos o a otras toxinas, por ejemplo ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles en medios complejo, por ejemplo el gen codificante de la D-alanina racemasa para *Bacilli*.

Un ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para las células de mamífero son las que permiten la identificación de células competentes para incorporar ácidos nucleicos codificantes de anticuerpos o polipéptidos, tales como DHFR o timidina quinasa. Una célula huésped apropiada en el caso de que se utilice DHFR de tipo salvaje es la línea celular CHO deficiente en actividad de DHFR, preparada y propagada tal como se indica en Urlaub *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216, 1980. Un gen de selección adecuado para la utilización en levaduras es el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura YRp7 (Stinchcomb *et al.*, Nature 282:39, 1979; Kingsman *et al.*, Gene 7:141, 1979; Tschemper *et al.*, Gene 10:157, 1980). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que no presenta la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo ATCC nº 44076 o PEP4-1 (Jones, Genetics 85:12, 1977).

Los vectores de expresión y de clonación habitualmente contienen un promotor operablemente ligado a la secuencia de ácidos nucleicos codificante de anticuerpos o polipéptidos para dirigir la síntesis del ARNm. Los promotores reconocidos por una diversidad de potenciales células huésped son bien conocidos. Entre los promotores adecuados para la utilización con huéspedes procarióticos se incluyen los sistemas de promotor de β -lactamasa y de lactosa (Chang *et al.*, Nature 275:615, 1978; Goeddel *et al.*, Nature 281:544, 1979), la fosfatasa alcalina, un sistema promotor triptófano (trp) (Goeddel, Nucleic Acids Res. 8:4057, 1980; patente EP nº 36.776) y promotores híbridos tales como el promotor tac (deBoer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-25, 1983). Los promotores para la utilización en los sistemas bacterianos también contienen una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) ligada operablemente al ADN codificante del anticuerpo o polipéptido.

Entre los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para la utilización con huéspedes levaduras se incluyen los promotores de la 3-fosfoglicerato quinasa (Hitzeman *et al.*, J. Biol. Chem. 255:2073, 1980) u otros enzimas glucolíticos (Hess *et al.*, J. Adv. Enzyme Reg. 7:149, 1968; Holland, Biochemistry 17:4900, 1978), tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinas, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa.

Otros promotores de levaduras, que son promotores inducibles ya que presentan la ventaja adicional de la transcripción controlada por las condiciones de crecimiento, son las regiones de promotor de la alcohol deshidrogenasa 2, el isocitocromo C, la fosfatasa ácida, los enzimas degradativos asociados al metabolismo del nitrógeno, la metalotioneína, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y los enzimas responsables de la utilización de la maltosa y la galactosa. Se describen adicionalmente vectores y promotores adecuados para la utilización en la expresión en levaduras en la patente EP nº 73.657.

La transcripción de anticuerpo o polipéptido a partir de vectores en células huésped de mamífero está controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos de los genomas de virus tales como el virus del polio, el virus de la viruela aviar (patente UK nº 2.211.504, publicada el 5 de julio de 1989), adenovirus (tal como el adenovirus 2), el virus del papiloma bovino, el virus del sarcoma aviar, el citomegalovirus, un retrovirus, el virus de la hepatitis B y el virus 40 del simio (SV40), de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo el promotor actina o un promotor de inmunoglobulina, y de promotores de choque térmico, con la condición de que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células huésped.

La transcripción de un ADN codificante del anticuerpo o polipéptido por eucariotas superiores puede incrementarse mediante la inserción de una secuencia intensificadora en el vector. Los intensificadores son elementos de acción en cis de ADN, habitualmente de entre aproximadamente 10 y 300 pb, que actúan sobre un promotor incrementando su transcripción. Actualmente se conocen muchas secuencias de intensificador de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Sin embargo, típicamente se utiliza un intensificador de un virus de célula eucariótica. Entre los ejemplos se incluyen el intensificador del SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100 a 270), el intensificador del promotor temprano del citomegalovirus, el intensificador del polio en el lado tardío del origen de replicación y los intensificadores de adenovirus. El intensificador puede procesarse en el vector en una posición 5' o 3' respecto a la secuencia codificante del anticuerpo o polipéptido, aunque preferentemente se localiza en un sitio situado en el lado 5' del promotor.

Los vectores de expresión utilizados en las células huésped eucarióticas (levaduras, 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 la estabilización del ARNm. Dichas secuencias se encuentran disponibles comercialmente de las regiones 5' no traducidas, y ocasionalmente 3' no traducidas, de ADN o ADNc eucarióticos o víricos. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm codificante del anticuerpo o polipéptido.

Se describen todavía otros métodos, vectores y células huésped adecuados para la adaptación a la síntesis del anticuerpo o polipéptido en cultivos de células de vertebrado recombinantes, en Gething *et al.*, Nature 293:620-625, 1981; Mantei *et al.*, Nature 281:40-46, 1979; patentes EP nº 117.060 y nº 117.058.

4. Cultivo de las células huésped

Las células huésped utilizadas para producir el anticuerpo o polipéptido de la presente invención pueden cultivarse en una diversidad de medios. Para cultivar las células huésped resultan adecuados medios disponibles comercialmente tales como F10 de Ham (Sigma), medio esencial mínimo (MEM) (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma). Además, cualquiera de los medios indicados en Ham *et al.*, Meth. Enz. 58:44, 1979; Barnes *et al.*, Anal. Biochem. 102:255 (1980), patentes US nº 4.767.704, nº 4.657.866, nº 4.927.762, nº 4.560.655 o nº 5.122.469, documentos nº WO 90/03430 y nº WO 87/00195, o patente US nº Re. 30.984, pueden utilizarse como medios de cultivo para las células huésped. Cualquiera de dichos medios puede complementarse según se requiera con hormonas y/o otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCINTM), elementos traas (definidos como compuestos inorgánicos habitualmente presentes a concentraciones finales en el

intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualesquiera otros complementos necesarios también pueden incluirse a concentraciones apropiadas que serían conocidas por el experto en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, el pH y similares, son las utilizadas previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión y resultarán evidentes para el experto ordinario en la materia.

5

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 en ARNm (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:5201-5205, 1980), la transferencia de puntos (análisis del ADN) o hibridación *in situ*, utilizando una sonda apropiadamente marcada, basándose en las secuencias proporcionadas en la presente memoria. Alternativamente, pueden utilizarse anticuerpos que pueden reconocer dúplex específicos, incluyendo dúplex de ADN, dúplex de ARN y dúplex híbridos de ADN-ARN o dúplex de ADN-proteína. Los anticuerpos a su vez pueden marcarse y puede llevarse a cabo el ensayo en donde el dúplex se encuentra unido a una superficie, de manera que al formarse el dúplex sobre la superficie, puede detectarse la presencia del anticuerpo unido al dúplex.

10

15

La expresión génica alternativamente puede medirse por métodos inmunológicos, tales como la tinción inmunohistoquímica de células o secciones de tejido y el ensayo de cultivos celulares o líquidos corporales, con el fin de cuantificar directamente la expresión del producto génico. Los anticuerpos útiles para la tinción y/o ensayo inmunohistoquímico de líquidos de muestra pueden ser monoclonales o policlonales, y pueden prepararse en cualquier mamífero. Convenientemente, los anticuerpos pueden prepararse contra un polipéptido de secuencia nativa o contra un péptido sintético basado en la secuencia de ADN proporcionada en la presente memoria o contra una secuencia exógena fusionada con el ADN del polipéptido y codificante de un epítipo específico del anticuerpo.

20

6. Purificación de anticuerpos y polipéptidos

Las formas de anticuerpos y polipéptidos pueden recuperarse del medio de cultivo o de lisados de las células huésped. En caso de encontrarse unidos a membrana, pueden liberarse de la membrana utilizando una solución de detergente adecuada (por ejemplo Triton-X100) o mediante corte enzimático. Las células utilizadas en la expresión del anticuerpo y polipéptido pueden alterarse por medios físicos o químicos diversos, tales como el ciclado de congelación-descongelación, la sonicación, la rotura mecánica o agentes de lisado celular.

30

Puede desearse la purificación del anticuerpo y del polipéptido a partir de proteínas o polipéptidos de las células recombinantes. Los procedimientos siguientes son ejemplares 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, cromatofluore, SDS-PAGE, precipitación con sulfato amónico, filtración en gel utilizando, por ejemplo, Sephadex G-75, columnas de proteína A-sefarosa para eliminar contaminantes tales como IgG, y columnas quelantes de metales para unir formas etiquetadas con epítipo del anticuerpo y del polipéptido. Pueden utilizarse diversos métodos de purificación de proteínas y dichos métodos son conocidos de la técnica y se describen en, por ejemplo, Deutscher, Methods in Enzymology 182, 1990; Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York, 1982. La etapa o etapas de purificación dependerán, por ejemplo, de la naturaleza del procedimiento de producción utilizado y del anticuerpo o polipéptido particular producido.

35

40

Al utilizar técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse intracelularmente, en el espacio periplásmico, o secretarse directamente al medio. En el caso de que el anticuerpo se produzca intracelularmente, como primera etapa, se eliminan los residuos particulados, de células huésped o fragmentos lisados, por ejemplo mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter *et al.*, Bio/Technology 10:163-167, 1992, describen un procedimiento para aislar anticuerpos que son secretados al espacio periplásmico de *E. coli*. Brevemente, se descongela pasta celular en presencia de acetato sódico (pH 3,5), EDTA y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante aproximadamente 30 minutos. Los residuos celulares pueden eliminarse mediante centrifugación. En el caso de que el anticuerpo se secrete al medio, los sobrenadantes de estos sistemas de expresión generalmente se concentran en primer lugar utilizando un filtro de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Puede incluirse un inhibidor de proteasa tal como PMSF en cualquiera de las etapas anteriormente indicadas, con el fin de inhibir la proteólisis y pueden incluirse antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes adventicios.

45

50

55

La composición de anticuerpos preparada a partir de células puede purificarse utilizando, por ejemplo, cromatografía en hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad la técnica de purificación preferente. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que se encuentre presente en el anticuerpo. La proteína A puede utilizarse para purificar anticuerpos que estén basados en las cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ ó $\gamma 4$ humanas (Lindmark *et al.*, J. Immunol. Meth. 62:1-13, 1983). Se recomienda proteína G para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humano (Guss *et al.*, EMBO J. 5:1567-1575-1575, 1986). La matriz a la que se une el ligando de afinidad con la mayor frecuencia es agarosa, aunque se encuentran disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables tales como el vidrio de poro controlado o el poli(estirendivinil)benceno permiten caudales más rápidos y tiempos de

60

65

procesamiento más cortos que los conseguidos con la agarosa. En el caso de que el anticuerpo comprenda un dominio C_H3, para la purificación resulta útil la resina Bakerbond ABX™ (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ). Se encuentran disponibles otras técnicas para la purificación de proteínas, tales como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, la precipitación con etanol, la HPLC de fase inversa, la cromatografía en sílice, la cromatografía en heparina-SEPHAROSE™, la cromatografía en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de ácido poliaspártico), el cromatofoco, SDS-PAGE y la precipitación con sulfato amónico, dependiendo del anticuerpo que debe recuperarse.

Tras cualquier etapa o etapas preliminares de purificación, la mezcla que comprende el anticuerpo de interés y contaminantes puede someterse a cromatografía de interacción hidrofóbica de pH bajo utilizando un tampón de elución a un pH de entre aproximadamente 2,5 y 4,5, preferentemente llevada a cabo a concentraciones salinas bajas (por ejemplo de entre aproximadamente 0 y 0,25 M).

I. Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones terapéuticas de los anticuerpos, oligopéptidos de unión, polipéptidos de moléculas pequeñas orgánicas o inorgánicas ligantes utilizados según la presente invención se preparan para el almacenamiento mediante la mezcla de un anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica/inorgánica pequeña que presenta el grado de pureza deseado con portadores, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16a edición, Osol A., editor, 1980) en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizantes aceptables son no tóxicos para los recipientes a las dosis y concentraciones utilizadas, e incluyen tampones, tales como acetato, Tris, fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, fenol, alcohol butílico o bencilico; alquilparabenes, tales como metilparabén o propilparabén, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina, o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, 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; tonificadores, tales como trehalosa y cloruro sódico; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; surfactante, tal como polisorbato; contraiones formadores de sales, tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo complejos de Zn-proteína) y/o surfactantes no iónicos, tales como TWEEN®, PLURONICS® o polietilenglicol (PEG). La formulación puede comprender el anticuerpo a una concentración de entre 5 y 200 mg/ml, preferentemente de entre 10 y 100 mg/ml.

Las formulaciones en la presente memoria también puede contener más de un compuesto activo, según resulte necesario para la indicación particular bajo tratamiento, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no presente efectos mutuos adversos. Por ejemplo, además de un anticuerpo, oligopéptido ligante, o molécula orgánica o inorgánica pequeña ligante, puede resultar deseable incluir en una formulación un anticuerpo adicional, por ejemplo un segundo anticuerpo que se une a un epítipo diferente en el mismo polipéptido, o un anticuerpo contra alguna otra diana, tal como un factor de crecimiento que afecta al crecimiento del cáncer particular. Alternativamente, o adicionalmente, la composición puede comprender además un agente quimioterapéutico, agente citotóxico, citoquina, agente inhibidor del crecimiento, agente antihormonal y/o cardioprotector. Dichas moléculas convenientemente se encuentran presentes en combinación en cantidades que resultan eficaces para el propósito pretendido.

Los ingredientes activos también pueden encapsularse en microcápsulas preparadas mediante, por ejemplo, técnicas de coacervado o mediante polimerización interfacial, por ejemplo hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metilmacrilato), respectivamente, en sistemas coloidales de administración de fármaco (por ejemplo liposomas, microesferas de albumina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se dan a conocer en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16a edición, Osol A., editor, 1980.

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Entre los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida se incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos, en las que las matrices se encuentran en forma de artículos conformados, por ejemplo de película o microcápsula. Entre los ejemplos de matrices de liberación sostenida se incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(alcohol vinílico), poliláctidos (patente US n° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolido) y ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico.

Las formulaciones que deben utilizarse para la administración *in vivo* deben ser estériles. Lo anterior se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

J. Tratamiento con anticuerpos Oligopéptidos ligantes y moléculas orgánicas/inorgánicas pequeñas ligantes

Con el fin de determinar la expresión de polipéptido (hepsina y/o PEM) en el cáncer, se dispone de diversos ensayos de detección. En una realización, la sobreexpresión de polipéptidos puede analizarse mediante inmunohistoquímica (IHQ). Pueden someterse secciones de tejido incluidas en parafina de una biopsia tumoral al ensayo IHQ y asignarles una intensidad de tinción del polipéptido según los criterios siguientes:

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

Puntuación 1+ - se detecta una tinción membranar débil/apenas perceptible en más de 10% de las células tumorales. Las células se encuentran teñidas únicamente en parte de su membrana.

Puntuación 2+ - se observa una tinción membranar completa débil a moderada en más de 10% de las células tumorales. Puntuación 3+ - se observa una tinción membranar completa moderada a fuerte en más de 10% de las células tumorales.

Aquellos tumores con puntuaciones de 0 o 1+ para la expresión de polipéptido pueden caracterizarse como no sobreexpresantes del polipéptido, mientras que aquellos tumores con puntuaciones de 2+ o 3+ pueden caracterizarse como sobreexpresantes del polipéptido.

Alternativamente, o adicionalmente, los ensayos FISH tales como INFORM® (comercializado por Ventana, Arizona) o PATHVISION® (Vysis, Illinois) pueden llevarse a cabo en tejido tumoral fijado en formalina e incluido en parafina, con el fin de determinar la extensión (si hay) de sobreexpresión del polipéptido en el tumor.

La sobreexpresión o amplificación del polipéptido puede evaluarse utilizando un ensayo de detección *in vivo*, por ejemplo mediante la administración de una molécula (tal como un anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica pequeña) que se une a la molécula que debe detectarse y se etiqueta con un marcaje detectable (por ejemplo un isótopo radioactivo o un marcaje fluorescente) y el escaneo externo del paciente para la localización del marcaje.

Tal como se ha indicado anteriormente, los anticuerpos, oligopéptidos y moléculas orgánicas/inorgánicas pequeñas de la invención presentan diversas aplicaciones no terapéuticas. Los anticuerpos, oligopéptidos y moléculas orgánicas/inorgánicas pequeñas de la presente invención pueden resultar útiles para la estadificación de los cánceres expresantes de polipéptido (por ejemplo en la obtención de radioimágenes). Los anticuerpos, oligopéptidos y moléculas orgánicas/inorgánicas pequeñas también resultan útiles para la purificación o inmunoprecipitación de polipéptido de las células, para la detección y cuantificación del polipéptido *in vitro*, por ejemplo en un ELISA o una transferencia western, para matar y eliminar células expresantes de polipéptido de una población de células mixtas como etapa en la purificación de otras células.

Actualmente, dependiendo del estadio del cáncer, el tratamiento del cáncer implica una o una combinación de las terapias siguientes: cirugía para eliminar el tejido canceroso, terapia de radiación y quimioterapia. La terapia de anticuerpos, oligopéptidos o moléculas orgánicas/inorgánicas pequeñas puede resultar especialmente deseable en pacientes de edad avanzada que no toleran la toxicidad y los efectos secundarios de la quimioterapia y en enfermedad metastásica en la que la terapia de radiación presenta una utilidad limitada. Los anticuerpos, oligopéptidos y moléculas orgánicas/inorgánicas pequeñas de la invención con diana en tumores resultan útiles para aliviar los cánceres expresantes de polipéptido tras el diagnóstico inicial de la enfermedad o durante una recaída. Para las aplicaciones terapéuticas, el anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica/inorgánica pequeña puede utilizarse sola o en terapia de combinación con, por ejemplo, hormonas, antiangiogénicos o compuestos marcados radioactivamente, o con cirugía, crioterapia y/o radioterapia. El tratamiento con anticuerpos, oligopéptidos o moléculas orgánicas/inorgánicas pequeñas puede administrarse conjuntamente con otras formas de terapia convencional, consecutivamente, antes o después de la terapia convencional. Se utilizan fármacos quimioterapéuticos tales como TAXOTERE® (docetaxel), TAXOL® (paclitaxel), estramustina y mitoxantrona en el tratamiento del cáncer, en particular en pacientes de riesgo elevado. En el presente método de la invención para el tratamiento o el alivio del cáncer, en el paciente de cáncer puede administrarse anticuerpo, oligopéptido o moléculas orgánicas/inorgánicas pequeñas conjuntamente con el tratamiento con uno o más de los agentes quimioterapéuticos anteriormente indicados. En particular, la terapia de combinación con paclitaxel y derivados modificados (ver, por ejemplo, la patente EP n° 0600517) se encuentra contemplada. El anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica/inorgánica pequeña se administra con una dosis terapéuticamente eficaz del agente quimioterapéutico. En otra realización, se administra el anticuerpo, el oligopéptido o la molécula orgánica/inorgánica pequeña conjuntamente con quimioterapia para incrementar la actividad y la eficacia del agente quimioterapéutico, por ejemplo paclitaxel. El Physicians' Desk Reference (PDR) da a conocer dosis de dichos agentes que han sido utilizadas en el tratamiento de diversos cánceres. El régimen de administración y dosis de dichos fármacos quimioterapéuticos que resultan terapéuticamente eficaces dependerá del cáncer particular bajo tratamiento, la extensión de la enfermedad y otros factores que resultarán familiares para el experto en la materia y que podrán ser determinados por el médico.

En una realización particular, se administra en el paciente un conjugado que comprende un anticuerpo, un oligopéptido o una molécula orgánica/inorgánica pequeña conjugada con un agente citotóxico. Preferentemente, el inmunconjugado unido a la proteína es internalizado por la célula, resultando en una eficacia terapéutica incrementada del inmunconjugado en la eliminación de la célula de cáncer a la que se une. En una realización

preferente, el agente citotóxico presenta como diana o interfiere con el ácido nucleico en la célula de cáncer. Se han indicado anteriormente ejemplos de dichos agentes citotóxicos y entre ellos se incluyen maitansinoides, caliqueamicinas, ribonucleasas y ADN endonucleasas.

5 Los anticuerpos, oligopéptidos, moléculas orgánicas/inorgánicas pequeñas o conjugados con toxina de los mismos se administran en un paciente humano, según métodos conocidos, tales como la administración intravenosa en forma de bolo, o mediante infusión continua durante un periodo de tiempo, por las vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o mediante inhalación. La administración intravenosa o subcutánea del anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica/inorgánica pequeña
10 resulta preferente.

Pueden combinarse otros regímenes terapéuticos con la administración del anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica/inorgánica pequeña. La administración combinada incluye la coadministración, utilizando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, y la administración consecutiva en cualquier orden, en la que preferentemente se deja un periodo de tiempo durante el que ambos (o todos) los agentes activos ejercen simultáneamente sus actividades biológicas. Preferentemente, dicha terapia combinada resulta en un efecto terapéutico sinérgico.

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

En otra realización, los métodos de tratamiento terapéutico de la presente invención implican la administración combinada de un anticuerpo (o anticuerpos), oligopéptidos o moléculas orgánicas/inorgánicas pequeñas y uno o más agentes quimioterapéuticos o agentes inhibidores del crecimiento, incluyendo la coadministración de cócteles de diferentes agentes quimioterapéuticos. Entre los agentes quimioterapéuticos se incluyen fosfato de estramustina, prednimustina, cisplatino, 5-fluorouracilo, melfalán, ciclofosfamida, hidroxurea e hidroxureataxanos (tales como paclitaxel y docetaxel) y/o antibióticos de antraciclina. La preparación y programas de administración para dichos agentes quimioterapéuticos pueden seguir las instrucciones del fabricante o ser determinadas empíricamente por el experto en la materia. La preparación y programas de administración de la quimioterapia se describen también en
25
30 Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 1992.

El anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica/inorgánica pequeña puede combinarse con un compuesto antihormonal, por ejemplo un compuesto antiestrógeno tal como tamoxifeno, una antiprogesterona, tal como onapristona (ver la patente EP nº 616.812) o un antiandrógeno tal como flutamida, en dosis conocidas para dichas moléculas. En el caso de que el cáncer que debe tratarse sea cáncer independiente de andrógenos, el paciente puede haberse sometido previamente a terapia antiandrógenos y, tras convertirse el cáncer en independiente de andrógenos, puede administrarse en el paciente el anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica/inorgánica pequeña (y opcionalmente otros agentes tales como los indicados en la presente memoria).

En ocasiones, puede resultar beneficioso coadministrar también un cardioprotector (para prevenir o reducir la disfunción miocárdica asociada a la terapia) o una o más citoquinas en el paciente. Además de los regímenes terapéuticos anteriormente indicados, el paciente puede someterse a la extracción quirúrgica de células de cáncer y/o la terapia de radiación, antes, simultáneamente o después de la terapia de anticuerpos, oligopéptidos o moléculas orgánicas/inorgánicas pequeñas. Las dosis adecuadas para cualquiera de los agentes anteriormente coadministrados son las actualmente utilizadas y pueden reducirse gracias a la acción combinada (sinergia) del agente nuevamente identificado y el anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica/inorgánica pequeña.

Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosis y el modo de administración son seleccionados por el método según criterios conocidos. La dosis apropiada de anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica/inorgánica pequeña dependerá del tipo de enfermedad bajo tratamiento, tal como se ha definido anteriormente, la gravedad y el curso de la enfermedad, de si el anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica/inorgánica pequeña se administra con fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta del mismo al anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica/inorgánica pequeña, y el criterio del médico responsable. El anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica/inorgánica pequeña se administra convenientemente en el paciente de una vez o a lo largo de una serie de tratamientos. Preferentemente, el anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica/inorgánica pequeña se administra mediante infusión intravenosa o mediante inyecciones subcutáneas. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, una dosis candidata inicial puede ser de entre aproximadamente 1 µg/kg y aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal (por ejemplo de entre 0,1 y 15 mg/kg) del anticuerpo para la administración en el paciente mediante, por ejemplo, una o más administraciones separadas o mediante la infusión continua. Un régimen de dosificación puede comprender la administración de una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg, seguido de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg del anticuerpo. Sin embargo, pueden resultar útiles otros regímenes de dosificación. Una dosis diaria típica puede encontrarse comprendida entre aproximadamente 1 µg/kg y 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para las administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la condición, el tratamiento generalmente se mantendría hasta producirse una supresión deseada de los síntomas de
50
55
60
65

la enfermedad. El progreso de dicha terapia puede monitorizarse fácilmente mediante métodos y ensayos convencionales y basándose en criterios conocidos por el médico u otros expertos en la materia.

5 Aparte de la administración de la proteína anticuerpo en el paciente, la presente solicitud contempla la administración del anticuerpo mediante terapia génica. Dicha administración de ácidos nucleicos codificantes del anticuerpo se encuentra comprendida en la expresión "administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo". Ver, por ejemplo, el documento nº WO 96/07321, publicado el 14 de marzo de 1996, referente a la utilización de la terapia génica para generar anticuerpos intracelulares.

10 Existen dos enfoques principales para introducir el ácido nucleico (opcionalmente contenido en un vector) en las células de un paciente: *in vivo* y *ex vivo*. Para la administración *in vivo*, el ácido nucleico se inyecta directamente en el paciente, habitualmente en el sitio en el que se requiere el anticuerpo. Para el tratamiento *ex vivo*, se extraen las células del paciente, se introduce el ácido nucleico en dichas células aisladas y las células modificadas se administran en el paciente directamente o, por ejemplo, encapsulado dentro de membranas porosas que se implantan en el paciente (ver, por ejemplo, las patentes US nº 4.892.538 y nº 5.283.187). Existe una diversidad de técnicas disponibles para introducir ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas varían dependiendo de si el ácido nucleico se transfiere al interior de las células en cultivo *in vitro*, o *in vivo* en las células del huésped deseado. Entre las técnicas adecuadas para la transferencia del ácido nucleico al interior de las células de mamífero *in vitro* se incluyen la utilización de liposomas, la electroporación, la microinyección, la fusión celular, DEAE-dextrano, el método de precipitación con fosfato de calcio, etc. Un vector utilizado comúnmente para la administración *ex vivo* del gen es un vector retroviral.

25 Entre las técnicas actualmente preferentes de transferencia de ácidos nucleicos *in vivo* se incluyen la transfección con vectores víricos (tales como adenovirus, virus del herpes simple I o virus adenoasociados) y sistemas basados en lípidos (son lípidos útiles para la transferencia del gen mediada por lípidos, DOTMA, DOPE y DC-Chol, por ejemplo). Para una revisión de los protocolos actualmente conocidos de marcaje génico y de terapia génica, ver Anderson *et al.*, Science 256:808-813, 1992. Ver también el documento nº WO 93/25673 y referencias citadas en el mismo.

30 Los anticuerpos de la invención pueden encontrarse en las diferentes formas comprendidas en la definición de "anticuerpo" en la presente memoria. De esta manera, entre los anticuerpos se incluyen anticuerpos de longitud completa o intactos, fragmentos de anticuerpos, anticuerpos de secuencia nativa o variantes de aminoácidos, anticuerpos humanizados, quiméricos o de fusión, inmunoconjugados y fragmentos funcionales de los mismos. En los anticuerpos de fusión, se fusiona una secuencia de anticuerpo con una secuencia de polipéptido heterólogo. Los anticuerpos pueden modificarse en la región Fc para proporcionar las funciones efectoras deseadas. Tal como se comenta en mayor 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 mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o mediante el reclutamiento del complemento en la citotoxicidad dependiente del complemento, o algún otro mecanismo. Alternativamente, en el caso de que se desee eliminar o reducir la función efectora, de manera que se minimicen los efectos secundarios o las complicaciones terapéuticas, pueden utilizarse otras regiones Fc determinadas.

45 En una realización, el anticuerpo compite para la unión o se une sustancialmente al mismo epítipo que los anticuerpos de la invención. Los anticuerpos que presentan las características biológicas de los presentes anticuerpos de la invención también se encuentran contemplados, incluyendo específicamente el reconocimiento tumoral *in vivo* y cualesquiera características de inhibición de la proliferación celular o citotóxicas.

50 Los métodos de producción de los anticuerpos anteriormente indicados se describen en detalle en la presente memoria.

Los presentes anticuerpos, oligopéptidos y moléculas orgánicas/inorgánicas pequeñas resultan útiles para tratar un cáncer expresante de hepsina y/o PEM, o para aliviar uno o más síntomas del cáncer en un mamífero. Los métodos de la invención comprenden el uso de antagonistas en el tratamiento y/o alivio de los síntomas de tumores metastásicos asociados a dichos cánceres. El anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica/inorgánica pequeña es capaz de unirse a por lo menos una parte de las células de cáncer que expresan el polipéptido o polipéptidos (hepsina y/o PEM) en el mamífero. En una realización, el anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica/inorgánica pequeña resulta eficaz para provocar la destrucción o la eliminación de las células tumorales expresantes y/o sensibles al polipéptido, o para inhibir el crecimiento y/o la invasividad de dichas células tumorales, *in vitro* o *in vivo*, tras la unión al polipéptido. Dicho anticuerpo incluye un anticuerpo desnudo (no conjugado con cualquier agente). Los anticuerpos desnudos que presentan propiedades citotóxicas u otras propiedades de inhibición pueden controlarse adicionalmente con un agente citotóxico para convertirlos en más potentes en la destrucción de las células tumorales. Las propiedades citotóxicas pueden ser conferidas a un anticuerpo mediante, por ejemplo, la conjugación del anticuerpo con un agente citotóxico, para formar un inmunoconjugado tal como se indica en la presente memoria. En algunas realizaciones, el agente citotóxico o agente inhibidor del crecimiento es una molécula pequeña. En algunas realizaciones se utilizan toxinas tales como caliqueamicina o un maitansinoide y análogos o derivados de los mismos.

La invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica/inorgánica pequeña de la invención, y un portador. Para los fines de tratar el cáncer, las composiciones pueden administrarse en el paciente que necesita dicho tratamiento, en las que la composición puede comprender uno o más anticuerpos presentes en forma de un inmunocombinado o en forma del anticuerpo desnudo. En una realización adicional, las composiciones pueden comprender dichos anticuerpos, oligopéptidos o moléculas orgánicas/inorgánicas pequeñas en combinación con otros agentes terapéuticos, tales como agentes citotóxicos o inhibidores del crecimiento, incluyendo agentes quimioterapéuticos. La invención proporciona además formulaciones que comprenden un anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica/inorgánica pequeña de la invención, y un portador. En una realización, la formulación es una formulación terapéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto de la invención son ácidos nucleicos aislados codificantes de los anticuerpos. Se encuentran comprendidos los ácidos nucleicos codificantes de tanto las cadenas H como L y especialmente los residuos de región hipervariable, cadenas que codifican el anticuerpo de secuencia nativa así como las variantes, modificaciones y versiones humanizadas del anticuerpo.

La invención proporciona además métodos útiles para tratar un cáncer o aliviar uno o más síntomas del cáncer en un mamífero, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica/inorgánica pequeña en el mamífero. Las composiciones terapéuticas de anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica/inorgánica pequeña pueden administrarse en un periodo corto (agudo) o crónicamente, o intermitentemente, según decida el médico. También se proporcionan métodos de inhibición del crecimiento y de eliminación de una célula expresante y/o sensible a un polipéptido (hepsina y/o PEM).

La invención proporciona además kits y artículos fabricados que comprenden por lo menos un anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica/inorgánica pequeña. Los kits que contienen anticuerpos, oligopéptidos o moléculas orgánicas/inorgánicas pequeñas encuentran utilidad en, por ejemplo, ensayos de eliminación celular, para inhibir la invasión por células tumorales y para la purificación o inmunoprecipitación de polipéptidos de células. Por ejemplo, para el aislamiento y purificación de un polipéptido, el kit puede contener un anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica/inorgánica pequeña acoplada con perlas (por ejemplo perlas de sefarosa). Pueden proporcionarse kits que contienen los anticuerpos, oligopéptidos o moléculas orgánicas/inorgánicas pequeñas para la detección y cuantificación de un polipéptido *in vitro*, por ejemplo en un ELISA o transferencia western. Dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica/inorgánica pequeña útil para la detección puede proporcionarse con un marcaje, tal como un marcaje fluorescente o radioactivo.

35 K. Artículos fabricados y kits

Otra realización de la invención es un artículo fabricado que contiene materiales útiles para el tratamiento de un cáncer que expresa un polipéptido (hepsina y/o PEM), tal como cáncer de próstata o cáncer ovárico. El artículo fabricado comprende un recipiente y una etiqueta o impreso en el paquete o asociado al recipiente. Entre los recipientes adecuados se incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, etc. El recipiente puede formarse a partir de una diversidad de materiales, tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que resulta eficaz para tratar la condición de cáncer y que puede presentar una abertura de acceso estéril (por ejemplo el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que presenta un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica). Por lo menos un agente activo en la composición es un anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica/inorgánica pequeña de la invención. La etiqueta o impreso en el paquete indica que la composición se utiliza para el tratamiento del cáncer. La etiqueta o impreso en el paquete comprende además instrucciones para la administración de la composición de anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica/inorgánica pequeña en el paciente de cáncer. Adicionalmente, el artículo fabricado puede comprender además un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como agua bacteriostática para inyección (ABPI), 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.

Se proporcionan además kits que resultan útiles con diversos fines, por ejemplo para ensayos de expresión de polipéptido o de eliminación celular, para la purificación o inmunoprecipitación de un polipéptido de células. Para el aislamiento y purificación de un polipéptido, el kit puede contener un anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica/inorgánica pequeña acoplada con perlas (por ejemplo perlas de sefarosa). Pueden proporcionarse kits que contienen los anticuerpos, oligopéptidos o moléculas orgánicas/inorgánicas pequeñas para la detección y cuantificación de un polipéptido *in vitro*, por ejemplo en un ELISA o transferencia western. Al igual que con el artículo fabricado, el kit comprende un recipiente y una etiqueta o impreso en el paquete o asociado al recipiente. El recipiente contiene una composición que comprende por lo menos un anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica/inorgánica pequeña de la invención. Pueden incluirse recipientes adicionales que contienen, por ejemplo, diluyentes y tampones, y anticuerpos de control. La etiqueta o impreso en el paquete puede proporcionar una descripción de la composición, así como instrucciones para el uso *in vitro* o de detección deseado.

65 L. Polipéptidos y ácidos nucleicos codificantes del polipéptido - Formas específicas y aplicaciones

Las secuencias de nucleótidos (o su complemento) codificantes de polipéptidos de la invención presentan diversas aplicaciones en biología molecular, así como usos para la terapia, etc. El ácido nucleico codificante del polipéptido también resultará útil para la preparación de polipéptidos mediante las técnicas recombinantes descritas en la presente memoria, en las que dichos polipéptidos pueden encontrarse utilidad, por ejemplo, en la preparación de anticuerpos tal como se indica en la presente memoria.

Puede utilizarse un gen de polipéptido de secuencia nativa de longitud completa o partes del mismo como sondas de hibridación para una biblioteca de ADNc para aislar otros ADNc (por ejemplo los codificantes de variantes naturales de un polipéptido o un polipéptido de otra especie) que presentan una identidad de secuencia deseada respecto a una secuencia de polipéptido nativa dada a conocer en la presente memoria. Opcionalmente, la longitud de las sondas es de entre aproximadamente 20 y aproximadamente 50 bases. Las sondas de hibridación pueden derivarse a partir de regiones por lo menos parcialmente nuevas de la secuencia de nucleótidos nativa de longitud completa, en la que dichas regiones pueden determinarse sin necesidad de experimentación indebida, o a partir de secuencias genómicas, incluyendo promotores, elementos intensificadores e intrones del polipéptido de secuencia nativa. A título de ejemplo, un método de cribado comprende aislar la región codificante del gen de polipéptido utilizando la secuencia de ADN conocida para sintetizar una sonda seleccionada de aproximadamente 40 bases. Las sondas de hibridación pueden marcarse con una diversidad de marcajes, incluyendo radionucleótidos, tales como ^{32}P o ^{35}S , o marcajes enzimáticos tales como fosfatasa alcalina acoplada con la sonda mediante sistemas de acoplamiento de avidina/biotina. Las sondas marcadas que presentan una secuencia complementaria a la del gen de polipéptido de la presente invención pueden utilizarse para cribar bibliotecas de ADNc humano, ADN genómico o ARNm para determinar a qué elementos de dichas bibliotecas se hibrida la sonda. Las técnicas de hibridación se describen en mayor detalle en los Ejemplos, posteriormente. De manera similar pueden utilizarse como sondas cualesquiera sondas de EST dadas a conocer en la presente solicitud, utilizando los métodos dados a conocer en la presente memoria.

Entre otros fragmentos útiles de los ácidos nucleicos codificantes de polipéptido se incluyen oligonucleótidos antisentido o de sentido que comprenden una secuencia de ácidos nucleicos de cadena sencilla (de ARN o ADN) capaz de unirse al ARNm (de sentido) del polipéptido diana o a la secuencia de ADN (antisentido) del polipéptido. Los oligonucleótidos antisentido o de sentido, según la presente invención, comprenden un fragmento de la región codificante de un ADN que codifica la hepsina, pro-PEM o fragmentos de unión tal como se indica en la presente memoria. Dicho fragmento generalmente comprende por lo menos aproximadamente 14 nucleótidos, preferentemente entre aproximadamente 14 y 30 nucleótidos. La capacidad de derivar un oligonucleótido antisentido o de sentido, basándose en una secuencia de ADNc codificante de una proteína dada se describe en, por ejemplo, Stein y Cohen (Cancer Res. 48:2659, 1988), y en van der Krol *et al.* (BioTechniques 6:958, 1988).

La unión de oligonucleótidos antisentido o de sentido a secuencias de ácidos nucleicos diana resulta en la formación de dúplex que bloquean la transcripción o la traducción de la secuencia diana por uno de entre varios medios, entre ellos la degradación incrementada de los dúplex, la terminación prematura de la transcripción o traducción, o por otros medios. Dichos métodos se encuentran comprendidos en la presente invención. De esta manera, los oligonucleótidos antisentido pueden utilizarse para bloquear la expresión de una proteína, en la que la proteína puede desempeñar una función en la inducción de cáncer en mamíferos. Los oligonucleótidos antisentido o de sentido comprenden además oligonucleótidos que presentan esqueletos de azúcar-fosfodiéster modificados (u otros enlaces de azúcar, tales como los indicados en el documento n° WO 91/06629) y en el que dichos enlaces de azúcar son resistentes a las nucleasas endógenas. Dichos oligonucleótidos con enlaces de azúcar resistentes son estables *in vivo* (es decir, capaces de resistir la degradación enzimática) pero conservan especificidad de secuencia para poder unirse a las secuencias de nucleótidos diana.

Entre los sitios intragénicos preferentes para la unión de antisentido se incluyen la región que incorpora el codón de inicio de traducción (5'-AUG/5'-ATG) o el codón de terminación/parada (5'-UAA, 5'-UAG and 5'-UGA / 5'-TAA, 5'-TAG y 5'-TGA) del marcado de lectura abierta (ORF, por sus siglas en inglés) del gen. Estas regiones se refieren a una parte del ARNm o gen que comprende entre aproximadamente 25 y aproximadamente 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir 5' o 3') desde un codón de inicio o terminación de traducción. Entre otras regiones preferentes para la unión de moléculas antisentido se incluyen: intrones, exones, uniones intrón-exón, el marco de lectura abierto (ORF) o "región codificante", que es la región entre el codón de inicio de traducción y el codón de terminación de traducción, la caperuza 5' de un ARNm que comprende un residuo de guanosina N7-metilado unido al residuo más hacia 5' del ARNm mediante un enlace 5'-5' trifosfato e incluye la estructura de caperuza 5' misma, así como los primeros 50 nucleótidos contiguos a la caperuza; la región 5'-no traducida (5'-UTR), la parte de un ARNm en la dirección 5' respecto al codón de inicio de traducción y que, de esta manera, incluye los nucleótidos entre el sitio de la caperuza 5' y el codón de inicio de traducción de un ARNm o nucleótidos correspondientes en el gen, y la región 3'-no traducida (3'-UTR), la parte de un ARNm en dirección 3' respecto al codón de terminación de la traducción y que, de esta manera, incluye los nucleótidos entre el codón de terminación de traducción y el extremo 3' de un ARNm o nucleótidos correspondientes en el gen.

Entre los ejemplos específicos de compuestos antisentido preferentes que resultan útiles para inhibir la expresión de un polipéptido se incluyen oligonucleótidos que contienen esqueletos modificados o enlaces internucleósido no naturales. Entre los oligonucleótidos que presentan esqueletos modificados se incluyen aquellos que conservan un

átomo de fósforo en el esqueleto y aquellos que no presentan un átomo de fósforo en el esqueleto. Para los fines de la presente memoria, y tal como se hace referencia en ocasiones en la técnica, los oligonucleótidos modificados que no presentan un átomo de fósforo en su esqueleto internucleósido también pueden considerarse oligonucleósidos. Entre los esqueletos oligonucleótidos modificados preferentes se incluyen, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, metilfosfonatos y otros alquilfosfonatos, incluyendo 3'-alquilfosfonatos, 5'-alquilfosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos, incluyendo 3'-aminofosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres, selenofosfatos y boranofosfatos que presentan enlaces 3'-5' normales, análogos 2'-5' ligados de ellos, y aquellos que presentan polaridad invertida, en donde uno o más enlaces internucleótidos se unen mediante enlace 3' a 3', 5' a 5' o 2' a 2'. Los oligonucleótidos preferentes que presentan polaridad invertida comprenden un único enlace 3' a 3' en el enlace internucleótido más en el lado 3', es decir, un único residuo nucleósido invertido que puede ser abásico (falta la nucleobase o presenta un grupo hidroxilo en lugar de la misma). También se incluyen diversas sales, sales mixtas y formas de ácido libre. Entre las patentes estadounidenses representantes que enseñan la preparación de enlaces que contienen fósforo se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, las patentes US nº nº 3.687.808, nº 4.469.863, nº 4.476.301, nº 5.023.243, nº 5.177.196, nº 5.188.897, nº 5.264.423, nº 5.276.019, nº 5.278.302, nº 5.286.717, nº 5.321.131, nº 5.399.676, nº 5.405.939, nº 5.453.496, nº 5.455.233, nº 5.466.677, nº 5.476.925, nº 5.519.126, nº 5.536.821, nº 5.541.306, nº 5.550.111, nº 5.563.253, nº 5.571.799, nº 5.587.361, nº 5.194.599, nº 5.565.555, nº 5.527.899, nº 5.721.218, nº 5.672.697 y nº 5.625.050, cada uno de los cuales se incorpora expresamente en la presente memoria como referencia.

Los esqueletos oligonucleótidos modificados preferentes que no incluyen un átomo de fósforo en los mismos presentan esqueletos que están formados de enlaces internucleósidos de alquilo de cadena corta o de cicloalquilo, enlaces internucleósidos mixtos de heteroátomo y alquilo o cicloalquilo, o uno o más enlaces internucleósidos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Entre ellos se incluyen aquellos que presentan enlaces morfolino (formados en parte a partir de la parte sacárida de un nucleósido); esqueletos de siloxano; esqueletos de sulfuro, de sulfóxido y de sulfona; esqueletos de formacetilo y de tioformacetilo; esqueletos de metilén-formacetilo y de tioformacetilo; esqueletos de riboacetilo; esqueletos que contienen alqueno; esqueletos de sulfamato; esqueletos de metilénimino y metilénhidrazino; esqueletos de sulfonato y de sulfonamida; esqueletos de amida; y otros que presentan partes componente mixtas de N, O, S y CH₂. Entre las patentes estadounidenses representativas que enseñan la preparación de dichos oligonucleósidos se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, las patentes US nº nº 5.034.506, nº 5.166.315, nº 5.185.444, nº 5.214.134, nº 5.216.141, nº 5.235.033, nº 5.264.562, nº 5.264.564, nº 5.405.938, nº 5.434.257, nº 5.466.677, nº 5.470.967, nº 5.489.677, nº 5.541.307, nº 5.561.225, nº 5.596.086, nº 5.602.240, nº 5.608.046, nº 5.610.289, nº 5.618.704, nº 5.623.070, nº 5.663.312, nº 5.633.360, nº 5.677.437, nº 5.792.608, nº 5.646.269 y nº 5.677.439, cada uno de los cuales se incorpora expresamente en la presente memoria como referencia.

En otros oligonucleótidos antisentido preferentes, tanto el enlace sacárido como internucleósido, es decir el esqueleto, de las unidades nucleótido se sustituyen por grupos nuevos. Las unidades de base se mantienen para la hibridación con un compuesto diana apropiado de ácidos nucleicos. Uno de dichos compuestos oligoméricos, un oligonucleótido mimético, que se ha demostrado que presenta excelentes propiedades de hibridación, se denomina ácido nucleico péptido (APN). En los compuestos APN, el esqueleto sacárido de un oligonucleótido se sustituye por un esqueleto que contiene amida, en particular un esqueleto aminoetilglicina. Las nucleobases se conservan y se unen directa o indirectamente a átomos de nitrógeno aza de la parte amida del esqueleto. Entre las patentes estadounidenses representativas que enseñan la preparación de compuestos APN se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, las patentes US nº 5.539.082, nº 5.714.331 y nº 5.719.262, cada una de las cuales se incorpora como referencia en la presente memoria. Puede encontrarse una enseñanza adicional de los compuestos APN en Nielsen *et al.*, Science 254:1497-1500, 1991.

Los oligonucleótidos antisentido preferentes incorporan esqueletos de fosforotioato y/o esqueletos con heteroátomos, y en particular -CH₂-NH-O-CH₂-, -CH₂-N(CH₃)-O-CH₂- [que se conoce como esqueleto de metileno (metilimino) o esqueleto de MMI], -CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-, -CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-CH₂- y -O-N(CH₃)-CH₂-CH₂- [en donde el esqueleto fosfodiéster nativo está representado por -O-P-O-CH₂-] de la patente US nº 5.489.677 anteriormente referenciada y los esqueletos amida de la patente US nº 5.602.240 anteriormente referenciada. También resultan preferentes los oligonucleótidos antisentido que presentan estructuras esqueléticas de morfolino de la patente US nº 5.034.506 anteriormente referenciada.

Los oligonucleótidos modificados pueden contener además una o más fracciones sacáridas sustituidas. Los oligonucleótidos preferentes comprenden una de las siguientes especies en la posición 2': OH, F, O-, S- o N-alquilo, O-, S- o N-alqueno, u O-, S- o N-alquino, o O-alquil-O-alquilo, en donde el alquilo, alqueno o alquino pueden ser alquilo C₁ a C₁₀ sustituido o no sustituido, o alqueno C₂ a C₁₀ y alquino C₂ a C₁₀. Resultan particularmente preferentes: O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂, and O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, en donde n y m presentan cualesquiera valores entre 1 y aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos antisentido preferentes comprenden una de las siguientes especies en la posición 2': alquilo inferior C₁ a C₁₀, alquilo inferior sustituido, alqueno, alquino, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo, O-aralquilo, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, hterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de corte de ARN, un grupo informador, un intercalador,

un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido, y otros sustituyentes que presentan propiedades similares. Una modificación preferente incluye 2'-metoxietoxi (2'-O-CH₂CH₂OCH₃, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE) (Martin *et al.*, Helv. Chim. Acta 78:486-504, 1995), es decir, un grupo alcoxialcoxi. Una modificación preferente adicional incluye 2'-dimetilaminoetoxi, es decir, un grupo O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, también conocido como 2'-DMAOE, tal como se describe en los ejemplos proporcionados posteriormente en la presente memoria, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocidas en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₃)₂.

Una modificación preferente adicional incluye ácidos nucleicos bloqueados (ANB) en los que el grupo 2'-hidroxilo está unido al átomo de carbono 3' o 4' del anillo sacárido, formando de esta manera una fracción sacárida bicíclica. El enlace es preferentemente un grupo metileno (-CH₂)_n que forma un puente entre 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 n° WO 98/39352 y n° WO 99/14226.

Entre otras modificaciones preferentes se incluyen 2'-metoxi (2'-O-CH₃), 2'-aminopropoxi (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂), 2'-alilo (2'-CH₂-CH=CH₂), 2'-O-alilo (2'-O-CH₂-CH=CH₂) y 2'-fluoro (2'-F). La modificación en 2' puede ser en la posición arábino (superior) o en la posición ribo (inferior). Una modificación 2'-arábino preferente es 2'-F. También pueden realizarse modificaciones similares en otras posiciones del oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar en el nucleótido 3'-terminal o en oligonucleótidos 2'-5'-ligados y la posición 5' del nucleótido 5'-terminal. Los oligonucleótidos también pueden presentar sacáridos miméticos, tales como fracciones ciclobutilo, en lugar del sacárido pentafuranosilo. Entre las patentes estadounidenses representativas que enseñan la preparación de dichas estructuras sacáridas modificadas se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, las patentes US n° n° 4.981.957, n° 5.118.800, n° 5.319.080, n° 5.359.044, n° 5.393.878, n° 5.446.137, n° 5.466.786, n° 5.514.785, n° 5.519.134, n° 5.567.811, n° 5.576.427, n° 5.591.722, n° 5.597.909, n° 5.610.300, n° 5.627.053, n° 5.639.873, n° 5.646.265, n° 5.658.873, n° 5.670.633, n° 5.792.747 y n° 5.700.920, las exposiciones de los cuales se incorporan expresamente en la presente memoria como referencia.

Los oligonucleótidos también pueden incluir modificaciones o sustituciones de nucleobases (con frecuencia denominadas en la técnica simplemente como "base"). Tal como se utiliza en la presente memoria, entre las nucleobases "no modificadas" o "naturales" se incluyen las bases purina adenina (A) y guanina, y las bases pirimidina timidina (T), citosina (C) y uracilo (U). Entre las nucleobases modificadas se incluyen otras nucleobases sintéticas y naturales, tales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil-citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil y otros derivados alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil (-C=C-CH₃ o -CH₂-C=CH)-uracilo y otros derivados alquilo de bases pirimidina, 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-uracilos, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-amino-adenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7-deazaadenina y 3-deazaguanina y 3-deazaadenina. Entre las nucleobases modificadas adicionales se incluyen pirimidinas tricíclicas tales como fenoxazina citidina (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxazín-2(3H)-ona), fenotiazina-citidina (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzotiazín-2(3H)-ona), G-clamps, tales como una fenoxazina citidina sustituida (por ejemplo 9-(2-aminoetoxi)-H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxazín-2(3H)-ona), carbazol-citidina (2H-pirimido[4,5-b]indol-2-ona), piridoinol-citidina (H-pirido[3',2':4,5]pirrolo[2,3-d]pirimidín-2-ona). Entre las nucleobases modificadas también pueden incluirse aquellas en las que la base purina o pirimidina se sustituye por otros heterociclos, por ejemplo 7-deaza-adenina, 7-deazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Entre las nucleobases adicionales se incluyen las dadas a conocer en la patente US n° 3.687.808, las dadas a conocer en *The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering*, páginas 858 a 859, Kroschwitz J.I., editor, John Wiley & Sons, 1990, aquellas dadas a conocer por English *et al.*, *Angewandte Chemie, International Edition*, 30:613, 1991. Algunas de estas nucleobases resultan particularmente útiles para incrementar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la invención. Entre ellas se incluyen pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2-sustituidas, N-6-sustituidas y O-6-sustituidas, incluyendo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha demostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina incrementan la estabilidad de los dúplex de ácidos nucleicos en 0,6-1,2°C (Sanghvi *et al.*, *Antisense Research and Applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, páginas 276 a 278) y son sustituciones de base preferentes, todavía más particularmente en combinación con las modificaciones 2'-O-metoxietilo de los sacáridos. Entre las patentes estadounidenses representativas que enseñan la preparación de nucleobases modificadas se incluyen, aunque sin limitarse a ellas: patente US n° 3.687.808, así como las patentes US n° n° 4.845.205, n° 5.130.302, n° 5.134.066, n° 5.175.273, n° 5.367.066, n° 5.432.272, n° 5.457.187, n° 5.459.255, n° 5.484.908, n° 5.502.177, n° 5.525.711, n° 5.552.540, n° 5.587.469, n° 5.594.121, n° 5.596.091, n° 5.614.617, n° 5.645.985, n° 5.830.653, n° 5.763.588, n° 6.005.096, n° 5.681.941 y n° 5.750.692, las exposiciones de las cuales se incorporan en la presente memoria como referencia.

Otra modificación de los oligonucleótidos antisentido que unen químicamente al oligonucleótido una o más fracciones o conjugados que incrementan la actividad, la distribución celular o la incorporación celular del oligonucleótido. Los compuestos de la invención pueden incluir grupos conjugados unidos covalentemente a grupos funcionales, tales como grupos hidroxilo primarios o secundarios. Entre los grupos conjugados de la invención se

incluyen intercalantes, moléculas informadoras, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, poliéteres, grupos que incrementan las propiedades farmacodinámicas de los oligómeros y grupos que incrementan las propiedades farmacocinéticas de los oligómeros. Entre los grupos conjugados típicos se incluyen colesteroles, lípidos, lípidos catiónicos, fosfolípidos, fosfolípidos catiónicos, biotina, fenazina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, coumarinas y pigmentos. Entre los grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas, en el contexto de la presente invención, se incluyen grupos que mejoran la incorporación de los oligómeros, incrementan la resistencia de los oligómeros a la degradación y/o intensifican la hibridación específica de secuencia con el ARN. Entre los grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas, en el contexto de la presente invención, se incluyen grupos que mejoran la incorporación, la distribución, el metabolismo o la excreción de oligómeros. Entre las fracciones conjugadas se incluyen, aunque sin limitación, fracciones lipídicas, tales como una fracción colesterol (Letsinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:6553, 1989), el ácido cólico (Manoharan *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 4:1053, 1994), un tioéter, por ejemplo hexil-S-tritilitol (Manoharan *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 660:306, 1992; Manoharan *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 3:2765, 1993), un tiocolesterol (Oberhauser *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 20:533, 1992), una cadena alifática, por ejemplo residuos dodecandiol o undecilo (Saison-Behmoaras *et al.*, *EMBO J.* 10:1111, 1991; Kabanov *et al.*, *FEBS Lett.* 259:327, 1990; Svinarchuk *et al.*, *Biochimie* 75:49, 1993), un fosfolípido, por ejemplo dihexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 36:3651, 1995; Shea *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 18:3777, 1990), una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan *et al.*, *Nucleosides & Nucleotides* 14:969, 1995) o ácido acético adamantano (Manoharan *et al.*, *Tetrahedron Lett.* 36:3651, 1995), una fracción palmitilo (Mishra *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1264:229, 1995) o una fracción octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol. Los oligonucleótidos de la invención también pueden conjugarse con sustancias farmacológicas activas, por ejemplo aspirina, warfarina, fenilbutazona, ibuprofeno, suprofen, fenbupfeno, quetoprofeno, (S)-(+)-pranoprofeno, carprofeno, dansilsarcosina, ácido 2,3,5-triyodobenzoico, ácido flufenámico, ácido folínico, una benzotiadiazida, clorotiazida, una diazepina, indometicina, un barbitúrico, una cefalosporina, un fármaco sulfa, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico. Los conjugados de oligonucleótido-fármaco y su preparación se describen en la solicitud de patente US nº de ser. 09/334.130 (presentada el 15 de junio de 199) y las patentes estadounidenses nº nº 4.828.979, nº 4.948.882, nº 5.218.105, nº 5.525.465, nº 5.541.313, nº 5.545.730, nº 5.552.538, nº 5.578.717, nº 5.580.731, nº 5.580.731, nº 5.591.584, nº 5.109.124, nº 5.118.802, nº 5.138.045, nº 5.414.077, nº 5.486.603, nº 5.512.439, nº 5.578.718, nº 5.608.046, nº 4.587.044, nº 4.605.735, nº 4.667.025, nº 4.762.779, nº 4.789.737, nº 4.824.941, nº 4.835.263, nº 4.876.335, nº 4.904.582, nº 4.958.013, nº 5.082.830, nº 5.112.963, nº 5.214.136, nº 5.082.830, nº 5.112.963, nº 5.214.136, nº 5.245.022, nº 5.254.469, nº 5.258.506, nº 5.262.536, nº 5.272.250, nº 5.292.873, nº 5.317.098, nº 5.371.241, nº 5.391.723, nº 5.416.203, nº 5.451.463, nº 5.510.475, nº 5.512.667, nº 5.514.785, nº 5.565.552, nº 5.567.810, nº 5.574.142, nº 5.585.481, nº 5.587.371, nº 5.595.726, nº 5.597.696, nº 5.599.923, nº 5.599.928 y nº 5.688.941, cada una de las cuales se incorpora como referencia en la presente memoria.

No resulta necesario que todas las posiciones en un compuesto dado se modifiquen uniformemente y de hecho puede incorporarse más de una de las modificaciones anteriormente indicadas en un único compuesto o incluso en un único nucleósido dentro de un oligonucleótido. La presente invención incluye además compuestos antisentido que son compuestos quiméricos. Los compuestos antisentido "quiméricos" o "quimeras", en el contexto de la presente invención, son compuestos antisentido, particularmente oligonucleótidos, que contienen dos o más regiones químicamente diferentes, constituidas cada una de por lo menos una unidad monomérica, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto oligonucleótido. Estos oligonucleótidos típicamente contienen por lo menos una región en la que el oligonucleótido está modificado de manera que confiera al oligonucleótido una resistencia incrementada a la degradación por nucleasas, una incorporación celular incrementada y/o una afinidad de unión incrementada para el ácido nucleico diana. Una región adicional del oligonucleótido puede servir como sustrato para enzimas capaces de cortar híbridos de ARN:ADN o de ARN:ARN. A título de ejemplo, la ARNasa H es una endonucleasa celular que corta la cadena de ARN de un dúplex de ARN:ADN. Por lo tanto, la activación de la ARNasa H resulta en el corte de la diana de ARN, incrementando de esta manera en gran medida la eficiencia de la inhibición por el oligonucleótido de la expresión génica. En consecuencia, con frecuencia pueden obtenerse resultados comparables con oligonucleótidos más cortos en el caso de que se utilicen oligonucleótidos quiméricos, en comparación con los desoxioligonucleótidos fosforotioato que se hibridan con la misma región diana. Los compuestos antisentido quiméricos de la invención pueden formarse como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleósidos y/o miméticos de oligonucleótido tal como se ha indicado anteriormente. Los oligonucleótidos antisentido quiméricos preferentes incorporan por lo menos un azúcar modificado en 2' (preferentemente 2'-O-(CH₂)₂-O-CH₃) en el extremo 3'-terminal para conferir resistencia a nucleasas y una región con por lo menos 4 azúcares 2'-H contiguos para conferir actividad de ARNasa H. En la técnica dichos compuestos también se han denominado híbridos o gápmeros. Los gápmeros preferentes presentan una región de azúcares 2'-modificados (preferentemente 2'-O-(CH₂)₂-O-CH₃) en el extremo 3'-terminal y en el extremo 5'-terminal separados por como mínimo una región que presenta por lo menos 4 azúcares 2'-H contiguos y que preferentemente incorpora enlaces de esqueleto fosforotioato. Entre las patentes estadounidenses representativas que enseñan la preparación de dichas estructuras híbridas se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, las patentes US nº 5.013.830, nº 5.149.797, nº 5.220.007, nº 5.256.775, nº 5.366.878, nº 5.403.711, nº 5.491.133, nº 5.565.350, nº 5.623.065, nº 5.652.355, nº 5.652.356 y nº 5.700.922, cada una de las cuales se incorpora como referencia en la presente memoria.

Los compuestos antisentido utilizados según la presente invención puede prepararse conveniente y rutinariamente mediante la bien conocida técnica de la síntesis en fase sólida. Los equipos para dicha síntesis son comercializados por varios proveedores, incluyendo, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, Calif.). Pueden utilizarse adicional o alternativamente para dicha síntesis cualesquiera otros medios conocidos de la técnica. Es bien conocida la utilización de técnicas similares para preparar oligonucleótidos, tales como los fosforotioatos y derivados alquilados. Los compuestos de la invención también pueden mezclarse, encapsularse, conjugarse o de otra manera asociarse con otras moléculas, estructuras de molécula o mezclas de compuestos, tal como, por ejemplo, liposomas, moléculas con diana en receptores, formulaciones orales, rectales, tópicas o de otro tipo, para asistir en la incorporación, distribución y/o absorción. Entre las patentes estadounidenses representativas que enseñan la preparación de dichas formulaciones que ayudan a la incorporación, distribución y/o absorción se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, las patentes US nº 5.108.921, nº 5.354.844, nº 5.416.016, nº 5.459.127, nº 5.521.291, nº 5.543.158, nº 5.547.932, nº 5.583.020, nº 5.591.721, nº 4.426.330, nº 4.534.899, nº 5.013.556, nº 5.108.921, nº 5.213.804, nº 5.227.170, nº 5.264.221, nº 5.356.633, nº 5.395.619, nº 5.416.016, nº 5.417.978, nº 5.462.854, nº 5.469.854, nº 5.512.295, nº 5.527.528, nº 5.534.259, nº 5.543.152, nº 5.556.948, nº 5.580.575 y nº 5.595.756, cada una de las cuales se incorpora como referencia en la presente memoria.

Entre otros ejemplos de oligonucleótidos de sentido o antisentido se incluyen aquellos oligonucleótidos que se unen covalentemente a fracciones orgánicas, tales como las indicadas en el documento nº WO 90/10048, y otras fracciones que incrementan la afinidad del oligonucleótido para una secuencia diana de ácidos nucleicos, tal como poli-(L-lisina). Todavía adicionalmente, pueden unirse agentes intercalantes, tales como elipticina y agentes alquilantes o complejos metálicos, a oligonucleótidos de sentido o antisentido para modificar las especificidades de unión del oligonucleótido antisentido o de sentido para la secuencia diana de nucleótidos.

Los oligonucleótidos antisentido o de sentido pueden introducirse en una célula que contiene la secuencia diana de ácidos nucleicos mediante cualquier método de transferencia génica, incluyendo, por ejemplo, la transfección de ADN mediada por CaPO₄, la electroporación o mediante la utilización de vectores de transferencia génica tales como el virus de Epstein-Barr. En un procedimiento preferente, se inserta un oligonucleótido antisentido o de sentido en un vector retroviral adecuado. Se pone en contacto una célula que contiene la secuencia diana de ácidos nucleicos con el vector retroviral recombinante, *in vivo* o *ex vivo*. Entre los vectores retrovirales adecuados se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, los derivados del retrovirus murino M-MuLV, N2 (un retrovirus derivado de M-MuLV) o los vectores de copia doble denominados DCT5A, DCT5B y DCT5C (ver el documento nº WO 90/13641).

También pueden introducirse los oligonucleótidos de sentido o antisentido en una célula que contiene la secuencia diana de nucleótidos mediante la formación de un conjugado con una molécula ligante de ligando, tal como se indica en el documento nº WO 91/04753. Entre las moléculas ligantes de ligando adecuadas se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, receptores de superficie celular, factores de crecimiento, otras citoquinas u otros ligandos que se unen a receptores de superficie celular. Preferentemente, la conjugación de la molécula ligante de ligando no interfiere sustancialmente con la capacidad de la molécula ligante de ligando de unirse a su molécula o receptor correspondiente, o de bloquear la entrada del oligonucleótido de sentido o antisentido o de su versión conjugada en la célula.

Alternativamente, puede introducirse un oligonucleótido de sentido o antisentido en una célula que contiene la secuencia diana de nucleótidos mediante la formación de un complejo de oligonucleótido-lípido, tal como se indica en el documento nº WO 90/10448. El complejo de oligonucleótido de sentido o antisentido-lípido preferentemente es disociado dentro de la célula por una lipasa endógena.

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

Las sondas también pueden utilizarse en técnicas de PCR para generar un pool de secuencias para la identificación de secuencias codificantes de polipéptido estrechamente relacionadas.

Las secuencias de nucleótidos codificantes de un polipéptido también pueden utilizarse para construir sondas de hibridación para el mapeado del gen que codifica el polipéptido y para el análisis genético de individuos con trastornos genéticos. Las secuencias de nucleótidos proporcionadas en la presente memoria pueden localizarse en el mapa de un cromosoma y en regiones específicas de un cromosoma utilizando técnicas conocidas, tales como la hibridación *in situ*, el análisis de ligamientos frente a marcadores cromosómicos conocidos y el cribado por hibridación de bibliotecas.

El polipéptido puede utilizarse en ensayos para identificar otras proteínas o moléculas que participan en una interacción de unión con el polipéptido. Mediante dichos métodos pueden identificarse inhibidores de la interacción de unión de receptor/ligando. Las proteínas que participan en dichas interacciones de unión también pueden utilizarse para cribar para inhibidores péptidos o de molécula pequeña de la interacción de unión. Pueden diseñarse ensayos de cribado para encontrar compuestos cabeza de serie que imiten la actividad biológica de un polipéptido nativo o de un receptor para el polipéptido. Dichos ensayos de cribado incluyen ensayos que permiten el cribado de alto rendimiento de bibliotecas químicas, lo que los hace particularmente adecuados a la identificación de candidatos fármacos de molécula pequeña. Entre las moléculas pequeñas contempladas se incluyen compuestos orgánicos o inorgánicos sintéticos. Los ensayos pueden llevarse a cabo en una diversidad de formatos, incluyendo los ensayos de unión proteína-proteína, ensayos de cribado bioquímico, inmunoensayos y ensayos celulares, los cuales están bien caracterizados en la técnica.

También pueden utilizarse ácidos nucleicos que codifican un polipéptido o sus formas modificadas, para generar animales transgénicos o animales "con inactivaciones génicas" (knock out) que, a su vez, resulten útiles en el desarrollo y cribado de reactivos terapéuticamente útiles. Un animal transgénico (por ejemplo un ratón o una rata) es un animal que presenta células que contienen un transgén, introduciendo el transgén en el animal o en un ancestro del animal en un estadio prenatal, por ejemplo un estadio embrionario. Un transgén es un ADN que se encuentra integrado en el genoma de una célula a partir de la que se desarrolla un animal transgénico. En una realización, puede utilizarse ADNc codificante de un polipéptido para clonar el ADN genómico codificante del polipéptido según técnicas establecidas y utilizarse las secuencias genómicas para generar animales transgénicos que contienen células que expresan ADN codificante del polipéptido. Los métodos para generar animales transgénicos, particularmente animales tales como ratones o ratas, se han convertido en convencionales en la técnica y se describen en, por ejemplo, las patentes US nº 4.736.866 y nº 4.870.009. Típicamente, algunas células particulares son dianas de la incorporación de transgenes de polipéptido con intensificadores específicos de tejido. Pueden utilizarse animales transgénicos que incluyen una copia de un transgén que codifica un polipéptido introducido en la línea germinal del animal en un estadio embrionario con el fin de examinar el efecto de la expresión incrementada del ADN codificante de un polipéptido. Dichos animales pueden utilizarse como animales de ensayo para reactivos que se cree que confieren protección frente a, por ejemplo, condiciones patológicas asociadas a su sobreexpresión. Según dicho aspecto de la invención, se trata un animal con el reactivo y una incidencia reducida de la condición patológica, en comparación con animales no tratados que portan el transgén, indicarían una potencial intervención terapéutica para la condición patológica.

Alternativamente, pueden utilizarse homólogos no humanos de un polipéptido para construir un animal con "knock out" génico que presenta un gen defectivo o alterado codificante del polipéptido como resultado de la recombinación homóloga entre el gen endógeno codificante del polipéptido y ADN genómico alterado codificante del polipéptido introducido en una célula madre embrionaria del animal. Por ejemplo, puede utilizarse ADNc codificante del polipéptido para clonar ADN genómico codificante del polipéptido según técnicas establecidas. Una parte del ADN genómico codificante del polipéptido puede delecionarse o sustituirse por otro gen, tal como un gen codificante de un marcador seleccionable que puede utilizarse para monitorizar la integración. Típicamente, se incluyen en el vector varias kilobases de ADN flanqueante no alterado (tanto en el extremo 5' como en el 3') (ver, por ejemplo, Thomas y Capecchi, Cell 51:503, 1987, para una descripción de los vectores de recombinación homólogos). El vector se introduce en una línea de células madre embrionarias (por ejemplo mediante electroporación) y se seleccionan las células en las que el ADN introducido se ha recombinado homológamente con el ADN endógeno (ver, por ejemplo, Li *et al.*, Cell 69:915, 1992). A continuación, las células seleccionadas se inyectan en un blastocito de un animal (por ejemplo un ratón o una rata) para formar quimeras de agregación (ver, por ejemplo, Bradley, en Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), páginas 113 a 152]. A continuación, puede implantarse un embrión quimérico en un animal hembra nodriza pseudoembarazada adecuado y llevar a término el embrión con el fin de crear un animal "knock out". La progenie que porta el ADN homológamente recombinado en sus células germinales puede identificarse mediante técnicas estándares y utilizarse para criar animales en los que todas las células del animal contienen el ADN homológamente recombinado. Los animales knockout pueden caracterizarse, por ejemplo, por su capacidad de defenderse frente a determinadas condiciones patológicas y por el desarrollo en los mismos de condiciones patológicas causadas por la ausencia del polipéptido. Los ácidos nucleicos codificantes de los polipéptidos también pueden utilizarse en terapia génica. En las aplicaciones de terapia génica, se introducen genes en células con el fin de conseguir la síntesis *in vivo* de un producto génico terapéuticamente eficaz, por ejemplo para la sustitución de un gen defectivo. La "terapia génica" incluye tanto la terapia génica convencional, en la que se consigue un efecto duradero mediante un único tratamiento, y la administración de agentes terapéuticos génicos, que implica la administración de una vez o repetida de un ADN o ARNm terapéuticamente eficaz. Pueden utilizarse ARN y ADN antisentido como agentes terapéuticos para bloquear la expresión de determinados genes *in vivo*. Ya se ha demostrado que pueden importarse oligonucleótidos antisentido cortos en células, en donde actúan como inhibidores, a pesar de sus bajas concentraciones intracelulares causadas por su incorporación restringida por parte de la membrana celular (Zamecnik *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4143-4146, 1986). Los oligonucleótidos pueden modificarse para incrementar su incorporación, por ejemplo mediante sustitución de los grupos fosfodiéster con carga negativa por grupos sin carga.

Existe una diversidad de técnicas disponibles para introducir ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas varían dependiendo de si el ácido nucleico se transfiere al interior de las células en cultivo *in vitro*, o *in vivo* en las células del huésped deseado. Entre las técnicas adecuadas para la transferencia de ácidos nucleicos en células de mamífero *in vitro* se incluyen la utilización de liposomas, electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano, método de precipitación con fosfato de calcio, etc. Entre las técnicas de transferencia génica *in vivo* actualmente preferentes se incluyen la transfección con vectores víricos (típicamente retrovíricos) y la transfección mediada por liposomas de proteínas de la cubierta vírica (Dzau *et al.*, Trends in Biotechnology 11:205-210, 1993). En algunas situaciones resulta deseable que a la fuente de los ácidos nucleicos se le proporcione un agente que dirija las células diana, tal como un anticuerpo específico para una proteína membranal de la superficie celular o la célula diana, un ligando para un receptor sobre la célula diana, etc. En el caso de que se utilicen liposomas, pueden utilizarse proteínas que se unen a una proteína membranal de superficie celular asociada a endocitosis para el reconocimiento y/o para facilitar la incorporación, por ejemplo proteínas de cápside o fragmentos de las mismas con tropismo para un tipo celular particular, anticuerpos de proteínas que experimentan la internalización durante el ciclo, proteínas con diana en una localización intracelular e incrementan la semivida intracelular. La técnica de endocitosis mediada por receptores se describe en, por ejemplo, Wu *et al.*, J. Biol. Chem. 262:4429-4432, 1987, y Wagner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:-3410-3414, 1990. Para una revisión de los protocolos de marcaje génico y de terapia génica, ver Anderson *et al.*, Science 256:808-813, 1992.

Las moléculas de ácidos nucleicos codificantes de los polipéptidos o fragmentos de los mismos indicados en la presente memoria resultan útiles para la identificación cromosómica. A este respecto, existe una necesidad creciente de identificar nuevos marcadores cromosómicos, ya que actualmente se dispone de relativamente pocos reactivos de marcado cromosómico, basándose en los datos de secuencias actuales. Cada molécula de ácidos nucleicos de la presente invención puede utilizarse como un marcador cromosómico.

Las moléculas de polipéptido y de ácido nucleico de la invención pueden utilizarse diagnósticamente para el tipado de tejidos, en el que los polipéptidos pueden expresarse diferencialmente en un tejido en comparación con otro, preferentemente en un tejido enfermo en comparación con un tejido normal del mismo tipo de tejido. Las moléculas de ácidos nucleicos encuentran utilidad para generar sondas para PCR, análisis de transferencia northern, análisis de transferencia southern y análisis de transferencia western.

La presente invención comprende métodos de cribado de compuestos para identificar aquellos que evitan el efecto del polipéptido (antagonistas). Los ensayos de cribado para candidatos fármacos antagonistas están diseñados para identificar compuestos que se unen o se acomplejan con los polipéptidos 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, inhiben la expresión del polipéptido a partir de las células. Dichos ensayos de cribado incluyen ensayos que permiten el cribado de alto rendimiento de bibliotecas químicas, lo que los hace particularmente adecuados a la identificación de candidatos fármacos de molécula pequeña.

Los ensayos pueden llevarse a cabo en una diversidad de formatos, incluyendo los ensayos de unión proteína-proteína, ensayos de cribado bioquímico, inmunoensayos y ensayos celulares, los cuales están bien caracterizados en la técnica.

Todos los ensayos para antagonistas son comunes en el aspecto de que requieren poner en contacto el fármaco candidato con un polipéptido o complejo de polipéptidos bajo condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que interactúen estos componentes.

En los ensayos de unión, la interacción es la unión y puede formarse o detectarse el complejo formado en la mezcla de reacción. En una realización particular, el polipéptido o el fármaco candidato se inmoviliza sobre una fase sólida, por ejemplo en una placa de microtitulación, mediante uniones covalentes o no covalentes. La unión no covalente generalmente se lleva a cabo mediante recubrimiento de la superficie sólida con una solución del polipéptido y el secado. Alternativamente, puede utilizarse un anticuerpo inmovilizado, por ejemplo un anticuerpo monoclonal, específico para el polipéptido que debe inmovilizarse, para anclarlo a una superficie sólida. El ensayo se lleva a cabo mediante la adición del componente no inmovilizado, que puede marcarse con un marcaje detectable, al componente inmovilizado, por ejemplo la superficie recubierta que contiene el componente anclado. Una vez se ha completado la reacción, se eliminan los componentes no reaccionados, por ejemplo mediante lavado, y se detectan los complejos anclados sobre la superficie sólida. En el caso de que el componente originalmente no inmovilizado porte un marcaje detectable, la detección del marcaje inmovilizado sobre la superficie indica que se ha producido un acomplejamiento. En el caso de que el componente originalmente no inmovilizado no porte un marcaje, puede detectarse el acomplejamiento, por ejemplo, mediante la utilización de un anticuerpo marcado de unión específico al complejo inmovilizado.

En el caso de que el compuesto candidato interactúe pero no se una a un polipéptido, su interacción con dicho polipéptido puede someterse a ensayo mediante métodos bien conocidos para la detección de interacciones de proteína-proteína. Entre dichos ensayos se incluyen enfoques tradicionales, tales como, por ejemplo, el entrecruzamiento, la coimmunoprecipitación y la copurificación a través de gradientes o columnas cromatográficas. Además, pueden monitorizarse las interacciones de proteína-proteína mediante la utilización de un sistema genético

basado en levaduras descrito por Fields y colaboradores (Fields y Song, *Nature* (London) 340:245-246, 1989; Chien *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9578-9582, 1991), tal como se da a conocer en Chevray y Nathans, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5789-5793, 1991. Muchos activadores transcripcionales, tales como GAL4 de levadura, consisten de dos dominios modulares físicamente discretos, uno que actúa como el dominio de unión a ADN, y otro que funciona como el dominio de activación de la transcripción. El sistema de expresión levadura indicado en las publicaciones anteriormente indicadas (generalmente denominado "sistema de dos híbridos") aprovecha dicha propiedad y utiliza dos proteínas híbridas, una en la que se fusiona la proteína diana con el dominio de unión a ADN de GAL4, y el otro, en el 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 de GAL4 mediante la interacción de proteína-proteína. Las colonias que contienen polipéptidos interactuantes se detectan con un sustrato cromogénico para la β -galactosidasa. Se encuentra disponible comercialmente de Clontech un kit completo (MATCHMAKER™) para identificar las interacciones de proteína-proteína entre dos proteínas específicas utilizando la técnica de dos híbridos. Dicho sistema también puede extenderse al mapeado de dominios de proteína que participan en interacciones específicas entre proteínas, así como a la identificación de los residuos aminoácidos que son cruciales para dichas interacciones.

Los compuestos que interfieren con la interacción de un gen codificante de un polipéptido identificado en la presente memoria y otros componentes intracelulares o extracelulares pueden someterse a ensayo de la manera siguiente: habitualmente se prepara una mezcla de reacción que contiene el producto del gen y el componente intracelular o extracelular bajo condiciones y durante un tiempo que permite la interacción y la unión de los dos productos. Con el fin de someter a ensayo la capacidad de un compuesto candidato de inhibir la unión, se realiza la reacción en ausencia y en presencia del compuesto de ensayo. Además, puede añadirse un placebo a una tercera mezcla de reacción, que sirva de control positivo. La unión (formación de complejo) entre el compuesto de ensayo y el componente intracelular o extracelular presente en la mezcla se monitoriza tal como se ha indicado anteriormente en la presente memoria. La formación de un complejo en la reacción o reacciones de 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 pareja de reacción.

Con el fin de someter a ensayo para antagonistas, el polipéptido puede añadirse a una célula conjuntamente con el compuesto que debe cribarse para una actividad particular, y la capacidad del compuesto de inhibir la actividad de interés en presencia del polipéptido indica que el compuesto es un antagonista del polipéptido. Alternativamente pueden detectarse los antagonistas mediante la combinación del polipéptido y un antagonista potencial con receptores de polipéptido unidos a membrana o receptores codificados, bajo condiciones apropiadas para un ensayo de inhibición competitivo. El polipéptido puede marcarse, tal como radioactivamente, de manera que pueda utilizarse el número de moléculas de polipéptido unidas al receptor para determinar la efectividad del antagonista potencial. El gen codificante del receptor puede identificarse mediante numerosos métodos conocidos por el experto en la materia, por ejemplo la selección de ligandos y la separación mediante FACS. Coligan *et al.*, *Current Protocols in Immun.* 1(2): capítulo 5, 1991. Preferentemente se utiliza la clonación de expresión, en la que se prepara ARN poliadenilado de una célula sensible al polipéptido y una biblioteca de ADNc creada a partir de dicho ARN se divide en pools y se utiliza para transfectar células COS u otras células que no son sensibles al polipéptido. Las células transfectadas que se cultivan en portaobjetos de vidrio se exponen a polipéptido marcado. El polipéptido puede marcarse mediante una diversidad de medios, incluyendo la yodación o la inclusión de un sitio de reconocimiento para una proteína quinasa específica de sitio. Tras la fijación y la incubación, los portaobjetos se someten a análisis autorradiográfico. Se identifican los pools positivos y se preparan sub-pools y se transfectan nuevamente utilizando un procedimiento interactivo de sub-agrupamiento y re-cribado, rindiendo finalmente un único clon que codifica el receptor putativo.

Entre los ejemplos más específicos de antagonistas potenciales se incluyen anticuerpos, entre ellos, aunque sin limitación, anticuerpos policlonales y monoclonales y fragmentos de anticuerpos, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos antiidiotípicos, y versiones químicas o humanizadas de dichos anticuerpos o fragmentos, así como anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos. Alternativamente, un antagonista potencial puede ser una proteína estrechamente relacionada, por ejemplo una forma mutada del polipéptido que reconoce el receptor pero que no proporciona ningún efecto, inhibiendo competitivamente de esta manera la acción del polipéptido.

Otro antagonista potencial es un constructo de ARN o ADN antisentido preparado utilizando tecnología antisentido, en el que, por ejemplo, una molécula de ARN o ADN antisentido actúa bloqueando directamente la traducción del ARNm mediante la hibridación con ARNm diana y evitando la traducción en proteínas. La tecnología antisentido puede utilizarse para controlar la expresión génica mediante la formación de triples hélices o ADN o ARN antisentido, basándose ambos métodos en la unión de un polinucleótido a ADN o ARN. Por ejemplo, la parte codificante 5' de la secuencia polinucleótida, que codifica los polipéptidos maduros en la presente memoria, puede utilizarse para diseñar un oligonucleótido de ARN antisentido de entre aproximadamente 10 y 40 pares de bases de longitud. Se diseña un oligonucleótido de ADN para que sea complementario de una región del gen que participa en la transcripción (triple hélice - ver Lee *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 6:3073, 1979; Cooney *et al.*, *Science* 241: 456, 1988; Dervan *et al.*, *Science* 251:1360, 1991), evitando de esta manera la transcripción y la producción del polipéptido. Los oligonucleótidos de ARN antisentido se hibridan con el ARNm *in vivo* y bloquean la traducción de la molécula de ARNm en polipéptido (antisentido - Okano, *Neurochem.* 56:560, 1991; Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors

of Gene Expression (CRC Press: Boca Raton, FL, 1988). Los oligonucleótidos indicados anteriormente también pueden administrarse en las células de manera que el ARN o ADN antisentido puede expresarse *in vivo* para inhibir la producción del polipéptido. En el caso de que se utilice ADN antisentido, resultan preferentes los oligodesoxirribonucleótidos derivados del sitio de inicio de la traducción, por ejemplo entre las posiciones aproximadas -10 y +10 de la secuencia génica diana de nucleótidos.

Entre los antagonistas potenciales se incluyen moléculas pequeñas que se unen al sitio activo, el sitio de unión a receptores, o el sitio de unión a factor de crecimiento u otro sitio de unión relevante del polipéptido, bloqueando de esta manera la actividad biológica normal del polipéptido. Entre los ejemplos de moléculas pequeñas se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, péptidos pequeños o moléculas de tipo peptídico, preferentemente péptidos solubles, y compuestos orgánicos o inorgánicos no peptídicos sintéticos.

Los ribozimas son moléculas de ARN enzimático capaces de catalizar el corte específico del ARN. Los ribozimas actúan mediante hibridación específica de secuencia con el ARN diana complementario, seguido del corte endonucleolítico. Los sitios de corte específico con ribozima dentro de una diana de ARN potencial pueden identificarse mediante técnicas conocidas. Para más información ver, por ejemplo, Rossi, Current Biology 4:469-471, 1991, y la publicación de patente PCT nº WO 97/33551 (publicado el 18 de septiembre de 1997).

Las moléculas de ácidos nucleicos 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 dichos oligonucleótidos está diseñada de manera que fomente la formación de triples hélices mediante reglas de apareamiento de bases de Hoogsteen, las cuales generalmente requieren tramos de purinas o pirimidinas en una cadena de un dúplex. Para más información ver, por ejemplo, la publicación de patente PCT nº WO 97/33551, supra.

Dichas moléculas pequeñas pueden identificarse mediante uno o más cualesquiera de los ensayos de cribado comentados anteriormente en la presente memoria y/o mediante cualquier otra técnica de cribado bien conocida por el experto en la materia.

Puede utilizarse un ácido nucleico codificante de polipéptido aislada para producir recombinantemente polipéptidos utilizando técnicas bien conocidas de la técnica y tal como se indica en la presente memoria. A su vez, los polipéptidos producidos pueden utilizarse para generar anticuerpos utilizando técnicas bien conocidas de la técnica y tal como se indica en la presente memoria.

Los anticuerpos de unión específica a un polipéptido identificado en la presente memoria, así como otras moléculas identificadas mediante los ensayos de cribado dados a conocer anteriormente en la presente memoria, pueden administrarse para el tratamiento de diversos trastornos, incluyendo el cáncer, en forma de composiciones farmacéuticas.

En el caso de que el polipéptido sea intracelular y se utilicen anticuerpos completos como inhibidores, resultan preferentes los anticuerpos que se internalicen. Sin embargo, también pueden utilizarse lipofecciones o liposomas para administrar el anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo, en el interior de las células. En el caso de que se utilicen fragmentos de anticuerpo, resultará preferente el fragmento inhibidor de menor tamaño que se una específicamente al dominio de unión de la proteína diana. Por ejemplo, basándose en las secuencias de región variable de un anticuerpo, pueden diseñarse moléculas peptídicas que conserven la capacidad de unirse a la secuencia diana de la proteína. Dichos péptidos pueden sintetizarse químicamente y/o producirse mediante tecnología de ADN recombinante. Ver, por ejemplo, Marasco *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 7889-7893, 1993.

La formulación en la presente memoria también puede contener más de un compuesto activo, según resulte necesario para la indicación particular bajo tratamiento, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no presente efectos mutuos adversos. Alternativamente, o adicionalmente, la composición puede comprender un agente que potencie su función, sin modificación, por ejemplo un agente citotóxico, citoquina, agente quimioterapéutico o agente inhibidor del crecimiento. Dichas moléculas convenientemente se encuentran presentes en combinación en cantidades que resultan eficaces para el propósito pretendido.

Los ejemplos a continuación se proporcionan únicamente con fines ilustrativos, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención en modo alguno.

Ejemplos

Materiales y métodos:

Clonación, expresión y purificación de proteínas recombinantes: el dominio extracelular de la hepsina recombinante humana se expresó y se purificó tal como se ha descrito (Moran *et al.*, 2006). El anticuerpo anti-hepsina Fab25 se expresó y se purificó tal como se ha descrito en la solicitud provisional de patente US copropietaria copendiente nº 61/253.953, presentada el 22 de octubre de 2009. La PEM humana recombinante que comprendía una mutación

C672A para mejorar la expresión y el rendimiento se expresó en células de ovario de hámster chino tal como se ha descrito (Wahl *et al.*, 1997). Se expresó y se purificó KD1 tal como se ha descrito (Shia *et al.*, 2005).

5 *Análisis de la activación in vitro de pro-PEM por la hepsina utilizando SDS-PAGE:* se incubó pro-PEM (25 µg/ml) con diferentes concentraciones de hepsina (1,25 nM, 2,5 nM, 5 nM y 10 nM) en un tampón que contenía Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, Triton-X100 al 0,05% y CaCl₂ 2 mM a 37°C. Se mezclaron alícuotas de la mezcla de reacción en diferentes puntos temporales con tampón para muestras 6X-SDS y las muestras se sometieron a ebullición durante 5 minutos a 95°C y se separaron mediante SDS-PAGE utilizando un gel de gradiente 4-20%. Se visualizaron las proteínas tras la tinción con la tinción SimplyBlue Safe Stain (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se llevaron a cabo experimentos similares con pro-PEM que se había mutado para que no pudiese cortarse en Arg₄₈₃-Val₄₈₄ (pro-PEM-R483E) con el fin de evaluar si el sitio de corte proteolítico se encuentra en un sitio diferente aparte del enlace esperado Arg₄₈₃-Val₄₈₄ en pro-PEM.

15 *Activación de pro-PEM por la hepsina expresada en la superficie celular en células LnCaP:* se generaron células LnCaP-34 tal como se ha descrito (Moran *et al.*, 2006) para sobreexpresar establemente hepsina, resultando en la expresión de hepsina en la superficie celular incrementada en 5 veces y la actividad enzimática de la hepsina incrementada en 3 veces, en comparación con las células LnCaP-17, que sólo expresan hepsina endógena a niveles relativamente bajos, comparables a los de las células LnCaP parentales. Se lavaron células LnCaP-34 confluentes cultivadas en placas de 24 pocillos, con medio RPMI-1640 sin suero y se incubaron solas o con diferentes inhibidores anti-hepsina (1 mM de anticuerpo anti-hepsina Fab25/1 mM de KD1/1 mM de Ac-KQLR-cmk ('KLQR' dado a conocer como SEC ID n° 10) en medio RPMI-1640 sin suero durante 15 minutos a 37°C antes de la adición de pro-PEM marcado con ¹²⁵I (25 µg/ml). Tras incubar durante 3 horas a 37°C, se extrajeron alícuotas y se analizaron mediante SDS-PAGE (gel con gradiente de 4% a 20%) (Invitrogen, Carlsbad, CA) seguido de la exposición en películas de rayos X.

25 *Unión a Ron de pro-PEM activado con hepsina, mediante resonancia del plasmón superficial y ELISA:* con el fin de determinar la afinidad de unión de PEM activado por hepsina a Ron humano, se llevaron a cabo mediciones de resonancia del plasmón superficial en un instrumento BIAcore™-3000 (GE Healthcare, NJ). Se inmovilizó químicamente (acoplamiento de aminas) IgG de conejo antihumana en chips biosensores CM5 y se capturó la proteína de fusión Ron (Sema IPT1)-IgG, proporcionando aproximadamente 250 unidades de respuesta (UR). Para las mediciones de cinética, se inyectaron diferentes concentraciones de PEM activada por hepsina o una PEM disponible comercialmente (R&D Systems) en tampón de HBS-P a 25°C con un caudal de 30 µl/min. Se obtuvieron las tasas de asociación (k_{on}) y de disociación (k_{off}) mediante la utilización de un modelo de unión simple de Langmuir uno a uno (BIA-Evaluation) y se calcularon las constantes de disociación de equilibrio (K_D) (k_{off}/k_{on}). Para los experimentos de ELISA, se recubrieron placas de microtitulación maxiSorp (Nunc, Roskilde, Dinamarca) durante la noche a 4°C con 2 µg/ml de anticuerpo Fc específico de conejo anti-IgG humana (Jackson ImmunoResearch Laboratory, West Grove, PA) en tampón de carbonato sódico 50 mM, pH 9,6. Tras bloquear con tampón de ensayo (PBS, pH 7,4, BSA al 0,5% y Tween-20 al 0,05%, 15 ppm de proclina), se añadió 1 mg/ml de proteína de fusión de Ron (Sema IPT1)-IgG y las placas se incubaron durante 1 hora bajo agitación suave a temperatura ambiente. Tras lavar con tampón de lavado (PBS, polisorbato-20 al 0,05%), se añadieron proteínas PEM etiquetadas con His durante 1 hora. Se detectó la PEM unida utilizando anti-His-HRP (Qiagen, Valencia, CA), seguido de la adición de sustrato TMB/H₂O₂ (KPL, Gaithersburg, MD). La reacción se detuvo con H₃PO₄ 1 M y se midió la A₄₅₀ en un lector de microplacas SpectraMax Plus³⁸⁴ de Molecular Devices (Sunnyvale, CA). Se determinó la concentración efectiva que proporcionaba una unión semimáxima (EC₅₀) utilizando un ajuste de cuatro parámetros utilizando Kaleidagraph (Synergy Software, Reading, PA).

50 *Ensayo de cambio de morfología y quimiotaxis de macrófagos peritoneales:* se obtuvieron macrófagos murinos residentes en el peritoneo, de ratones C57BL/6 mediante lavado de la cavidad peritoneal con 15 ml por ratón de medio RPMI-1640 sin suero. Las células se lavaron y se resuspendieron en medio RPMI-1640 que contenía Hepes 25 mM a una concentración de 1x10⁶ células/ml. Se llevó a cabo el ensayo de quimiotaxis de macrófagos utilizando un kit de ensayo de quimiotaxis QCM con un tamaño de poro de 5 µm (Millipore). Se añadieron cien microlitros de la suspensión de macrófagos peritoneales (es decir, 10⁵ células) a los pocillos superiores de las celdas de Chemotaxis. Los pocillos del fondo se rellenaron con medio RPMI-1640 que contenía pro-PEM purificado solo o tratado con hepsina a 37°C durante 2 horas. La forma activa recombinante de la PEM humana (R&D Systems) se utilizó a modo de control positivo. Tras la incubación a 37°C durante 4 horas, se desprendieron las células sobre la superficie celular de la membrana con un hisopo de algodón y las células migradas se desprendieron utilizando un tampón para el desprendimiento siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se incubaron alícuotas de diferentes pocillos con una mezcla de tampón de lisis y pigmento CYPRO durante 15 minutos. Se cuantificó la migración mediante medición de la fluorescencia utilizando un lector de microplacas (Spectramax-M5, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) a una longitud de onda de excitación de 480 nm y una longitud de onda de emisión de 520 nm.

65 Con el fin de evaluar el efecto de PEM sobre la morfología, se cultivaron los macrófagos peritoneales (1x10⁶ células/ml) en medio RPMI-1640 sin suero durante la noche. Tras la incubación, se eliminaron las células no adherentes y se añadió al medio de cultivo pro-PEM (1,0 nM), solo o pretratado con hepsina. Tras una incubación adicional a 37°C durante 1 hora, se observaron mediante microscopía de contraste de fases los cambios morfológicos de los macrófagos.

Inhibición de la síntesis de NO por PEM maduras: Se pipetearon células de médula ósea obtenidas de fémures de ratón recogidos, en una suspensión de células individuales y se pelletizaron. Se lisaron los glóbulos rojos mediante incubación con tampón de lisis de eritrocitos durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se suspendieron las células en medio de diferenciación de macrófagos (DMEM con glutamina que contenía FBS al 10%, 1X Pen/Strep y 50 ng/ml de mCSF-1 recombinante). A continuación, se sembraron en placa las células, en placas de cultivo estéril no de tejidos de 24 pocillos. Se cambió el medio al día siguiente y posteriormente cada 2 días. Tras 6 días de cultivo, los macrófagos estaban maduros y estas células maduras se lavaron en DMEM sin suero y se incubaron adicionalmente durante 2 horas. Se añadieron diferentes reacciones (volumen total: 300 µl) tal como se indica en la figura que consistían de PEM recombinante (10 ng/ml), pro-PEM (10 ng/ml), hepsina (1 nM) y Fab25 (500 nM) a los pocillos respectivos y se cultivaron durante 24 horas a 37°C en un incubador de cultivos de tejidos. Se cuantificó la producción de NO utilizando la reacción de Griess (Molecular Probes) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Inmunotransferencia para la detección de quinasas fosforiladas: se utilizó una línea celular de carcinoma ovárico humana (A2780) sobreexpresante de Ron humano para estudiar la fosforilación de Ron y otras quinasas posteriores. Se cultivaron las células a una densidad de 2×10^5 células/pocillo en placas de 12 pocillos y se sometieron a ayuno de suero durante 24 horas. A continuación, se estimularon las células con pro-PEM (10 y 50 ng/ml) solo o en presencia de hepsina 10 nM durante 1 hora. A modo de controles se utilizó PEM maduro procedente de una fuente comercial y hepsina. Las muestras se prepararon mediante lavado dos veces de las células con PBS frío, seguido de la adición de 200 µl de tampón de lisis. A continuación, las muestras se analizaron mediante SDS-PAGE en geles de tris-glicina al 4-12% (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y posteriormente se trataron con anticuerpo anti-Ron o anticuerpo anti-fosfo-AKT o anticuerpo anti-fosfo-MAPK o anticuerpo anti-fosfo-S6, durante la noche a 4°C. Tras el lavado, las membranas se incubaron con IgG de cabra antiratón conjugado con IRDye800 (Rockland, Gilbertsville, PA) e IgG de cabra anticonejo con AlexaFluor 680 (Invitrogen) durante 1 h. Las proteínas se detectaron con el sistema de obtención de imágenes de infrarrojos Odyssey (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE).

Resultados

Activación *in vitro* de la pro-PEM por hepsina recombinante

Una secuencia de consenso basada en el perfilado de sustrato para la hepsina mediante EP-BCS (escaneo posicional de bibliotecas combinatoriales sintética) reveló una preferencia para P4-P1 como (P/K)-(K/Q)-(T/L/N)-R (Herter *et al.*, 2005). Resulta evidente a partir de la lista de sustratos de hepsina anteriormente identificados (Kazama *et al.*, 1995; Kirchhofer *et al.*, 2005; Moran *et al.*, 2006; Tripathi *et al.*, 2008) (Tabla 1), que las secuencias de sitio de corte concuerdan mayoritariamente con el perfilado de sustratos de EP-BCS. En particular, las secuencias de reconocimiento de sustrato de proHGF (KQLR↓V) (SEC ID nº 11) y Ln-332 (SQLR↓L) (SEC ID nº 12) son estrechamente similares a la secuencia de corte de pro-PEM (SKLR↓V) (SEC ID nº 1). Sin embargo, dicho razonamiento no permite explicar por qué otro zimógeno, pro-tPA, es un mal sustrato de la hepsina, debido a que la secuencia de reconocimiento es un híbrido de las de pro-HGF y pro-uPA (Tabla 1).

Sustratos de la hepsina	Secuencia de reconocimiento	SEC ID nº
Pro-PEM	SKLR↓V	1
Pro-HGF	KQLR↓V	11
Ln-332	SQLR↓L	12
Pro-uPA	PRFK↓I	13
FVII	PQGR↓I	14
EP-BCS	(P/K)-(K/Q)-(T/L/N)-R	
Sustratos resistentes a la hepsina		
Pro-tPA	PQFR↓I	15
Plasminógeno	CPGR↓V	16

↓ indica sitios de corte

La hepsina activó la pro-PEM de una manera dependiente de la dosis y del tiempo tras la incubación con diferentes concentraciones de hepsina a 37°C. Se realizó un seguimiento de la activación a partir del desplazamiento de la movilidad en gel en un SDS-PAGE con gradiente de 4% a 20% de Tris-glicina bajo condiciones reductoras (fig. 1). Los productos de corte se analizaron mediante secuenciación N-terminal para identificar el sitio de procesamiento. El corte proteolítico de pro-PEM por la hepsina se produjo en el enlace Arg483-Val484, resultando en la formación de una PEM (α/β) heterodimérica activa. Se expresó y se purificó un mutante de sitio de corte de pro-PEM (pro-PEM-

R483E) y se sometió a procesamiento proteolítico con hepsina. La hepsina no cortó dicho pro-PEM mutante a pesar de la incubación prolongada (24 horas), confirmando nuevamente la especificidad de la activación.

Activación de pro-PEM por hepsina expresada sobre la superficie celular

Se monitorizó el procesamiento proteolítico de pro-PEM por hepsina expresada nativamente sobre la superficie celular en la línea celular LnCap-34 (Moran *et al.*, 2006). Las células LnCap-34 expresantes de hepsina fueron capaces de procesar ¹²⁵I-pro-PEM (fig. 2). La actividad proteolítica de procesamiento de pro-PEM se debía principalmente a la hepsina, ya que la totalidad de los tres inhibidores de hepsina (Ac-KQLR-clorometilcetona ('KQLR', dada a conocer como SEC ID n° 10), KD1 y Fab25) bloquearon eficazmente el corte proteolítico.

Actividad biológica de PEM activada por hepsina

Unión de PEM a Ron

Los presentes inventores utilizaron la resonancia del plasmón superficial (BIAcore) para determinar la afinidad de unión de la PEM a Ron humana. El corte proteolítico de pro-PEM de cadena sencilla resulta crítico para la unión al receptor Ron. Ni pro-PEM ni el mutante de sitio de corte (pro-PEM-R483E) presentaban ninguna unión detectable a Ron hasta una concentración de 1 mM. En contraste, la PEM activada por hepsina mostró una unión de alta afinidad a Ron ($K_D=7$ nM) (fig. 3a). La afinidad de la PEM activada por hepsina era muy similar a la de la PEM disponible comercialmente ($K_D=4,4$ nM). Además, los presentes inventores midieron la unión de PEM a Ron en experimentos de ELISA. La concentración eficaz determinada para proporcionar una unión semimáxima (EC_{50}) fue de 0,519 nM (fig. 3b).

Fosforilación de quinasas posteriores en la ruta de PEM/RON

Se realizó un seguimiento de los efectos biológicos de pro-PEM tratado con hepsina sobre la ruta de señalización de Ron mediante el seguimiento de la fosforilación de las quinasas posteriores, incluyendo la proteína quinasa activada por mitógeno (PAM) y la proteína S6 quinasa ribosómica. Ni la hepsina ni pro-PEM solas resultaron eficaces en la activación de la ruta de señalización de Ron, mientras que pro-PEM tratado con hepsina mostró una fosforilación robusta de tanto la PAM quinasa como la quinasa S6 de una manera dependiente de la dosis. El grado de fosforilación en pro-PEM tratada con hepsina era comparable a la de una muestra de PEM madura de una fuente comercial.

Ensayo de cambio de morfología de los macrófagos peritoneales y ensayo de quimiotaxis

La actividad biológica de PEM activada por hepsina se evaluó adicionalmente en cultivos de macrófagos primarios. La PEM madura es conocido que causa cambios morfológicos característicos en los macrófagos. Tras la estimulación con PEM activada con hepsina, los macrófagos peritoneales experimentaron claros cambios de forma celular, puestos de manifiesto en la protrusión y elongación (fig. 5). El efecto de la PEM activada por hepsina fue comparable al de una PEM disponible comercialmente, así como PEM activada por HGFA.

En el ensayo de quimiotaxis, el tratamiento de pro-PEM con hepsina condujo a un incremento significativo ($p<0,001$) de la migración de los macrófagos peritoneales (fig. 6) y el efecto fue comparable al de la PEM madura de un proveedor comercial. El pretratamiento con un inhibidor antihepsina mostró una reducción marcada de la migración de los macrófagos.

Inhibición de la síntesis de óxido nítrico (NO)

Wang *et al.* han demostrado anteriormente que la PEM madura es capaz de bloquear el incremento del ARNm de la óxido nítrico sintasa de los macrófagos y su incremento asociado en la producción de NO en respuesta a una diversidad de estímulos (Wang *et al.*, 1994a). Los macrófagos de la médula ósea de ratón primarios mostraron una producción robusta de óxido nítrico en respuesta a LPS. La PEM activada por hepsina atenuó significativamente la producción de NO en macrófagos derivados de la médula ósea (fig. 7) y este efecto resultó completamente inhibido en presencia del anticuerpo anti-hepsina, mientras que pro-PEM por sí solo no inhibió dicha respuesta.

Lista parcial de referencias

- Betsunoh H, Mukai S, Akiyama Y, Fukushima T, Minamiguchi N, Hasui Y, Osada Y y Kataoka H. (2007). *Cancer Sci*, 98, 491-498.
- Bhatt AS, Welm A, Farady CJ, Vasquez M, Wilson K y Craik CS. (2007). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 5771-6.
- Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D, Shah R, Varambally S, Kurachi K, Pienta KJ, Rubin MA y Chinnaiyan AM. (2001). *Nature*, 412, 822-6.
- Herter S, Piper DE, Aaron W, Gabriele T, Cutler G, Cao P, Bhatt AS, Choe Y, Craik CS, Walker N, Meininger D, Hoey T y Austin RJ. (2005). *Biochem J*, 390, 125-36.
- Kawaguchi M, Oriyawa H, Baba T, Fukushima T y Kataoka H. (2009). *Febs J*, 276, 3481-90.
- Kazama Y, Hamamoto T, Foster DC y Kisiel W. (1995). *J Biol Chem*, 270, 66-72.

- Kirchhofer D, Peek M, Lipari MT, Billeci K, Fan B y Moran P. (2005). FEBS Lett, 579, 1945-50.
 Leonard EJ y Danilkovitch A. (2000). Adv Cancer Res, 77, 139-67.
 Luo J, Duggan DJ, Chen Y, Sauvageot J, Ewing CM, Bittner ML, Trent JM e Isaacs WB. (2001). Cancer Res, 61, 4683-8.
- 5 Magee JA, Araki T, Patil S, Ehrig T, True L, Humphrey PA, Catalona WJ, Watson MA y Milbrandt J. (2001). Cancer Res, 61, 5692-6.
 Matsuo T, Nakamura K, Takamoto N, Kodama J, Hongo A, Abrzua F, Nasu Y, Kumon H y Hiramatsu Y. (2008). Anticancer Res, 28, 159-64.
 Moran P, Li W, Fan B, Vij R, Eigenbrot C y Kirchhofer D. (2006). J Biol Chem, 281, 30439-46.
- 10 Morrissey C, True LD, Roudier MP, Coleman IM, Hawley S, Nelson PS, Coleman R, Wang YC, Corey E, Lange PH, Higano CS y Vessella RL. (2008). Clin Exp Metastasis, 25, 377-88.
 Netzel-Arnett S, Hooper JD, Szabo R, Madison EL, Quigley JP, Bugge TH y Antalis TM. (2003). Cancer Metastasis Rev, 22, 237-58.
 Shia S, Stamos J, Kirchhofer D, Fan B, Wu J, Corpuz RT, Santell L, Lazarus RA y Eigenbrot C. (2005). J Mol Biol, 15 346, 1335-49.
 Skeel A, Yoshimura T, Showalter SD, Tanaka S, Appella E y Leonard EJ. (1991). J Exp Med, 173, 1227-34.
 Stamey TA, Warrington JA, Caldwell MC, Chen Z, Fan Z, Mahadevappa M, McNeal JE, Nolley R y Zhang Z. (2001). J Urol, 166, 2171-7.
 Stephan C, Yousef GM, Scorilas A, Jung K, Jung M, Kristiansen G, Hauptmann S, Kishi T, Nakamura T, Loening SA y Diamandis EP. (2004). J Urol, 171, 187-91.
- 20 Tanimoto H, Yan Y, Clarke J, Korourian S, Shigemasa K, Parmley TH, Parham GP y O'Brien TJ. (1997). Cancer Res, 57, 2884-7.
 Tripathi M, Nandana S, Yamashita H, Ganesan R, Kirchhofer D y Quaranta V. (2008). J Biol Chem, 283, 30576-84.
 Wagh PK, Peace BE and Waltz SE. (2008). Adv Cancer Res, 100, 1-33.
- 25 Wahl RC, Costigan VJ, Batac JP, Chen K, Cam L, Courchesne PL, Patterson SD, Zhang K y Pacifici RE. (1997). J Biol Chem, 272, 15053-6.
 Wang MH, Cox GW, Yoshimura T, Sheffler LA, Skeel A y Leonard EJ. (1994a). J Biol Chem, 269, 14027-31.
 Wang MH, Gonias SL, Skeel A, Wolf BB, Yoshimura T y Leonard EJ. (1994b). J Biol Chem, 269, 13806-10.
 Wang MH, Skeel A y Leonard EJ. (1996). J Clin Invest, 97, 720-7.
- 30 Wang MH, Yoshimura T, Skeel A y Leonard EJ. (1994c). J Biol Chem, 269, 3436-40.
 Welsh JB, Sapinoso LM, Su AI, Kern SG, Wang-Rodriguez J, Moskaluk CA, Frierson HF, Jr. and Hampton GM. (2001). Cancer Res, 61, 5974-8.
 Wu Q and Parry G. (2007). Front Biosci, 12, 5052-9.
- 35 Xuan JA, Schneider D, Toy P, Lin R, Newton A, Zhu Y, Finster S, Vogel D, Mintzer B, Dinter H, Light D, Parry R, Polokoff M, Whitlow M, Wu Q y Parry G. (2006). Cancer Res, 66, 3611-9.
 Yoshimura T, Yuhki N, Wang MH, Skeel A y Leonard EJ. (1993). J Biol Chem, 268, 15461-8.
 Zacharski LR, Ornstein DL, Memoli VA, Rousseau SM y Kisiel W. (1998). Thromb Haemost, 79, 876-7.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 40 <110> GENENTECH, INC. *et al.*
- <120> MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA MODULAR LA ACTIVACIÓN CON HEPSINA DE LA PROTEÍNA ESTIMULADORA DE MACRÓFAGOS
- 45 <130> P4379R1 WO
- <140>
 <141>
- 50 <150> 61/253,990
 <151> 2009-10-22
- <160> 20
- 55 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Unknown
- 60 <220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de Desconocido: secuencia de corte de Pro-PEM"
- 65 <400> 1

ES 2 564 207 T3

Ser Lys Leu Arg Val
1 5

<210> 2
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 2

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ala Val Ala
1 5 10

5 <210> 3
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 3

Ser Ala Ser Ser Leu Tyr Ser
1 5

15 <210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 4

Gln Gln Tyr Tyr Ser Ser Tyr Tyr Leu Leu Thr
1 5 10

25 <210> 5
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<400> 5

Gly Phe Asn Phe Ser Tyr Ser Tyr Met His
1 5 10

35 <210> 6
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

45 <400> 6

Ala Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

ES 2 564 207 T3

<210> 7
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <221> origen
 <223> /note="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"

10

<400> 7

```

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

Tyr Ser Lys Gly Leu Asp Tyr
                20
  
```

<210> 8
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

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

20

<400> 8

```

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

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

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

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

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

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

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

<210> 9
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

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

30

<400> 9

```

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe Ser Tyr Ser
                20                               25                               30

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
                35                               40                               45

Ala Ser Ile Tyr Ser Tyr Tyr Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50                               55                               60
  
```

ES 2 564 207 T3

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Asp Ser Trp Ser Tyr Lys Ser Gly Tyr Thr Gln Lys Ile
 100 105 110
 Tyr Ser Lys Gly Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 115 120 125
 Ser Ser
 130

<210> 10
 <211> 4
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido sintético"
 10 <400> 10

Lys Gln Leu Arg
1

<210> 11
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de desconocido: secuencia de reconocimiento de sustrato ProHGF "
 20 <400> 11

Lys Gln Leu Arg Val
1 5

<210> 12
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de desconocido: secuencia de reconocimiento de sustrato Ln-332"
 30 <400> 12

Ser Gln Leu Arg Leu
1 5

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

<220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de desconocido: secuencia de reconocimiento de sustrato Pro-uPA"
 40 <400> 13

Pro Arg Phe Lys Ile
1 5

<210> 14
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de desconocido: secuencia de reconocimiento de sustrato FVII"
 10 <400> 14

 Pro Gln Gly Arg Ile
 1 5
 <210> 15
 <211> 5
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> origen
 20 <223> /nota="Descripción de desconocido: secuencia de reconocimiento de sustrato Pro-tPA"

 <400> 15

 Pro Gln Phe Arg Ile
 1 5
 25 <210> 16
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <221> origen
 <223> /nota="Descripción de desconocido: secuencia de reconocimiento de sustrato plasminógeno"

 <400> 16
 35

 Cys Pro Gly Arg Val
 1 5
 <210> 17
 <211> 7
 <212> PRT
 40 <213> Homo sapiens

 <400> 17

 Val Val Gly Gly His Pro Gly
 1 5
 45 <210> 18
 <211> 417
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 50 <400> 18

ES 2 564 207 T3

Met Ala Gln Lys Glu Gly Gly Arg Thr Val Pro Cys Cys Ser Arg Pro
 1 5 10 15

Lys Val Ala Ala Leu Thr Ala Gly Thr Leu Leu Leu Leu Thr Ala Ile
 20 25 30

Gly Ala Ala Ser Trp Ala Ile Val Ala Val Leu Leu Arg Ser Asp Gln
 35 40 45

Glu Pro Leu Tyr Pro Val Gln Val Ser Ser Ala Asp Ala Arg Leu Met
 50 55 60

Val Phe Asp Lys Thr Glu Gly Thr Trp Arg Leu Leu Cys Ser Ser Arg
 65 70 75 80

Ser Asn Ala Arg Val Ala Gly Leu Ser Cys Glu Glu Met Gly Phe Leu
 85 90 95

Arg Ala Leu Thr His Ser Glu Leu Asp Val Arg Thr Ala Gly Ala Asn
 100 105 110

Gly Thr Ser Gly Phe Phe Cys Val Asp Glu Gly Arg Leu Pro His Thr
 115 120 125

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

Phe Leu Ala Ala Ile Cys Gln Asp Cys Gly Arg Arg Lys Leu Pro Val
 145 150 155 160

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

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

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

ES 2 564 207 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu

<210> 19
 <211> 476
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 19

10 Met Ala Gln Lys Glu Gly Gly Arg Thr Val Pro Cys Cys Ser Arg Pro
 1 5 10 15

ES 2 564 207 T3

Lys Val Ala Ala Leu Thr Ala Gly Thr Leu Leu Leu Leu Thr Ala Ile
 20 25 30
 Gly Ala Ala Ser Trp Ala Ile Val Ala Val Leu Leu Arg Ser Asp Gln
 35 40 45
 Glu Pro Leu Tyr Pro Val Gln Val Ser Ser Ala Asp Ala Arg Leu Met
 50 55 60
 Val Phe Asp Lys Thr Glu Gly Thr Trp Arg Leu Leu Cys Ser Ser Arg
 65 70 75 80
 Ser Asn Ala Arg Val Ala Gly Leu Ser Cys Glu Glu Met Gly Phe Leu
 85 90 95
 Arg Ala Leu Thr His Ser Glu Leu Asp Val Arg Thr Ala Gly Ala Asn
 100 105 110
 Gly Thr Ser Gly Phe Phe Cys Val Asp Glu Gly Arg Leu Pro His Thr
 115 120 125
 Gln Arg Leu Leu Glu Val Ile Ser Val Cys Asp Cys Pro Arg Gly Arg
 130 135 140
 Phe Leu Ala Ala Ile Cys Gln Gly Glu Ile Leu Lys Leu Arg Thr Leu
 145 150 155 160
 Ser Phe Arg Pro Leu Gly Arg Pro Arg Pro Leu Lys Leu Pro Arg Met
 165 170 175
 Gly Pro Cys Thr Phe Arg Pro Pro Arg Ala Gly Pro Ser Leu Gly Ser
 180 185 190
 Gly Asp Leu Gly Ser Ser Pro Leu Ser Pro Pro Pro Ala Asp Pro Cys
 195 200 205
 Pro Thr Asp Cys Gly Arg Arg Lys Leu Pro Val Asp Arg Ile Val Gly
 210 215 220
 Gly Arg Asp Thr Ser Leu Gly Arg Trp Pro Trp Gln Val Ser Leu Arg
 225 230 235 240
 Tyr Asp Gly Ala His Leu Cys Gly Gly Ser Leu Leu Ser Gly Asp Trp
 245 250 255
 Val Leu Thr Ala Ala His Cys Phe Pro Glu Arg Asn Arg Val Leu Ser
 260 265 270

ES 2 564 207 T3

Arg Trp Arg Val Phe Ala Gly Ala Val Ala Gln Ala Ser Pro His Gly
 275 280 285

Leu Gln Leu Gly Val Gln Ala Val Val Tyr His Gly Gly Tyr Leu Pro
 290 295 300

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

His Leu Ser Ser Pro Leu Pro Leu Thr Glu Tyr Ile Gln Pro Val Cys
 325 330 335

Leu Pro Ala Ala Gly Gln Ala Leu Val Asp Gly Lys Ile Cys Thr Val
 340 345 350

Thr Gly Trp Gly Asn Thr Gln Tyr Tyr Gly Gln Gln Ala Gly Val Leu
 355 360 365

Gln Glu Ala Arg Val Pro Ile Ile Ser Asn Asp Val Cys Asn Gly Ala
 370 375 380

Asp Phe Tyr Gly Asn Gln Ile Lys Pro Lys Met Phe Cys Ala Gly Tyr
 385 390 395 400

Pro Glu Gly Gly Ile Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Phe
 405 410 415

Val Cys Glu Asp Ser Ile Ser Arg Thr Pro Arg Trp Arg Leu Cys Gly
 420 425 430

Ile Val Ser Trp Gly Thr Gly Cys Ala Leu Ala Gln Lys Pro Gly Val
 435 440 445

Tyr Thr Lys Val Ser Asp Phe Arg Glu Trp Ile Phe Gln Ala Ile Lys
 450 455 460

Thr His Ser Glu Ala Ser Gly Met Val Thr Gln Leu
 465 470 475

<210> 20
 <211> 711
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 20

Met Gly Trp Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Thr Gln Cys Leu Gly Val
 1 5 10 15

Pro Gly Gln Arg Ser Pro Leu Asn Asp Phe Gln Val Leu Arg Gly Thr
 20 25 30

ES 2 564 207 T3

Glu Leu Gln His Leu Leu His Ala Val Val Pro Gly Pro Trp Gln Glu
 35 40 45
 Asp Val Ala Asp Ala Glu Glu Cys Ala Gly Arg Cys Gly Pro Leu Met
 50 55 60
 Asp Cys Arg Ala Phe His Tyr Asn Val Ser Ser His Gly Cys Gln Leu
 65 70 75 80
 Leu Pro Trp Thr Gln His Ser Pro His Thr Arg Leu Arg Arg Ser Gly
 85 90 95
 Arg Cys Asp Leu Phe Gln Lys Lys Asp Tyr Val Arg Thr Cys Ile Met
 100 105 110
 Asn Asn Gly Val Gly Tyr Arg Gly Thr Met Ala Thr Thr Val Gly Gly
 115 120 125
 Leu Pro Cys Gln Ala Trp Ser His Lys Phe Pro Asn Asp His Lys Tyr
 130 135 140
 Thr Pro Thr Leu Arg Asn Gly Leu Glu Glu Asn Phe Cys Arg Asn Pro
 145 150 155 160
 Asp Gly Asp Pro Gly Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Ala Val
 165 170 175
 Arg Phe Gln Ser Cys Gly Ile Lys Ser Cys Arg Glu Ala Ala Cys Val
 180 185 190
 Trp Cys Asn Gly Glu Glu Tyr Arg Gly Ala Val Asp Arg Thr Glu Ser
 195 200 205
 Gly Arg Glu Cys Gln Arg Trp Asp Leu Gln His Pro His Gln His Pro
 210 215 220
 Phe Glu Pro Gly Lys Phe Leu Asp Gln Gly Leu Asp Asp Asn Tyr Cys
 225 230 235 240
 Arg Asn Pro Asp Gly Ser Glu Arg Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro
 245 250 255
 Gln Ile Glu Arg Glu Phe Cys Asp Leu Pro Arg Cys Gly Ser Glu Ala
 260 265 270
 Gln Pro Arg Gln Glu Ala Thr Thr Val Ser Cys Phe Arg Gly Lys Gly
 275 280 285

ES 2 564 207 T3

Glu Gly Tyr Arg Gly Thr Ala Asn Thr Thr Thr Ala Gly Val Pro Cys
 290 295 300

Gln Arg Trp Asp Ala Gln Ile Pro His Gln His Arg Phe Thr Pro Glu
 305 310 315 320

Lys Tyr Ala Cys Lys Asp Leu Arg Glu Asn Phe Cys Arg Asn Pro Asp
 325 330 335

Gly Ser Glu Ala Pro Trp Cys Phe Thr Leu Arg Pro Gly Met Arg Ala
 340 345 350

Ala Phe Cys Tyr Gln Ile Arg Arg Cys Thr Asp Asp Val Arg Pro Gln
 355 360 365

Asp Cys Tyr His Gly Ala Gly Glu Gln Tyr Arg Gly Thr Val Ser Lys
 370 375 380

Thr Arg Lys Gly Val Gln Cys Gln Arg Trp Ser Ala Glu Thr Pro His
 385 390 395 400

Lys Pro Gln Phe Thr Phe Thr Ser Glu Pro His Ala Gln Leu Glu Glu
 405 410 415

Asn Phe Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Ser His Gly Pro Trp Cys Tyr
 420 425 430

Thr Met Asp Pro Arg Thr Pro Phe Asp Tyr Cys Ala Leu Arg Arg Cys
 435 440 445

Ala Asp Asp Gln Pro Pro Ser Ile Leu Asp Pro Pro Asp Gln Val Gln
 450 455 460

Phe Glu Lys Cys Gly Lys Arg Val Asp Arg Leu Asp Gln Arg Arg Ser
 465 470 475 480

Lys Leu Arg Val Val Gly Gly His Pro Gly Asn Ser Pro Trp Thr Val
 485 490 495

Ser Leu Arg Asn Arg Gln Gly Gln His Phe Cys Gly Gly Ser Leu Val
 500 505 510

Lys Glu Gln Trp Ile Leu Thr Ala Arg Gln Cys Phe Ser Ser Cys His
 515 520 525

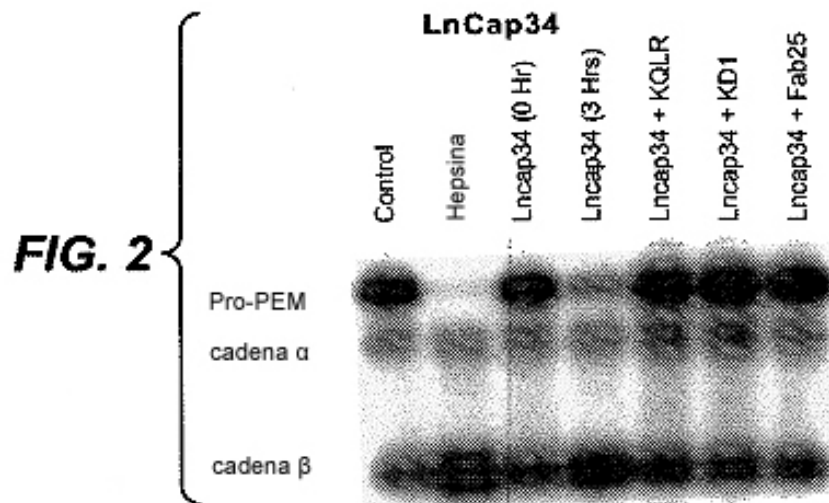
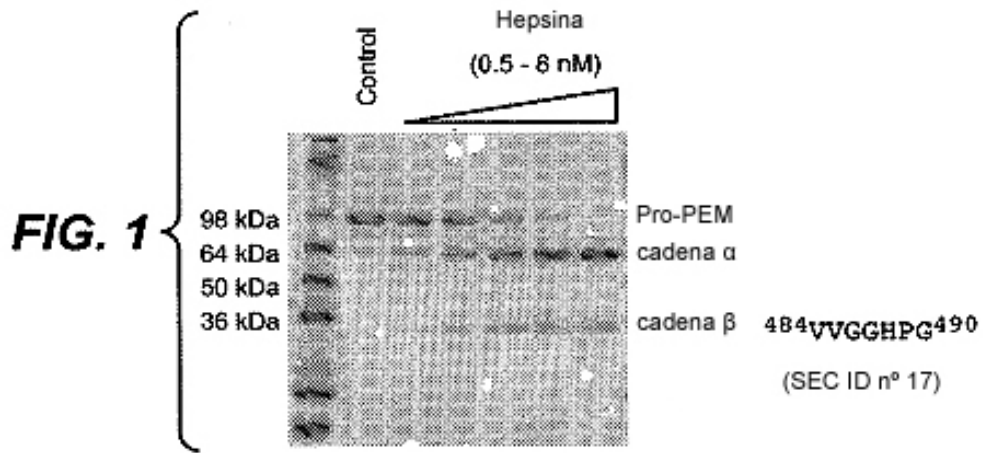
Met Pro Leu Thr Gly Tyr Glu Val Trp Leu Gly Thr Leu Phe Gln Asn
 530 535 540

ES 2 564 207 T3

Pro Gln His Gly Glu Pro Ser Leu Gln Arg Val Pro Val Ala Lys Met
 545 550 555 560
 Val Cys Gly Pro Ser Gly Ser Gln Leu Val Leu Leu Lys Leu Glu Arg
 565 570 575
 Ser Val Thr Leu Asn Gln Arg Val Ala Leu Ile Cys Leu Pro Pro Glu
 580 585 590
 Trp Tyr Val Val Pro Pro Gly Thr Lys Cys Glu Ile Ala Gly Trp Gly
 595 600 605
 Glu Thr Lys Gly Thr Gly Asn Asp Thr Val Leu Asn Val Ala Leu Leu
 610 615 620
 Asn Val Ile Ser Asn Gln Glu Cys Asn Ile Lys His Arg Gly Arg Val
 625 630 635 640
 Arg Glu Ser Glu Met Cys Thr Glu Gly Leu Leu Ala Pro Val Gly Ala
 645 650 655
 Cys Glu Gly Asp Tyr Gly Gly Pro Leu Ala Cys Phe Thr His Asn Cys
 660 665 670
 Trp Val Leu Glu Gly Ile Ile Ile Pro Asn Arg Val Cys Ala Arg Ser
 675 680 685
 Arg Trp Pro Ala Val Phe Thr Arg Val Ser Val Phe Val Asp Trp Ile
 690 695 700
 His Lys Val Met Arg Leu Gly
 705 710

REIVINDICACIONES

1. Método de identificación de una sustancia inhibidora candidata que inhibe la activación por hepsina de la pro-proteína estimuladora de macrófagos (pro-PEM), comprendiendo dicho método: (a) poner en contacto una sustancia candidata con una primera muestra que comprende hepsina y un sustrato pro-PEM, y (b) comparar la cantidad de activación de sustrato pro-PEM en la muestra con la cantidad de activación de sustrato pro-PEM en una muestra de referencia que comprende cantidades similares de hepsina y sustrato pro-PEM a las de la primera muestra pero que no ha sido puesta en contacto con dicha sustancia candidata, de manera que una reducción de la cantidad de activación de sustrato pro-PEM en la primera muestra en comparación con la muestra de referencia indica que la sustancia candidata es capaz de inhibir la activación por hepsina de la PEM de cadena sencilla (pro-PEM).
2. Método según la reivindicación 1, en el que la hepsina en la muestra se encuentra en una cantidad eficaz para activar dicho pro-PEM.
3. Método según la reivindicación 1, en el que el sustrato pro-PEM es un polipéptido que comprende pro-PEM o fragmento del mismo que comprende una forma de tipo salvaje del enlace peptídico Arg₄₈₃-Val₄₈₄.



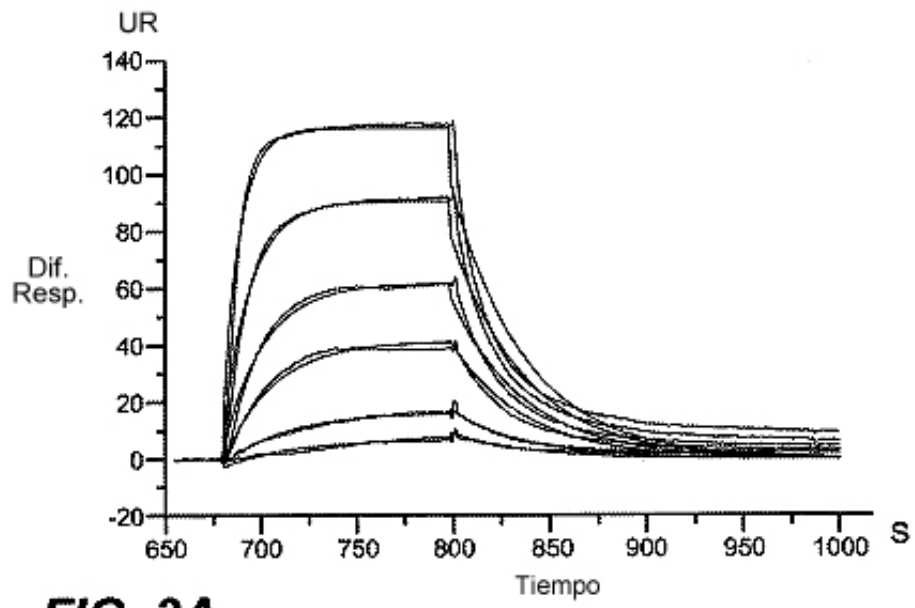


FIG. 3A

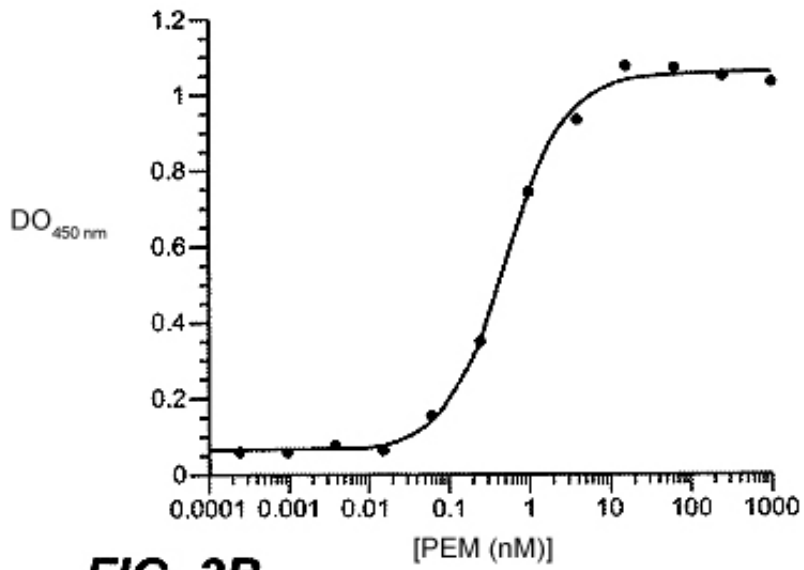


FIG. 3B

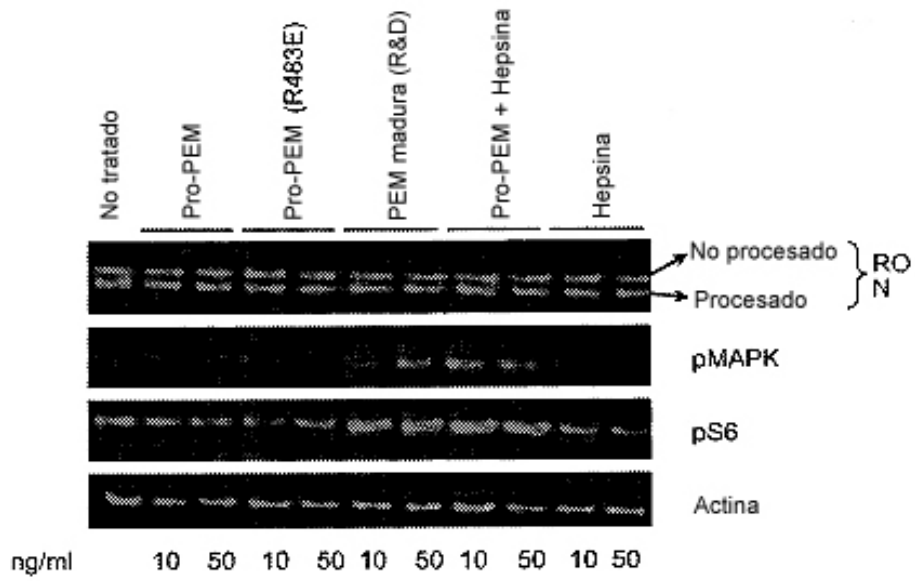


FIG. 4

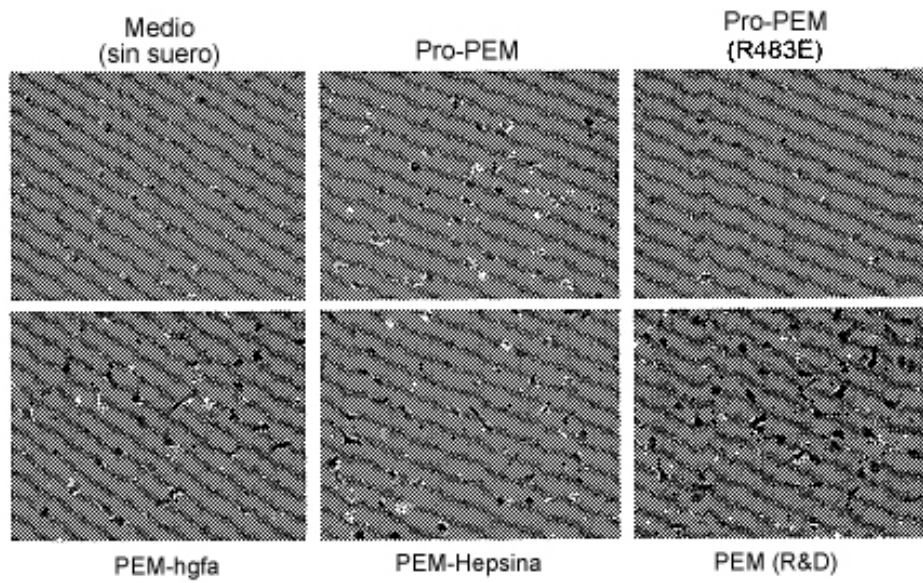


FIG. 5

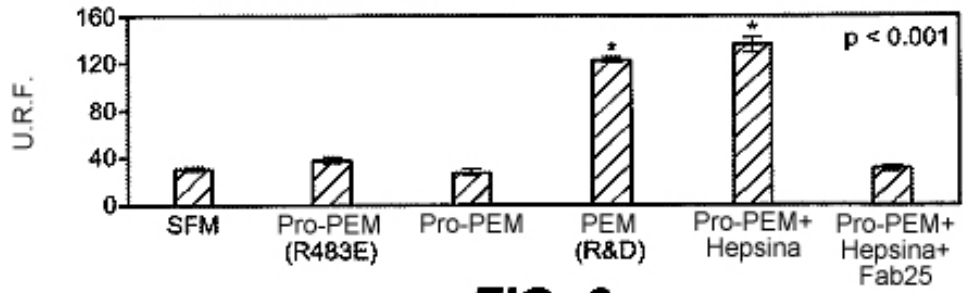


FIG. 6

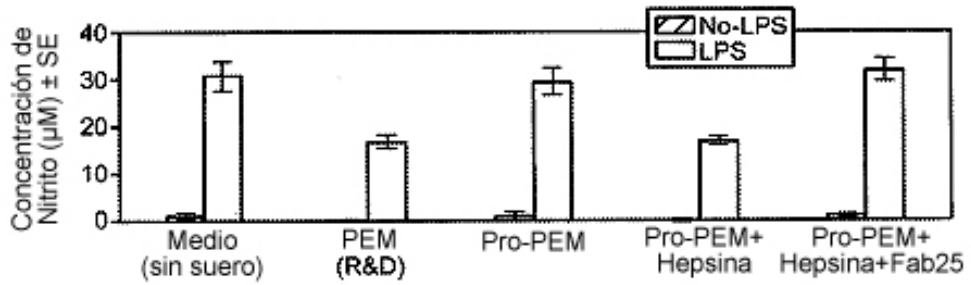


FIG. 7

MAQKEGGRTVPCCSRPKVAALTAGTLLLLTAIGAASWAIIVALLRSDQEFLYPVQVSSAD
 ARLMVFDKTEGTWRLLCSSRSNARVAGLSCEEMGFLRALTHSELDVVRTAGANGTSGFFCV
 DEGRLPHTQRLLLEVISVCDPCRGRFLAAICQDCGRRKLPVDRIVGGRTSLGRWPWQVSL
 RYDGAHLCCGGSLLSGDWLTAHCFPERNRVLSRWRVPAGAVAQASPHGLQLGVQAVVYH
 GGYLPFRDFNSEENSNDIALVHLSSPLPLTEYIQPVCLPAAGQALVDGKICTVTGWGNTQ
 YYGQQAGVLQEARVPIISNDVCNGADFYGNQIKPKMFCAGYPEGGIDACQGDSSGGPFVCE
 DSISRTPRWRLCGIVSWGFGCALAQKPGVYTKVSDFREWIFQAIKTHSEASGMVTQL
 (SEC ID n° 18)

FIG. 8

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

FIG. 9A

```

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

```

(SEC ID n° 19)

FIG. 9B

MGWLPLLLLL TQCLGVPGQR SPLNDFQVLR GTELQHLLHA VVPGPWQEDV ADAEECAGRC
GPLMDCRAFH YNVSSHGCQL LPWTQHSPTH RLRRSGRCDL FQKKDYVRTC IMNNGVGYRG
TMATTVGGLP CQAWSHKFPN DHKYTPTLRN GLEENFCRNP DGDPPGGPWCY TTDPAVRFQS
CGIKSCREAA CVWCNGEYR GAVDRTEGSR ECQRWDLQHP HQHPFEPGKF LDQGLDDNYC
RNPDGSERPW CYTTDPQIER EFCDLPRCGS EAQPRQEATT VSCFRGKGEK YRGTANTTTA
GVPCQRWDAQ IPHQHRFTPE KYACKDLREN FCRNPDGSEA PWCFTLRPGM RAAFVYQIRR
CTDDVRPQDC YHGAGEQYRG FVSKTRKGVQ CQRMSAETPH KPQFTFTSEP HAQLEENFCR
NPDGDSHGFW CYTMDPRTPF DYCALRRCAD DQPPSILDFP DQVQFEKCGK RVDRLDQRRS
KLRVVGHPG NSPWTVSLRN RQGQHFCCGS LVKEQWILTA RQCFSSCHMP LTGYEVWLGT
LFQNPQHGEF SLQRVPVAKM VCGPSGSQLV LLKLETSVTL NQRVALICLP PEWYVVPVGT
KCEIAGWGET KGTGNDTVLN VALLNVISNQ ECNIKHRGRV RESEMCTEGL LAPVGACEGD
YGGPLACFTH NCWVLEGIII PNRVCARSRW PAVFTRVSVF VDWIHKVMRL G

(SEC ID n° 20)

FIG. 10