

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 615 256**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/30** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.06.2012 PCT/IB2012/001680**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2013 WO2013001369**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.06.2012 E 12770215 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.12.2016 EP 2726094**

54 Título: **Objetivo terapéutico y de diagnóstico**

30 Prioridad:

**28.06.2011 US 201161502160 P**

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

**06.06.2017**

73 Titular/es:

**OXFORD BIOTHERAPEUTICS LTD. (100.0%)  
94A Innovation Drive, Milton Park  
94A Milton Park Abingdon, Oxon OX14 4RY, GB**

72 Inventor/es:

**ROHLFF, CHRISTIAN y  
STAMPS, ALASDAIR**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 615 256 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

Objetivo terapéutico y de diagnóstico

## 5 Introducción

La presente invención se refiere a la identificación de proteína de membrana asociada con leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica crónica de células B, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón y cáncer de páncreas que tiene utilidad como objetivo terapéutico para el tratamiento del cáncer o como marcador para tales cánceres. Particularmente, la proteína representa un objetivo biológico contra el cual pueden prepararse reactivos de afinidad que incluyen anticuerpos terapéuticos u otros agentes farmacéuticos. La invención se refiere también al uso de tales reactivos de afinidad para el tratamiento o diagnóstico del cáncer tales como leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica crónica de células B, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón o cáncer pancreático. La descripción se refiere también a la reducción de la expresión celular inmune de la proteína usando por ejemplo, anticuerpos monoclonales para tratar enfermedades inflamatorias.

Antecedentes de la invención

20 Los principales retos en el tratamiento de la leucemia mieloide aguda (AML), la leucemia linfocítica crónica de células B, el cáncer de mama, el cáncer colorrectal, el cáncer de riñón, el cáncer de cabeza y cuello, el cáncer de pulmón y el cáncer de páncreas son mejorar las tasas de detección temprana, para encontrar nuevos marcadores no invasivos que pueden usarse para seguir la progresión de la enfermedad e identificar la recaída y para encontrar terapias mejoradas y menos tóxicas, especialmente para las enfermedades más avanzadas donde la supervivencia a 5 años sigue siendo poca. Existe una gran necesidad de identificar objetivos que sean más específicos para las células cancerosas, por ejemplo, que se expresan en la superficie de las células tumorales para que puedan ser atacados por nuevos enfoques prometedores como inmunoterapéuticos y toxinas orientadas.

30 La solicitud de patente de Estados Unidos núm. US2009/232822 describe métodos para diagnosticar y detectar enfermedades asociadas con el pulmón. Proporciona una o más proteínas o fragmentos, péptidos o moléculas de ácido nucleico que se expresan diferencialmente en la enfermedad pulmonar (LCAT) y los anticuerpos que se unen a las LCAT. Se proporcionan además, los métodos para tratar la enfermedad asociada con el pulmón.

35 La patente de Estados Unidos núm. US6,414,113 describe los péptidos capaces de unirse a BST-1 y los péptidos capaces de unirse a BST-1 e inhibir la actividad de ADP-ribosil ciclasa y actividad de cADP-ribosa hidrolasa. Los péptidos son útiles para el tratamiento de la artritis reumatoide y del mieloma múltiple.

40 Ortolan, E., y otros, (2010), J Natl Cancer Inst, Vol.102, págs.1160-1177, describe la función de CD157 en el control de la migración de células de cáncer ovárico y la invasión peritoneal y que puede ser útil como herramienta pronóstica y objetivo terapéutico.

45 El inventor ha mostrado que BST1 se expresa en monocitos y granulocitos, los cuales pueden asociarse y activarse en enfermedades tales como asma, gota, crohns, lupus y diabetes. Los monocitos están implicados también en el desarrollo de las placas ateroscleróticas. No se ha informado previamente que BST1 se origina a partir de las membranas celulares de la leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica crónica de células B, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón o cáncer de páncreas y representa una proteína de nuevo valor terapéutico y diagnóstico.

Breve descripción de la invención

50 La presente invención describe la detección de la ADP-ribosil ciclasa 2, de aquí en lo adelante denominada como BST1, en extractos de membrana de diversos tejidos patológicos, por ejemplo, la leucemia mieloide aguda (AML), la leucemia linfocítica crónica de células B, el cáncer de mama, el cáncer colorrectal, el cáncer de riñón, el cáncer de cabeza y cuello, el cáncer de pulmón y el cáncer de páncreas, de aquí en lo adelante denominadas 'las enfermedades de la invención', pero no en los extractos de membranas de tejidos normales.

60 La expresión diferencial de BST1 en diversos cánceres permite que la proteína sea focalizada como la base para el reactivo de afinidad, por ejemplo, las terapias basadas en anticuerpos, para tales cánceres. Por lo tanto, BST1 asociado al cáncer puede usarse en la generación de reactivos de afinidad, incluyendo anticuerpos, que se unen específicamente a BST1 y pueden orientarse por tales reactivos de afinidad como base del tratamiento. En el tratamiento del cáncer pueden emplearse reactivos de afinidad, incluyendo anticuerpos, que se dirigen a una proteína en la superficie celular de células cancerosas, a través de una diversidad de mecanismos, que incluyen (i) la lisis por citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo o mediada por complemento (ADCC) (ii) lisis por fármacos o toxinas conjugadas a tales anticuerpos o (iii) inhibición de la función fisiológica de dicha proteína, que puede estar impulsando el crecimiento de las células cancerosas, por ejemplo a través de las vías de señalización. Un aspecto importante de este tratamiento basado en anticuerpos es que el perfil de expresión normal de la proteína objetivo, en términos de distribución en el tejido y nivel

de expresión, es tal que cualquier orientación del anticuerpo sobre la proteína objetivo en los tejidos normales no da lugar a efectos adversos a través de la unión a tejidos normales.

La variante humana de longitud completa de BST1 se muestra en la sec. con núm. de ident.: 1.

5

La presente invención demuestra la asociación de BST1 con diversos cánceres y la generación de los anticuerpos específicos para BST1. Tales anticuerpos se han utilizado para verificar el perfil de expresión de BST1 mediante inmunohistoquímica y análisis de citometría de flujo, lo que revela la presencia, a través unión específica, de BST1 en la superficie celular de diversos tejidos cancerígenos y la ausencia de BST1 en tejidos normales. Además, se ha demostrado que tales anticuerpos cumplen los requisitos de los agentes anticancerígenos citolíticos a través de su unión a la superficie celular de las líneas celulares de cáncer, la internalización tras la unión a líneas celulares de cáncer, la unión *ex-vivo* de las células vivas a las células malignas y, crucialmente, su capacidad de matar las células cancerosas mediante la internalización de una toxina.

10

15

La invención proporciona un reactivo de afinidad que se une a BST1 para uso en el tratamiento o profilaxis del cáncer en donde la BST1 se expresa en dicho cáncer.

El cáncer es preferentemente una de las enfermedades de la invención.

20

La invención proporciona también un reactivo de afinidad como se define en las reivindicaciones que se une a BST1 para uso en el tratamiento o profilaxis de un cáncer como se describió anteriormente.

25

La invención proporciona también el uso de un reactivo de afinidad que se define en las reivindicaciones que se une a BST1 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de un cáncer como se describió anteriormente.

Los reactivos de afinidad para su uso en la invención se unen preferentemente específicamente a BST1.

30

El reactivo de afinidad es un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo completo, o un fragmento funcional del mismo o un anticuerpo mimético. Los reactivos de afinidad preferidos incluyen anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos monoclonales.

El reactivo de afinidad puede ser un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo de simple cadena, un anticuerpo defucosilado o un anticuerpo biespecífico.

35

Los fragmentos de anticuerpos funcionales incluyen un Unicuerpo, un dominio del anticuerpo o un Nanocuerpo.

Los miméticos de anticuerpos incluyen un Afficuerpo, una DARPina, una Anticalina, un Avimero, un Versacuerpo o una Duocalina.

40

Los reactivos de afinidad para su uso en la invención pueden contener o conjugarse con una porción terapéutica, tal como una porción citotóxica o un isótopo radiactivo. El reactivo de afinidad puede ser un anticuerpo conjugado a fármaco o un inmunocjugado.

45

En el uso de la invención, el reactivo de afinidad puede inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o puede provocar citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). El reactivo de afinidad puede inducir la apoptosis de las células tumorales, matar o reducir el número de células madre cancerosas y/o matar o reducir el número de células tumorales circulantes. Los reactivos de afinidad pueden modular la función fisiológica de BST1, que inhibe la unión al ligando y/o inhibe las vías de transducción de señales.

50

Se describe también en la presente descripción un método para el tratamiento o profilaxis del cáncer en donde la BST1 se expresa en dicho cáncer, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente hibridante capaz de hibridar con el ácido nucleico que codifica BST1.

55

Se describe también un agente hibridante capaz de hibridarse con el ácido nucleico que codifica BST1 para su uso en el tratamiento o profilaxis de un cáncer como se describió anteriormente.

Se describe también el uso de un agente hibridante capaz de hibridarse con el ácido nucleico que codifica BST1 en la elaboración de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de un cáncer como se describió anteriormente.

60

Los agentes hibridantes se unen preferentemente específicamente al ácido nucleico que codifica la BST1.

El agente hibridante adecuado para su uso incluye el ARN inhibidor, el ARN pequeño de interferencia (siARN), el ARN de horquilla pequeña (shARN), el microARN (miARN), y el ácido nucleico antisentido o el ADN complementario (ADNc), oligonucleótidos y ribozimas.

65

La invención proporciona también un método para detectar, diagnosticar y/o tamizar de cáncer en donde la BST1 se

expresa en dicho cáncer, o para controlar el efecto de un fármaco o terapia de cáncer en donde la BST1 se expresa en dicho cáncer, en un sujeto que comprende detectar la presencia o nivel de BST1, o uno o más de sus fragmentos, o que comprende detectar un cambio en su nivel en dicho sujeto.

5 Tal método puede comprender detectar la presencia de BST1, o uno o más de sus fragmentos, en los cuales o bien (a) la presencia de un nivel elevado de BST1 o uno o más de sus fragmentos en el sujeto en comparación con el nivel en un sujeto sano, o (b) la presencia de un nivel detectable de BST1 o uno o más de dichos fragmentos en el sujeto en comparación con un nivel indetectable correspondiente en un sujeto sano es indicativo de la presencia de cáncer en donde la BST1 se expresa en dicho cáncer, en dicho sujeto.

10 La invención proporciona también un método para detectar, diagnosticar y/o tamizar el cáncer en donde la BST1 se expresa en dicho cáncer, o para controlar el efecto de un fármaco o terapia de cáncer en donde la BST1 se expresa en dicho cáncer, en un sujeto que comprende detectar la presencia o nivel de anticuerpos capaces de unirse inmunoespecíficamente a BST1, o uno o más de sus fragmentos.

15 En los métodos de diagnóstico de conformidad con la descripción, la presencia de BST1, o uno o más de sus fragmentos, o la presencia o nivel de anticuerpos capaces de unión inmunoespecífica a BST1, o uno o más de sus fragmentos, se detecta mediante el análisis de una muestra biológica Obtenido del sujeto.

20 La presencia de BST1, o uno o más de sus fragmentos, puede detectarse usando un reactivo de afinidad que se une a BST1. El reactivo de afinidad puede ser cualquier reactivo de afinidad adecuado como se mencionó anteriormente. El reactivo de afinidad puede contener o estar conjugado con un marcador detectable.

25 En cualquiera de los aspectos de la invención mencionados anteriormente, el sujeto puede ser un ser humano.

Se describe también un método para identificar un agente para el tratamiento o profilaxis de cáncer en donde la BST1 se expresa en dicho cáncer, en donde el método comprende (a) poner en contacto a BST1, o uno o más de sus fragmentos, con un agente candidato; y (b) determinar si el agente se une a BST1, o uno o más de sus fragmentos. El método puede comprender también la etapa de probar la capacidad de un agente que se une a BST1, o uno o más de sus fragmentos, para inhibir el cáncer en donde la BST1 se expresa en dicho cáncer.

30 Los agentes identificados que utilizan el método son preferentemente para el tratamiento o profilaxis de las enfermedades de la invención.

35 Los agentes identificados usando tales métodos pueden ser moléculas pequeñas y pueden modular la actividad de BST1, reducir la unión del ligando a BST1.

En las diversas modalidades de la invención descritas en la presente descripción, los tipos de cáncer particulares que pueden mencionarse son una de las enfermedades de la invención.

40 En una modalidad, el cáncer que se detecta, previene o trata es la leucemia mieloide aguda (AML).

En otra modalidad, el cáncer que se detecta, previene o trata es el cáncer de mama.

45 En otra modalidad, el cáncer que se detecta, previene o trata es el cáncer colorrectal.

En otra modalidad, el cáncer que se detecta, previene o trata es el cáncer de riñón.

50 En otra modalidad, el cáncer que se detecta, previene o trata es el cáncer de cabeza y cuello.

En otra modalidad, el cáncer que se detecta, previene o trata es cáncer de pulmón, por ejemplo cáncer de pulmón de células no pequeñas y/o cáncer de pulmón de células pequeñas.

55 En otra modalidad, el cáncer que se detecta, previene o trata es el cáncer de páncreas.

Otros aspectos de la presente invención se exponen más abajo y en las reivindicaciones de la presente invención.

#### Breve descripción de las figuras

60 Las Figuras 1a, 1b, 1c, 1d y 1e muestran la secuencia de aminoácidos de la proteína de la descripción. Se subrayan los péptidos en tándem experimentalmente detectados por LCMS están subrayados.

Las Figuras 2 muestran la secuencia de aminoácidos de la proteína de la descripción. Se subrayan los péptidos en tándem experimentalmente detectados por iTRAQ en cáncer de pulmón de células no pequeñas están subrayados.

65 Las Figuras 3a y 3b muestran los resultados del análisis de perfil de ARN de BST1. La Figura 3c muestra los resultados del perfil comparativo de RT-PCR en un conjunto de tejidos normales que muestran expresión de BST1 junto con CD33.

La Figura 4a muestra los resultados del análisis de citometría de flujo de BST1 en pacientes con AML. La Figura 4b muestra los resultados del análisis de citometría de flujo de BST1 y CD33 en un subconjunto de leucocitos humanos. La Figura 4c muestra los resultados del análisis por citometría de flujo de BST1 en las células A549 y H226.

5 Las Figuras 5a a 5b muestran la internalización de los anticuerpos monoclonales anti-BST1 en las células A549 y H226, usando el ensayo de MabZAP.  
Figura 6a y 6b.

Descripción detallada de la invención

10 La presente invención proporciona métodos y composiciones para su uso en el tamizaje, diagnóstico y terapia de las enfermedades de la invención, estratificación de los pacientes, para controlar la efectividad de las enfermedades del tratamiento de la invención, se describen también los métodos para el desarrollo de fármacos para el tratamiento de las enfermedades de la invención.

15 La invención descrita en detalle más abajo, abarca la administración de composiciones terapéuticas a un sujeto, por ejemplo un sujeto mamífero, para tratar o prevenir el cáncer, por ejemplo, las enfermedades de la invención. La invención proporciona también métodos y composiciones para el tamizaje clínico y el diagnóstico de cáncer, por ejemplo, las enfermedades de la invención en un sujeto mamífero para identificar los pacientes más propensos a responder a un tratamiento terapéutico en particular, para controlar los resultados del cáncer, por ejemplo, las enfermedades de la terapia de la invención, para el tamizaje de fármacos y el desarrollo de fármacos.

20 En un aspecto, la invención proporciona un agente capaz de unirse específicamente a BST1, o su fragmento, o un agente capaz de detectar la actividad de BST1 para su uso en el tratamiento, tamizaje, detección y/o diagnóstico de las enfermedades tales como cáncer, y especialmente las enfermedades de la invención.

25 Se describe también, un reactivo de afinidad capaz de unirse específico a BST1 o su fragmento, por ejemplo, un reactivo de afinidad que contiene o se conjuga con un marcador detectable o contiene o se conjuga con una porción terapéutica tal como una porción citotóxica. El reactivo de afinidad puede, por ejemplo, ser un anticuerpo.

30 Los reactivos de afinidad para uso en la invención pueden unirse a un epítipo de BST1 que comprende una o más de las porciones de la sec. con núm. de ident.: 13.

Se describe también una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un reactivo de afinidad capaz de unirse específicamente a BST1 o su fragmento.

35 Se describe también el uso de un polipéptido BST1, o uno o más de sus fragmentos o derivados, para el tratamiento o profilaxis de, por ejemplo, las enfermedades de la invención.

40 Se describe también el uso de un polipéptido de BST1, o uno o más de sus fragmentos o derivados, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento o profilaxis de, por ejemplo, las enfermedades de la invención.

45 Se describe también un método de tratamiento que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de BST1, uno o más de sus fragmentos o derivados, o uno o más de sus fragmentos o derivados del mismo, para el tratamiento o profilaxis de, por ejemplo, las enfermedades de la invención.

50 Se describe también un método para el tratamiento o profilaxis de, por ejemplo, las enfermedades de la invención en un sujeto, o para vacunar un sujeto, contra por ejemplo las enfermedades de la invención, que comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de un polipéptido de BST1 y/o uno o más de sus fragmentos antigénicos o inmunogénicos, por ejemplo, como una vacuna.

El sujeto mamífero puede ser un mamífero no humano, pero generalmente es humano, tal como un humano adulto, es decir, un sujeto humano de al menos 21 (por ejemplo, al menos 35, al menos 50, al menos 60, al menos 70, o al menos 80) años de edad.

55 Se describe también una composición capaz de inducir una respuesta inmune en un sujeto, cuya composición comprende un polipéptido BST1 y/o uno o más de sus fragmentos antigénicos o inmunogénicos y uno o más adyuvantes adecuados (se discuten adyuvantes adecuados más abajo).

60 La composición capaz de inducir una respuesta inmune puede proporcionarse, por ejemplo, como una vacuna que comprende un polipéptido de BST1 o sus derivados, y/o uno o más de sus fragmentos antigénicos o inmunogénicos.

65 Para claridad de la descripción, y no a modo de limitación, la invención se describirá con respecto al análisis de tejido mieloide, mamario, colorrectal, renal, pulmonar o pancreático. Sin embargo, como apreciará una persona con experiencia en la técnica, los ensayos y técnicas descritos más abajo pueden aplicarse a otros tipos de muestras de pacientes, que incluyen fluidos corporales (por ejemplo sangre, orina o saliva), una muestra de tejido de un paciente en riesgo de tener las enfermedades de la invención (por ejemplo, una biopsia tales como una biopsia mieloide, mamaria,

colorrectal, renal, pulmonar o pancreática) o un homogenado de la misma. Los métodos y composiciones de la presente invención son especialmente adecuados para el tamizaje y diagnóstico de un sujeto vivo, pero pueden usarse también para el diagnóstico postmortem en un sujeto, por ejemplo, para identificar miembros de la familia en riesgo para desarrollar la misma enfermedad.

5

Se describe en la presente invención un método para preparar un anticuerpo anti-BST1, dicho método que comprende las etapas de: obtener una célula huésped que contiene una o más moléculas de ácido nucleico que codifican el anticuerpo de la descripción; cultivar la célula huésped en un cultivo de células huésped; proporcionar las condiciones de cultivo de las células huésped en donde se expresan una o más moléculas de ácido nucleico; y recuperar el anticuerpo de la célula huésped o del cultivo de células huésped.

10

Otras descripciones se refieren a métodos para preparar los anticuerpos de la descripción, que comprenden las etapas de: inmunizar un animal transgénico que comprende los genes de la inmunoglobulina humana con un péptido BST1; recuperar las células B de dicho animal transgénico; preparar hibridomas a partir de dichas células B; seleccionar los hibridomas que expresan anticuerpos que se unen a BST1; y recuperar dichos anticuerpos que se unen a BST1 de dichos hibridomas seleccionados.

15

En otros ejemplos, el método para preparar anticuerpos anti-BST1, comprende las etapas de:

(a) inmunizar un animal transgénico que comprende genes de inmunoglobulina humana con un péptido BST1;

20

(b) recuperar el ARNm de las células B de dicho animal transgénico;

(c) convertir dicho ARNm en ADNc;

(d) expresar dicho ADNc en fagos tal que los anticuerpos anti-BST1 codificados por dicho ADNc se presenten en la superficie de dichos fagos;

25

(e) seleccionar los fagos que presentan anticuerpos anti-BST1;

(f) recuperar las moléculas de ácido nucleico de dichos fagos seleccionados que codifican dichas inmunoglobulinas anti-BST1;

(g) expresar dichas moléculas de ácido nucleico recuperadas en una célula huésped; y

(h) recuperar de dicha célula huésped los anticuerpos que se unen a BST1.

30

Se describe también el uso de un polipéptido BST1, o uno o más de sus fragmentos o derivados inmunogénicos, para el tratamiento o profilaxis de, por ejemplo, las enfermedades de la invención.

Se describen además métodos para tratar, por ejemplo las enfermedades de la invención, que comprenden administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que modula (por ejemplo, sobrerregula o regula negativamente) o complementa la expresión o la actividad biológica (o ambas) de la proteína de la descripción en pacientes que tienen, por ejemplo, las enfermedades de la invención, para (a) prevenir el inicio o desarrollo de, por ejemplo, las enfermedades de la invención; (b) prevenir la progresión de, por ejemplo las enfermedades de la invención; o (c) mejorar los síntomas de, por ejemplo las enfermedades de la invención.

35

De conformidad con otro aspecto de la invención, se proporciona un método para detectar, diagnosticar y/o tamizar las enfermedades de la invención o para controlar el efecto de, por ejemplo un fármaco anticancerígeno o terapia dirigida hacia las enfermedades de la invención en un sujeto que comprende detectar la presencia o el nivel de BST1, o uno o más de sus fragmentos o la presencia o nivel de actividad de BST1 o que comprende detectar un cambio del nivel de la misma en dicho sujeto.

40

De conformidad con otro aspecto de la invención, se proporciona un método para detectar, diagnosticar y/o seleccionar, por ejemplo las enfermedades de la invención en un sujeto candidato que comprende detectar la presencia de BST1, o uno o más de sus fragmentos o la presencia de la actividad de BST1 en dicho sujeto candidato, en el que ya sea (a) la presencia de un nivel elevado de BST1 o uno o más de dichos fragmentos o la presencia de un nivel elevado de actividad BST1 en el sujeto candidato en comparación con el nivel en un sujeto sano o (b) la presencia de un nivel detectable de BST1 o uno o más de dichos fragmentos o la presencia de un nivel detectable de actividad BST1 en el sujeto candidato en comparación con un nivel indetectable correspondiente de un sujeto sano indica la presencia de, por ejemplo, las enfermedades de la invención en dicho sujeto.

50

Además, en la presente invención se describe un método para controlar la progresión de, por ejemplo las enfermedades de la invención en un sujeto o para controlar el efecto de, por ejemplo un fármaco anticancerígeno o terapia dirigida hacia las enfermedades de la invención que comprende detectar la presencia de BST1, o uno o más de sus fragmentos, o la presencia del ácido nucleico que codifica BST1 o la presencia de la actividad de BST1 en dicho sujeto candidato en un primer intervalo de tiempo y en un intervalo de tiempo posterior, la presencia de un nivel elevado o reducido de BST1 o uno o más de dichos fragmentos o un nivel elevado o reducido del ácido nucleico que codifica BST1 o la presencia de un nivel elevado o reducido de la actividad de BST1 en el sujeto en el intervalo de tiempo posterior en comparación con el nivel en el sujeto en dicho primer intervalo de tiempo, lo que indica la progresión o regresión de, por ejemplo las enfermedades de la invención o lo que indica el efecto o no efecto de, por ejemplo el fármaco anticancerígeno o terapia dirigida hacia las enfermedades de la invención en dicho sujeto.

60

65

De conformidad con otro aspecto, la descripción se refiere a un método para detectar, diagnosticar y/o tamizar las

enfermedades de la invención o para controlar el efecto de un fármaco anticancerígeno o terapia dirigida hacia las enfermedades de la invención en un sujeto, que comprende detectar la presencia o el nivel de anticuerpos capaces de unirse inmunoespecíficamente a BST1, o uno o más de sus fragmentos que contienen epítomos o que comprende detectar un cambio en el nivel de los mismos en dicho sujeto.

5

De conformidad con otro aspecto, la descripción se refiere a un método para detectar, diagnosticar y/o tamizar las enfermedades de la invención en un sujeto, que comprende detectar la presencia de anticuerpos capaces de unirse inmunoespecíficamente a BST1, o uno o más de sus fragmentos que contienen epítomos en dicho sujeto, en el que (a) la presencia de un nivel elevado de anticuerpos capaces de unirse inmunoespecíficamente a BST1 o uno o más de dichos fragmentos que contienen epítomos en dicho sujeto en comparación con el nivel en un sujeto sano o (b) la presencia de un nivel detectable de anticuerpos capaces de unirse inmunoespecíficamente a BST1 o uno o más de dichos fragmentos que contienen epítomos en dicho sujeto en comparación con un nivel indetectable correspondiente en un sujeto sano indica la presencia de dicho cáncer en dicho sujeto.

10

Un método particular para detectar, diagnosticar y/o tamizar el cáncer, por ejemplo las enfermedades de la invención comprende:

15

poner en contacto BST1, o uno o más de sus fragmentos que contienen epítomos con una muestra biológica que se prueba; y

20

detectar en el sujeto la presencia de anticuerpos capaz de unir inmunoespecíficamente a BST1, o uno o más de sus fragmentos que contienen epítomos.

Se describe además en la presente descripción un método para controlar la progresión del cáncer, por ejemplo, las enfermedades de la invención o para controlar el efecto de un fármaco anticancerígeno o terapia dirigida hacia las enfermedades de la invención en un sujeto, que comprende detectar la presencia de anticuerpos capaces de unirse inmunoespecíficamente a BST1 o uno o más de sus fragmentos que contienen epítomos en dicho sujeto en un primer intervalo de tiempo y en un intervalo de tiempo posterior, la presencia de un nivel elevado o reducido de anticuerpos capaces de unirse inmunoespecíficamente a BST1, o uno o más de sus fragmentos que contienen epítomos en dicho sujeto en el intervalo posterior en comparación con el nivel en dicho sujeto en dicho primer intervalo de tiempo, lo que indica la progresión o regresión de dicho cáncer, o el efecto o no efecto de dicho fármaco o terapia anticancerígena en dicho sujeto.

25

30

La presencia de anticuerpos capaces de unirse inmunoespecíficamente a BST1, o uno o más de sus fragmentos que contienen epítomos, se detecta típicamente mediante el análisis de una muestra biológica obtenida a partir de dicho sujeto (muestras biológicas ilustrativas se mencionan anteriormente, por ejemplo, la muestra es una muestra de tejido mieloide, mamario, colorrectal, renal, pulmonar o pancreático, o bien una muestra de sangre o saliva). El método incluye típicamente la etapa de obtener dicha muestra biológica para el análisis de dicho sujeto.

35

Los anticuerpos que pueden detectarse incluyen anticuerpos IgA, IgM e IgG.

40

En cualquiera de los métodos anteriores, el nivel que puede detectarse en el sujeto candidato que tiene cáncer, por ejemplo las enfermedades de la invención son 2 o más veces superiores que el nivel en el sujeto sano.

En un aspecto de la invención, se usa electroforesis unidimensional u otros métodos apropiados para analizar muestras de tejido mieloide, mamario, colorrectal, renal, pulmonar o pancreático de un sujeto, preferentemente un sujeto vivo, para medir la expresión de la proteína de la invención para el tamizaje o diagnóstico de, por ejemplo, las enfermedades de la invención, para controlar la efectividad de las enfermedades de la invención, o para el desarrollo de fármacos.

45

Como se usa en la presente, el término "proteína de la descripción" o "BST1" se refiere a la proteína ilustrada en la Figura 1 detectada experimentalmente por cromatografía líquida-espectrometría de masas de muestras de tejido de cáncer y la Figura 2 detectada experimentalmente por marcado isotópico para la cuantificación absoluta y relativa. Los derivados proteicos de esta secuencia pueden ser útiles también para los mismos propósitos que se describen en la presente descripción.

50

Esta proteína se ha identificado en los extractos de proteínas de membrana de muestras de tejido de cáncer de pacientes con cáncer, a través de los métodos y aparatos de la tecnología preferida descrita en los Ejemplos 1 y 2 (por ejemplo, mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas y marcado isotópico para la cuantificación absoluta y relativa de los extractos proteicos de membrana de la digestión triptica). Las secuencias de péptidos se compararon con las bases de datos SWISS-PROT y trEMBL (del Instituto Suizo de Bioinformática (SIB) y el Instituto Europeo de Bioinformática (EBI), que están disponibles en [www.expasy.com](http://www.expasy.com)) y la siguiente entrada: Q10588, se identificó ADP-ribosil ciclasa 2. La secuencia de nucleótidos que codifica esta proteína se encuentra en el número de acceso NM 004334.2.

55

60

La ADP-ribosil ciclasa 2 (conocida también como antígeno 1 del estroma de la médula ósea (BST1) o CD157) es una ectoenzima bifuncional anclada en lípidos que cataliza la ciclación e hidrólisis de los ribonucleótidos. Genera los segundos mensajeros nucleotídicos ADP-ribosa cíclica y ADP-ribosa que son capaces de activar la liberación de calcio y la fosforilación proteica (FEBS Lett. 1994, 356(2-3):244-8). Es capaz de soportar el crecimiento de células pre-B de

65

una forma parácrina, posiblemente a través de la generación de metabolitos NAD<sup>+</sup> (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994, 91:5325-5329; J Biol Chem. 2005, 280:5343-5349).

5 Los experimentos de inmunohistoquímica (ver Ejemplo 3) mostraron tinción fuerte en el cáncer de pulmón de células no pequeñas.

Se realizaron también experimentos de perfil de ARN y citometría de flujo y mostraron que BST1 se expresa a niveles altos en células cancerosas circulantes de pacientes con leucemia mieloide aguda (AML). A estos niveles, un anticuerpo con ADCC mejorada por ingeniería genética puede ser terapéuticamente eficaz.

10 Se demostró que BST1 internaliza mediante el ensayo de MabZAP (ver Ejemplo 9), lo que ilustra un conjugado anticuerpo-fármaco (ADC), que puede ser terapéuticamente eficaz.

15 La proteína descrita en la presente descripción es útil como son los fragmentos, particularmente los fragmentos que contienen epítomos, por ejemplo los fragmentos antigénicos o inmunogénicos de los mismos y sus derivados. Los fragmentos que contienen epítomos incluyendo fragmentos antigénicos o inmunogénicos tendrán típicamente una longitud de 12 aminoácidos o más, por ejemplo 20 aminoácidos o más, por ejemplo 50 o 100 aminoácidos o más. Los fragmentos pueden ser 95 % o más de la longitud de la proteína completa, por ejemplo 90 % o más, por ejemplo 75 % o 50 % o 25 % o 10 % o más de la longitud de la proteína completa.

20 Alternativamente, la proteína/polipéptido que se emplea o refiere en la presente descripción puede limitarse a aquellos específicamente indicados/descritos en la presente especificación o una porción 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica o similar a él.

25 Los fragmentos que contienen epítomo incluyendo fragmentos antigénicos o inmunogénicos serán capaces de inducir una respuesta inmune relevante en un paciente. El ADN que codifica la proteína descrita en la presente descripción es útil también como son sus fragmentos, por ejemplo los fragmentos que codifican el ADN de la proteína descrita en la presente descripción, tales como los fragmentos inmunogénicos de la misma. Los fragmentos del ácido nucleico (por ejemplo, ADN) que codifica descritos en la presente descripción pueden ser 95 % o más de la longitud de la región codificante completa, por ejemplo 90 % o más, por ejemplo 75 % o 50 % o 25 % o 10 % o más de la longitud de la región codificante completa. Los fragmentos del ácido nucleico (por ejemplo, ADN) pueden ser de 36 nucleótidos o más, por ejemplo 60 nucleótidos o más, por ejemplo 150 ó 300 nucleótidos o más de longitud.

35 Los derivados de la proteína descrita en la presente descripción incluyen variantes de la secuencia en las que se realizaron una o más deleciones, inserciones o sustituciones (por ejemplo, 1-20 tal como 15 aminoácidos, o hasta 20 % tal como hasta 10 % o 5 % o 1% en número de aminoácidos basados en la longitud total de la proteína). Las sustituciones pueden ser típicamente sustituciones conservadoras. Los derivados típicamente tendrán en esencia la misma función biológica que la proteína de la que se derivan. Los derivados serán típicamente antigénicos o inmunogénicos en comparación con la proteína de la que se derivan. Los derivados típicamente tendrán o bien la actividad de unión al ligando, o la capacidad activa de formación del complejo receptor, o preferentemente ambas, de la proteína de la que se derivan.

40 Los derivados de las proteínas incluyen también la proteína químicamente tratada tales como proteínas carboximetiladas, carboxiamidadas, acetiladas, por ejemplo tratadas durante la purificación.

45 Para BST1, el nivel detectado se obtiene después de analizar el tejido de sujetos que tienen, por ejemplo, las enfermedades de la invención con respecto al nivel detectado que se obtiene al analizar el tejido de sujetos libres de, por ejemplo las enfermedades de la invención dependerá del protocolo analítico en particular y de la técnica de detección que se utiliza. Como consecuencia, la presente invención contempla que cada laboratorio establecerá un intervalo de referencia en sujetos libres de, por ejemplo, las enfermedades de la invención de conformidad con el protocolo analítico y la técnica de detección en uso, como es convencional en la técnica de diagnóstico. Preferentemente, al menos una muestra de tejido positivo de control de un sujeto conocido por tener, por ejemplo Las enfermedades de la invención o al menos una muestra de tejido negativo de control de un sujeto conocido por estar libre de, por ejemplo, Las enfermedades de la invención (y más preferiblemente muestras de control positivas y negativas) se incluyen en cada lote de muestras de ensayo analizadas.

50 BST1 puede usarse para la detección, diagnóstico o control de por ejemplo, las enfermedades de la invención o para el desarrollo de fármacos. En una modalidad de la invención, el tejido de un sujeto (por ejemplo, un sujeto que se sospecha que tiene las enfermedades de la invención) se analiza por cromatografía líquida-espectrometría de masas para la detección de BST1. Una abundancia aumentada de BST1 en el tejido del sujeto con respecto al tejido de un sujeto o sujetos libres de las enfermedades de la invención (por ejemplo, una muestra de control) o un intervalo de referencia previamente determinado indica la presencia de las enfermedades de la invención.

60 En otra modalidad de la invención, el tejido de un sujeto (por ejemplo, un sujeto que se sospecha que tiene las enfermedades de la invención) se analiza mediante el marcado isotópico para la cuantificación absoluta y relativa para la detección de BST1. Una abundancia aumentada de BST1 en el tejido del sujeto con respecto al tejido de un sujeto o

sujetos libres de las enfermedades de la invención (por ejemplo, una muestra de control) o un intervalo de referencia previamente determinado indica la presencia de las enfermedades de la invención.

5 Con respecto a los fragmentos, fragmentos que contienen epítomos, fragmentos inmunogénicos o fragmentos antigénicos de BST1:

para las aplicaciones relevantes de cáncer, en un aspecto de la invención estas comprenden las secuencias identificadas como secuencias trípticas en los Ejemplos 1 y 2.

10 Como se usa en la presente descripción, BST1 se "aisla" cuando está presente en una preparación que está sustancialmente libre de proteínas contaminantes, es decir, una preparación en la que menos del 10 % (por ejemplo menos del 5 %, tal como menos de 1 %) de la proteína total presente es proteínas contaminantes. Una proteína contaminante es una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos significativamente diferente a BST1 aislado, según se determina por análisis espectral de masas. Como se usa en la presente descripción, una secuencia "significativamente diferente" es aquella que permite que la proteína contaminante se resuelva a partir de la BST1  
15 mediante análisis espectral de masas, realizado de conformidad con el Protocolo de Referencia descrito en la presente descripción en los Ejemplos 1 y 2.

20 Se describe también en la presente descripción, una composición farmacéutica para el tratamiento de, por ejemplo las enfermedades de la invención que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido BST1 (particularmente aquellos definidos anteriormente) o un fragmento inmunogénico del mismo y un adyuvante.

25 BST1 puede ensayarse por cualquier método conocido por los expertos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, las tecnologías preferidas descritas en la presente invención, ensayos de quinasas, ensayos enzimáticos, ensayos de unión y otros ensayos funcionales, inmunoensayos y transferencia en membranas de Western.

30 Alternativamente, puede detectarse BST1 en un inmunoensayo. En una modalidad, se realiza un inmunoensayo poniendo en contacto con una muestra de un sujeto que se prueba con un anticuerpo anti-BST1 (u otro reactivo de afinidad) bajo condiciones tales que se pueda ocurrir la unión (por ejemplo, unión inmunoespecífica) si está presente BST1 y detectar o medir la cantidad de cualquier unión (por ejemplo, unión inmunoespecífica) con el agente. Los agentes de unión a BST1 pueden producirse mediante los métodos y técnicas enseñados en la presente descripción. En una modalidad particular, BST1 se analiza mediante inmunohistoquímica.

35 BST1 puede detectarse en virtud de la detección de un fragmento del mismo, por ejemplo, un fragmento que contiene el epítomo de la misma (por ejemplo, uno inmunogénico o antigénico). Los fragmentos pueden tener una longitud de al menos 10, más típicamente de al menos 20 aminoácidos, por ejemplo, al menos 50 ó 100 aminoácidos, por ejemplo, al menos 150 ó 200 aminoácidos; por ejemplo, al menos 300 ó 500 aminoácidos; por ejemplo, al menos 700 o 900 aminoácidos.

40 En una modalidad, la unión de un reactivo de afinidad (por ejemplo, un anticuerpo) en secciones de tejido puede usarse para detectar la localización aberrante de BST1 o un nivel aberrante de BST1. En una modalidad específica, puede usarse un anticuerpo (u otro reactivo de afinidad) para BST1 para ensayar un tejido de paciente (por ejemplo, un tejido mieloide, mamario, colorrectal, renal, pulmonar o pancreático) para el nivel de BST1 donde un nivel aberrante de BST1 es indicativo de las enfermedades de la invención. Como se usa en el presente documento, un "nivel aberrante" significa un nivel aumentado en comparación con el nivel en un sujeto libre de las enfermedades de la invención o un nivel de referencia.  
45

50 Cualquier inmunoensayo adecuado puede usarse, e incluye, sin limitarse a, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos usando técnicas tales como transferencias en membranas de western, radioinmunoensayos, inmunohistoquímica, ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas), inmunoensayos "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitación, reacciones de precipitación de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmuno-radiométricos, inmunoensayos fluorescentes e inmunoensayos de proteína A.

55 Por ejemplo, BST1 puede detectarse en una muestra de fluido (por ejemplo, sangre, orina o saliva) mediante un ensayo en sándwich de dos etapas. En la primera etapa, se utiliza un reactivo de captura (por ejemplo, un anticuerpo anti-BST1 u otro reactivo de afinidad) para capturar BST1. El reactivo de captura puede ser opcionalmente inmovilizado sobre una fase sólida. En la segunda etapa, se utiliza un reactivo de detección marcado directo o indirecto para detectar la BST1 capturada. En una modalidad, el reactivo de detección es una lectina. Puede usarse cualquier lectina para este propósito que se une preferentemente a BST1 en lugar de a otras isoformas que tienen el mismo núcleo proteico que  
60 BST1 o a otras proteínas que comparten el determinante antigénico reconocido por el anticuerpo. En una modalidad preferida, la lectina escogida se une a BST1 con al menos 2 veces mayor afinidad, con mayor preferencia al menos 5 veces mayor afinidad, aún con mayor preferencia al menos 10 veces mayor afinidad, que a dichas otras isoformas que tienen el mismo núcleo proteico como BST1 o a dichas otras proteínas que comparten el determinante antigénico reconocido por el reactivo de afinidad. Basándose en la presente descripción, una lectina que es adecuada para  
65 detectar BST1 puede identificarse fácilmente por los métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo después de probar una o más lectinas enumeradas en la Tabla I en las páginas 158-159 de Sumar y otros, Lectins as Indicators of

5 Disease-Associated Glycoforms, En: Gabius H-J & Gabius S (eds.), 1993, Lectins and Glycobiology, en las págs. 158-174. En una modalidad alternativa, el reactivo de detección es un anticuerpo (u otro reactivo de afinidad), por ejemplo un anticuerpo que detecta específicamente (por ejemplo inmuno-específicamente) otras modificaciones postraduccionales, tal como un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a aminoácidos fosforilados. Ejemplos de tales anticuerpos incluyen los que se unen a fosfotirosina (BD Transduction Laboratories, números de catálogo: P11230-050 / P11230-150, P11120, P38820, P39020), los que se unen a fosfoserina (Zymed Laboratories Inc., San Francisco Sur, California, número de catálogo 61-8100) y los que se unen a fosfotreonina (Zymed Laboratories Inc., San Francisco Sur, California, números de catálogo 71-8200, 13-9200).

10 Si se desea, puede usarse también un gen que codifica BST1, un gen relacionado, o secuencias o subsecuencias de ácidos nucleicos relacionados, incluyendo secuencias complementarias, en los ensayos de hibridación. Puede usarse como sonda de hibridación un nucleótido que codifica BST1, o sus subsecuencias que comprenden al menos 8 nucleótidos, preferentemente al menos 12 nucleótidos y con máxima preferencia al menos 15 nucleótidos. Los ensayos de hibridación pueden usarse para la detección, diagnóstico o control de las condiciones, trastornos o estados patológicos, asociados con la expresión aberrante del gen que codifica la BST1, o para el diagnóstico diferencial de sujetos con signos o síntomas sugestivos de, por ejemplo, las enfermedades de la invención. Particularmente, dicho ensayo de hibridación puede llevarse a cabo mediante un método que comprende poner en contacto la muestra de un sujeto que contiene ácido nucleico con una sonda de ácido nucleico capaz de hibridar con un ADN o ARN que codifica para BST1, bajo condiciones tales que pueda producirse la hibridación y detectar o medir cualquier hibridación resultante.

15 Por lo tanto, puede detectarse el ácido nucleico que codifica la BST1 (por ejemplo, ADN o más adecuadamente ARN), por ejemplo, usando un agente hibridante capaz de hibridar con el ácido nucleico que codifica la BST1.

25 Uno de tales procedimientos ilustrativos comprende:  
poner en contacto una o más sondas de oligonucleótidos que comprenden 10 o más nucleótidos consecutivos complementarios a una secuencia de nucleótidos que codifica BST1, con un ARN obtenido a partir de una muestra biológica del sujeto o con el ADNc copiado del ARN, donde dicho contacto ocurre en condiciones que permiten la hibridación de la sonda con la secuencia de nucleótidos si está presente;  
30 detectar la hibridación, si existe, entre la sonda y la secuencia de nucleótidos; y  
comparar la hibridación, si existe, detectada en la etapa (b) con la hibridación detectada en una muestra control, o con un intervalo de referencia previamente determinado.

35 Se describen también, los kits de diagnóstico, que comprenden un anticuerpo anti-BST1 (u otro reactivo de afinidad). Adicionalmente, dicho kit puede comprender opcionalmente uno o más de los siguientes: (1) instrucciones para el uso del reactivo de afinidad anti-BST1 para el diagnóstico, control terapéutico o cualquier combinación de estas aplicaciones; (2) una pareja de unión marcada al reactivo de afinidad; (3) una fase sólida (tal como una tira reactiva) sobre la que se inmoviliza el reactivo de afinidad anti-BST1; y (4) una etiqueta o inserto que indique la aprobación reglamentaria para el uso diagnóstico, pronóstico o terapéutico o cualquiera de sus combinaciones. Si no se proporciona una pareja de unión marcada al reactivo de afinidad, el propio reactivo de afinidad anti-BST1 puede marcarse con un marcador detectable, por ejemplo, una porción quimioluminiscente, enzimática, fluorescente o radiactiva.

40 La descripción proporciona también un kit que comprende una sonda de ácido nucleico capaz de hibridarse con el ácido nucleico, adecuadamente ARN, que codifica BST1. En un ejemplo, un kit comprende uno o más recipientes de un par de iniciadores (por ejemplo, cada uno en el intervalo de tamaño de 6-30 nucleótidos, con mayor preferencia 10-30 nucleótidos y aún con mayor preferencia 10-20 nucleótidos) que bajo condiciones de reacción apropiadas puede iniciar la amplificación de al menos una porción de un ácido nucleico que codifica BST1, tal como por la reacción en cadena de la polimerasa (ver, por ejemplo, Innis y otros, 1990, PCR Protocols, Academic Press, Inc., San Diego, California), reacción en cadena de la ligasa (ver el documento de patente núm. EP 320,308) uso de la Q $\beta$  replicasa, reacción con sonda cíclica, u otros métodos conocidos en la técnica.

45 Un kit puede comprender opcionalmente además una cantidad predeterminada de BST1 o un ácido nucleico que codifica BST1, por ejemplo para uso como estándar o control.

55 La muestra biológica usada puede ser de cualquier fuente tales como una muestra de suero o una muestra de tejido, por ejemplo mieloides, mamario, colorrectal, renal, pulmonar o pancreático. Por ejemplo, al buscar evidencia de las enfermedades metastásicas de la invención, pueden examinarse los sitios principales de las enfermedades de la invención, metástasis, por ejemplo, el hígado, los pulmones y los huesos para el cáncer de mama; el hígado, la cavidad peritoneal, la pelvis, el retroperitoneo y los pulmones para el cáncer colorrectal; los huesos, los pulmones y el hígado para el cáncer de riñón; el cerebro, el hígado, los huesos y las glándulas suprarrenales para el cáncer de pulmón y el hígado para el cáncer de páncreas.

60 Alternativamente, la presencia de BST1, o uno o más de sus fragmentos, o la presencia de ácido nucleico que codifica BST1 o la presencia de la actividad de BST1 pueden detectarse por análisis in situ.

En ciertas modalidades, los métodos de diagnóstico descritos en la presente descripción pueden realizarse, al menos parcial o totalmente, *in vitro*.

5 Adecuadamente, la presencia de BST1, o uno o más fragmentos o la presencia de la actividad de BST1 se detecta cuantitativamente.

Por ejemplo, la detección cuantitativa puede comprender:

10 poner en contacto una muestra biológica con un reactivo de afinidad que es específico para BST1, dicho reactivo de afinidad que se conjuga opcionalmente con un marcador detectable; y  
detectar si se ha producido unión entre el reactivo de afinidad y al menos una especie en la muestra, realizándose dicha detección ya sea directa o indirectamente.

15 Alternativamente, la presencia de BST1, o uno o más de sus fragmentos, o la presencia de la actividad de BST1 pueden detectarse cuantitativamente por medios que implican el uso de una tecnología de imagimática.

20 En otra modalidad, el método de la invención implica el uso de inmunohistoquímica sobre por ejemplo secciones de tejidos mieloide, mamario, colorrectal, renal, pulmonar o pancreático para determinar la presencia de BST1, o uno o más de sus fragmentos, o la presencia del ácido nucleico que codifica BST1 o la presencia de la actividad de BST1 y, por tanto, localizar por ejemplo, las enfermedades de las células de la invención.

25 En una modalidad, se detecta la presencia de BST1 o uno o más de sus fragmentos que contienen epítomos, por ejemplo, usando un reactivo de afinidad capaz de unir específicamente a BST1 o uno o más de sus fragmentos, tal como un anticuerpo.

30 En otra modalidad se detecta la actividad de BST1. La ADP-ribosil ciclasa 2 y su homólogo, CD38, parecen actuar como receptores, generando segundos metabolitos mensajeros que inducen la liberación de Ca<sup>2+</sup> intracelular a través del receptor de rianodina (Biochem Biophys Res Commun. 1996, 228(3):838-45). Puede actuar también, a través de la integrina CD11b para efectuar la liberación de Ca<sup>2+</sup> a través de la vía quinasa de PI-3 (J Biol Regul Homeost Agents. 2007;21(1-2):5-11).

#### Uso en Estudios Clínicos

35 Los métodos y composiciones de diagnóstico de la presente invención pueden ayudar a controlar un estudio clínico, por ejemplo para evaluar fármacos para la terapia de las enfermedades de la invención. En un ejemplo, las moléculas candidatas se prueban en cuanto a su capacidad para restaurar los niveles de BST1 en un sujeto que tiene, por ejemplo, las enfermedades de la invención a niveles encontrados en sujetos libres de las enfermedades de la invención o, en un sujeto tratado, para preservar los niveles de BST1 en o cerca de sin leucemia mieloide aguda, sin cáncer mamario, sin cáncer colorrectal, sin cáncer renal, sin cáncer pulmonar o sin cáncer pancreático.

40 En otro ejemplo, los métodos y composiciones de la presente invención se usan para seleccionar candidatos para un estudio clínico para identificar individuos que tienen, por ejemplo, las enfermedades de la invención; tales individuos pueden excluirse del estudio después o pueden colocarse en una cohorte separada para el tratamiento o análisis.

45 Producción de proteína de la descripción y del ácido nucleico correspondiente

50 Se describe en la presente invención, un método para tratar o prevenir, por ejemplo la enfermedad de la invención, que comprende administrar a un sujeto con necesidad de tal tratamiento o prevención, una cantidad terapéuticamente eficaz de ácido nucleico que codifica BST1 o uno o más de sus fragmentos o derivados, por ejemplo en forma de una vacuna.

Se describe un método para tratar o prevenir, por ejemplo las enfermedades de la invención, que comprende administrar a un sujeto con necesidad de tal tratamiento o prevención, una cantidad terapéuticamente eficaz de ácido nucleico que inhibe la función o expresión de BST1.

55 Los métodos (y/u otros aspectos de ADN descritos en la presente descripción) descritos pueden, por ejemplo, incluir en donde el ácido nucleico es un ácido nucleico antisentido BST1 o ribozima.

60 Así, la descripción proporciona el uso del ácido nucleico que codifica BST1 o uno o más de sus fragmentos o derivados, en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir, por ejemplo las enfermedades de la invención.

Se proporciona también el uso de ácido nucleico que inhibe la función o expresión de BST1 en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir, por ejemplo las enfermedades de la invención.

65 Un ADN empleado en los procedimientos descritos puede obtenerse mediante el aislamiento como un fragmento de ADNc de las genotecas de ADNc que utilizan los ARNm como materiales comerciales de partida y determina e identificando sus secuencias de nucleótidos. Es decir, específicamente, los clones se aíslan aleatoriamente a partir de

las genotecas de ADNc, que se preparan de conformidad con el método de Ohara y otros (*DNA Research* Vol.4, 53-59 (1997)). A continuación, a través de la hibridación, se eliminan los clones duplicados (que aparecen repetidamente) y después se llevan a cabo la transcripción y traducción *in vitro*. Se determinan las secuencias de nucleótidos de ambos extremos de los clones, para las cuales se confirman los productos de 50 kDa o más.

5

Además, se buscan las bases de datos de genes conocidos para homología usando como consultas las secuencias de nucleótidos terminales así obtenidas.

10

Adicionalmente del método de tamizaje anterior, las secuencias terminales 5 'y 3' de ADNc se relacionan con una secuencia de genoma humano. Después se confirma un gen de cadena larga desconocido en una región entre las secuencias, y se analiza la el ADNc de longitud completa. De esta manera, un gen desconocido que no puede obtenerse mediante un método de clonación convencional que depende de genes conocidos puede clonarse sistemáticamente.

15

Además, todas las regiones de un gen derivado de un ser humano que contiene un ADN de la presente descripción pueden prepararse también usando un método de PCR, tal como RACE, mientras que se preste suficiente atención para evitar que se produzcan errores artificiales en fragmentos cortos o secuencias obtenidas. Como se describió anteriormente, pueden obtenerse clones que tienen ADN de la presente descripción.

20

En otros medios para la clonación de ADN de la descripción, se produce un iniciador de ADN sintético que tiene una secuencia de nucleótidos apropiada de una porción de un polipéptido de la descripción, seguido por la amplificación por el método de PCR usando una genoteca apropiada. Alternativamente, la selección puede llevarse a cabo por hibridación del ADN de la descripción con un ADN que se ha incorporado en un vector apropiado y se ha marcado con un fragmento de ADN o un ADN sintético que codifica algunas o todas las regiones del polipéptido de la descripción. La hibridación puede llevarse a cabo por, por ejemplo, el método descrito en *Current Protocols in Molecular Biology* (editado por Frederick M. Ausubel y otros, 1987). El ADN de la descripción puede ser cualquier ADN, siempre que contengan secuencias de nucleótidos que codifiquen los polipéptidos de la descripción como se describió anteriormente. Tal ADN puede ser un ADNc identificado y aislado a partir de las genotecas de ADNc o similares que se derivan del tejido mieloide, mamario, colorrectal, renal, pulmonar o pancreático. Tal ADN puede ser también un ADN sintético o similar. Los vectores para uso en la construcción de las genotecas pueden ser cualquiera de bacteriófagos, plásmidos, cósmidos, fargémidos o similares. Además, mediante la uso de una fracción de ARN total o de una fracción de ARNm preparada a partir de las células y/o tejidos anteriores, la amplificación puede llevarse a cabo mediante una reacción en cadena de polimerasa acoplada a la transcripción inversa directa (abreviadamente de aquí en lo adelante como "método de RT-PCR").

35

El ADN que codifica el polipéptido anterior que consiste en una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos de BST1 o el DNA que codifica el polipéptido anterior que consiste en una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de BST1 por delección, sustitución, o adición de uno o más aminoácidos que componen una porción de la secuencia de aminoácidos puede producirse fácilmente mediante una combinación apropiada de, por ejemplo, un método de mutagénesis dirigida a un sitio, un método de recombinación homóloga de genes, un método de elongación de iniciadores y el método de PCR conocido por los expertos en la técnica. Adicionalmente, en este momento, un posible método para hacer que un polipéptido tenga actividad biológica sustancialmente equivalente es la sustitución de aminoácidos homólogos (por ejemplo, aminoácidos polares y no polares, aminoácidos hidrófobos e hidrófilos, aminoácidos cargados positivamente y cargados negativamente, y aminoácidos aromáticos) entre los aminoácidos que componen el polipéptido. Además, para mantener una actividad biológica sustancialmente equivalente, los aminoácidos dentro de los dominios funcionales contenidos en el polipéptido de la presente descripción preferentemente se conservan.

40

45

50

Además, los ejemplos de ADN de la descripción incluyen el ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de BST1 y el ADN que hibrida en condiciones rigurosas al ADN y que codifica un polipéptido (proteína) que tiene actividad biológica (función) equivalente a la función del polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de BST1. En tales condiciones, un ejemplo de dicho ADN capaz de hibridarse con ADN que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de BST1 es el ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene un grado de homología media total con la secuencia de nucleótidos completa del ADN, tal como aproximadamente 80 % o más, preferentemente aproximadamente 90 % o más, y con mayor preferencia aproximadamente 95 % o más. La hibridación puede llevarse a cabo de conformidad con un método conocido en la técnica tal como un método descrito en *Current Protocols in Molecular Biology* (editado por Frederick M. Ausubel y otros, 1987) o un método de conformidad con este. En la presente, "condiciones rigurosas" son, por ejemplo, condiciones de aproximadamente "1\*SSC, 0.1% SDS, y 37°C, condiciones más rigurosas de aproximadamente "0.5\*SSC, 0.1% SDS, y 42°C, o incluso condiciones aun más rigurosas de aproximadamente "0.2\*SSC, 0.1% SDS, y 65°C. Con condiciones de hibridación más rigurosas, puede esperarse el aislamiento de un ADN que tiene una alta homología con una secuencia de la sonda. Las combinaciones anteriores de SSC, SDS y condiciones de temperatura se proporcionan con fines ilustrativos. La rigurosidad similar a la anterior puede conseguirse por los expertos en la técnica usando una combinación apropiada de los factores anteriores u otros factores (por ejemplo, concentración de la sonda, la longitud de la sonda y el tiempo de reacción para la hibridación) para determinar la rigurosidad de la hibridación.

65

Un ADN clonado de la descripción puede usarse directamente o usarse, si se desea, después de la digestión con una enzima de restricción o adición de un enlazador, en dependencia de los propósitos. El ADN puede tener ATG como codón de iniciación de la traducción en el sitio terminal 5' y tener TAA, TGA o TAG como codón de terminación de la traducción en el sitio terminal 3'. Estos codones de terminación de la traducción e iniciación de la traducción pueden añadirse también usando un adaptador de ADN sintético apropiado.

En los métodos/usos de la descripción, BST1 puede proporcionarse, por ejemplo, en forma aislada, tal como cuando el polipéptido BST1 se ha purificado al menos hasta cierto punto. El polipéptido BST1 puede proporcionarse en forma sustancialmente pura, es decir libre, en una extensión sustancial, de otras proteínas. El polipéptido BST1 puede producirse también usando métodos recombinantes, producidos sintéticamente o producidos mediante una combinación de estos métodos. BST1 puede prepararse fácilmente por cualquier método conocido por los expertos en la técnica, que implica producir un vector de expresión que contiene ADN apropiado de la descripción o un gen que contiene un ADN de la descripción, cultivar un transformante transformado usando el vector de expresión, generar y acumular un polipéptido relevante de la presente descripción o una proteína recombinante que contiene el polipéptido y, después, recoger la resultante.

El polipéptido BST1 recombinante puede prepararse mediante procedimientos bien conocidos en la técnica a partir de células huésped diseñadas mediante ingeniería genética que comprende los sistemas de expresión. Como consecuencia, la descripción se refiere también a los sistemas de expresión que comprenden un polipéptido BST1 o ácido nucleico, a células huésped que se diseñan mediante ingeniería genética con tales sistemas de expresión y a la producción de polipéptido BST1 por técnicas recombinantes. Para la producción de un polipéptido BST1 recombinante, las células huésped pueden modificarse mediante ingeniería genética para incorporar sistemas de expresión o porciones de los mismos a los ácidos nucleicos. Una incorporación de este tipo puede realizarse usando métodos bien conocidos en la técnica, tales como transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAD-dextrano, transvección, microinyección, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, carga por raspado, introducción balística o infección (ver, por ejemplo, Davis y otros, *Basic Methods in Molecular Biology*, 1986 y Sambrook y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2da Ed., Cold Spring Harbour laboratory Press, Cold Spring Harbour, Nueva York, 1989).

Como células huésped, por ejemplo, se usan bacterias del género *Escherichia*, *Streptococci*, *Staphylococci*, *Streptomyces*, bacterias del género *Bacillus*, levadura, *Aspergillus* células, células de insecto, insectos y células animales. Ejemplos específicos de bacterias del género *Escherichia*, que se usan en la presente descripción, incluyen *Escherichia coli* K12 y DH1 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol. 60, 160 (1968)), JM103 (Nucleic Acids Research, Vol. 9, 309 (1981)), JA221 (Journal of Molecular Biology, Vol. 120, 517 (1978)), y HB101 (Journal of Molecular Biology, Vol. 41, 459 (1969)). Como bacterias del género *Bacillus* se utilizan, por ejemplo, *Bacillus subtilis* MI114 (Gene, Vol. 24, 255 (1983)) y 207-21 (Journal of Biochemistry, Vol. 95, 87 (1984)). Como levadura se usan, por ejemplo, *Saccaromyces cerevisiae* AH22, AH22R-, NA87-11A, DKD-5D, y 20B-12, *Schizosaccaromyces pombe* NCYC1913 y NCYC2036, y *Pichia pastoris*. Como células de insecto, por ejemplo, se utilizan las células *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9. Como células animales, por ejemplo, se utilizan las células de mono COS-7 y Vero, células CHO de hámster chino (abreviadas de aquí en adelante como células CHO), células CHO deficientes en gen *dhfr*, células L de ratón, células AtT-20 de ratón, células de mieloma de ratón, células de GH3 de rata, células FL humanas, COS, HeLa, C127,3T3, HEK 293, BHK y células de melanoma Bowes.

Pueden emplearse también los sistemas de traducción libres de células para producir polipéptidos recombinantes (por ejemplo, lisado de reticulocitos de conejo, lisado de germen de trigo, kits de transcripción y traducción SP6/T7 in vitro T&T y RTS 100 *E. Coli* HY de Roche Diagnostics Ltd., Lewes, Reino Unido y el sistema de transcripción/traducción rápido acoplado TNT de Promega Reino Unido, Southampton, Reino Unido).

El vector de expresión puede producirse de conformidad con un método conocido en la técnica. Por ejemplo, el vector puede producirse mediante (1) excisión de un fragmento de ADN que contiene un ADN de la presente descripción o un gen que contiene un ADN de la presente descripción y (2) ligación del fragmento de ADN corriente abajo del promotor en un vector de expresión apropiado. Puede usarse una amplia variedad de sistemas de expresión, tales como, y sin limitación, sistemas cromosómicos, episómicos y derivados de virus, por ejemplo, plásmidos derivados de *Escherichia coli* (por ejemplo pBR322, pBR325, pUC18 y pUC118), plásmidos derivados de *Bacillus subtilis* (por ejemplo, pUB110, pTP5 y pC194), de bacteriófagos, de transposones, de episomas de levadura (por ejemplo pSH19 y pSH15), de elementos de inserción, de elementos cromosómicos de levadura, de virus tales como baculovirus, virus papova tales como SV40, virus vaccinia, adenovirus, virus de la viruela aviar, virus de la pseudorrabia y retrovirus, y vectores derivados de combinaciones de los mismos, tales como los derivados del plásmido y del bacteriófago (tales como fago [lambda]) elementos genéticos, tales como cósmidos y fagémidos. Los sistemas de expresión pueden contener regiones de control que regulan, así como engendran expresión. Los promotores que se utilizan en la descripción pueden ser cualquiera de los promotores siempre y cuando sean apropiados para que los huéspedes que se utilizan para la expresión génica. Por ejemplo, cuando un huésped es *Escherichia coli*, se prefiere un promotor *trp*, un promotor *lac*, un promotor *recA*, un promotor *pL*, un promotor *lpp* y similares. Cuando un huésped es *Bacillus subtilis*, se prefiere un promotor SPO1, un promotor SPO2, un promotor *penP*, y similares. Cuando un huésped es levadura, se prefiere un promotor PHO5, un promotor PGK, un promotor GAP, un promotor ADH y similares. Cuando se utiliza una célula animal

como huésped, los ejemplos de promotores para su uso incluyen en este caso un promotor SRa, un promotor SV40, un promotor LTR, un promotor CMV y un promotor HSV-TK. Generalmente, puede usarse cualquier sistema o vector que sea capaz de mantener, propagar o expresar un ácido nucleico para producir un polipéptido en un huésped.

5 La secuencia de ácido nucleico apropiada puede insertarse en un sistema de expresión mediante cualquier variedad de técnicas bien conocidas y de rutina, tales como las expuestas en Sambrook y *otros*, arriba. Pueden incorporarse señales de secreción apropiadas en el polipéptido BST1 para permitir la secreción de la proteína traducida en el lumen del retículo endoplásmico, el espacio periplásmico o el entorno extracelular. Estas señales pueden ser endógenas al polipéptido BST1 o pueden ser señales heterólogas. La transformación de las células huésped puede llevarse a cabo según los métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede hacerse referencia a los siguientes documentos: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Vol. 69, 2110 (1972); *Gene*, Vol. 17, 107 (1982); *Molecular & General Genetics*, Vol. 168, 111 (1979); *Methods in Enzymology*, Vol. 194, 182-187 (1991); *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, Vol. 75, 1929 (1978); Cell Technology, separata volumen 8, New Cell Technology, Protocolo experimental. 263-267 (1995) (emitido por Shujunsha); y *Virology*, Vol. 52, 456 (1973). Por lo tanto, el transformante obtenido, transformado con un vector de expresión que contiene un ADN de la descripción o un gen que contiene un ADN de la descripción puede cultivarse de conformidad con un método conocido en la técnica. Por ejemplo, cuando los huéspedes son bacterias del género *Escherichia*, las bacterias se cultivan generalmente a aproximadamente 15°C a 43°C durante aproximadamente 3 a 24 horas. Si es necesario, puede añadirse también, aireación o agitación. Cuando los huéspedes son bacterias del género *Bacillus*, las bacterias generalmente se cultivan a aproximadamente 30°C a 40°C durante aproximadamente 6 a 24 horas. Si es necesario, puede añadirse también, aireación o agitación. Cuando se cultivan los transformantes cuyos huéspedes son las levaduras, el cultivo se lleva a cabo generalmente a aproximadamente 20°C a 35°C durante aproximadamente 24 a 72 horas usando medios con pH ajustado de aproximadamente 5 a 8. Si es necesario, puede añadirse también, aireación o agitación. Cuando se cultivan los transformantes cuyos huéspedes son las células animales, las células se cultivan generalmente a aproximadamente 30°C a 40°C durante aproximadamente 15 a 60 horas usando medios con un pH ajustado de aproximadamente 6 a 8. Si es necesario, puede añadirse también, aireación o agitación.

Si se ha de expresar un polipéptido BST1 para su uso en ensayos de tamizaje basados en células, se prefiere que el polipéptido se produzca en la superficie celular. En este caso, las células pueden cosecharse antes de su uso en el ensayo de tamizaje. Si el polipéptido BST1 se secreta en el medio, el medio puede recuperarse para aislar dicho polipéptido. Si se produce intracelularmente, las células primero deben lisarse antes de que se recupere el polipéptido BST1.

El polipéptido BST1 puede recuperarse y purificarse a partir de los cultivos de células recombinantes o de otras fuentes biológicas mediante métodos bien conocidos, que incluyen la precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de hidroxilapatita, cromatografía de tamizado molecular, métodos de centrifugación, métodos de electroforesis y cromatografía de lectina. En un ejemplo, se utiliza una combinación de estos métodos. En otro ejemplo, se utiliza la cromatografía líquida de alto rendimiento. En un ejemplo adicional, puede usarse un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido BST1 para agotar una muestra que comprende un polipéptido BST1 de dicho polipéptido o para purificar dicho polipéptido.

Para separar y purificar un polipéptido o una proteína de la descripción de los productos de cultivo, por ejemplo, después del cultivo, los cuerpos o células microbianas se recogen mediante un método conocido, se suspenden en un tampón apropiado, los cuerpos o células microbianas se rompen, por ejemplo, mediante ondas ultrasónicas, lisozimas, y/o congelación-descongelación, el resultante se somete entonces a centrifugación o filtración, y después puede obtenerse un extracto crudo de la proteína. El tampón puede contener también un agente de desnaturalización de proteínas tal como urea o clorhidrato de guanidina o un agente tensioactivo tal como Tritón X-100 (TM). Cuando la proteína se secreta en una solución de cultivo, los cuerpos o células microbianas y un sobrenadante se separan por un método conocido después de completar el cultivo y después se recoge el sobrenadante. La proteína contenida en el sobrenadante de cultivo o el extracto así obtenido puede purificarse mediante una combinación apropiada de métodos conocidos de separación y purificación. El polipéptido (proteína) de la descripción así obtenido puede convertirse en una sal mediante un método conocido o un método de conformidad con el mismo. Por el contrario, cuando el polipéptido (proteína) de la descripción se obtiene en forma de una sal, puede convertirse en una proteína o péptido libre u otra sal mediante un método conocido o un método de conformidad con el mismo. Además, se activa una enzima apropiada de modificación de proteínas tal como tripsina o quimotripsina, para actuar sobre una proteína producida por un recombinante antes o después de la purificación, de manera que puede añadirse arbitrariamente la modificación o puede eliminarse parcialmente un polipéptido. La presencia de un polipéptido (proteína) de la descripción o una sal del mismo puede medirse mediante diversos ensayos de unión, inmunoensayos enzimáticos usando anticuerpos específicos, y similares.

Pueden usarse técnicas bien conocidas en la técnica para la renaturalización que regenera conformaciones nativas o activas del polipéptido BST1 cuando el polipéptido se ha desnaturalizado durante el aislamiento y/o purificación. En el contexto de la descripción, el polipéptido BST1 puede obtenerse a partir de una muestra biológica de cualquier fuente, tal como, y sin limitación, una muestra de sangre o una muestra de tejido, por ejemplo, una muestra de tejido mieloide, mamario, colorrectal, renal, pulmonar o pancreático.

El polipéptido BST1 puede estar en forma de una "proteína madura" o puede ser parte de una proteína más grande tal como una proteína de fusión. ES frecuentemente ventajoso incluir una secuencia de aminoácidos adicional que contiene secuencias secretoras o líder, una secuencia pre, pro o preproteína, o una secuencia que ayuda en la purificación tal como una etiqueta de afinidad, por ejemplo, pero sin limitación, múltiples residuos de histidina, una etiqueta FLAG, una etiqueta HA o etiqueta myc.

BST1 puede fusionarse, por ejemplo, con un par heterólogo de fusión tal como la proteína de superficie, conocida como proteína D de Haemophilus Influenza B, una proteína no estructural del virus influenza tal como NS1, el antígeno S de Hepatitis B o una proteína conocido como LYTA tal como el terminal C del mismo.

Puede usarse también una secuencia adicional que puede proporcionar estabilidad durante la producción recombinante. Tales secuencias pueden eliminarse opcionalmente cuando se requiera, incorporando una secuencia escindible como una secuencia adicional o parte de la misma. Por lo tanto, un polipéptido BST1 puede fusionarse con otras porciones que incluyen otros polipéptidos o proteínas (por ejemplo, glutatión S-transferasa y proteína A). Tal proteína de fusión puede escindirse usando una proteasa apropiada, y separarse después en cada proteína. Tales secuencias adicionales y marcadores de afinidad son bien conocidos en la técnica. Adicionalmente a lo anterior, pueden añadirse las características conocidas en la técnica, tales como un potenciador, una señal de empalme, una señal de adición de políA, un marcador de selección y un origen de replicación de SV40 a un vector de expresión, si se desea.

#### Producción de reactivos de afinidad a BST1

De conformidad con los expertos en la técnica, hay tres tipos principales de reactivos de inmunofinidad: anticuerpos monoclonales, anticuerpos de presentación de fagos y moléculas derivadas de anticuerpos más pequeñas tales como afficuerpos, dominio de anticuerpos (dAbs), nanocuerpos, unicuerpos, DARPinas, Anticalinas, Duocalinas, Avimeros o Versacuerpos. Generalmente, en aplicaciones según la presente invención donde se indica el uso de anticuerpos, pueden emplearse otros reactivos de afinidad (por ejemplo, Afficuerpos, Dominio de Anticuerpos, Nanocuerpos, Unicuerpos, DARPinas, Anticalinas, Duocalinas, Avimeros o Versacuerpos). Puede decirse que tales sustancias son capaces de unirse inmunoespecíficamente a BST1. Cuando sea apropiado, el término "agente de afinidad" se interpretará en el sentido de que incluye reactivos de inmunofinidad y otras sustancias capaces de unirse específicamente a BST1 incluyendo, pero sin limitarse a, ligandos, lectinas, estreptavidinas, miméticos de anticuerpos y agentes sintéticos de unión.

#### Producción de anticuerpos contra BST1

De conformidad con la BST1 de la descripción, un análogo BST1, una proteína relacionada con BST1 o un fragmento o derivado de cualquiera de los anteriores, puede usarse como un inmunógeno para generar anticuerpos que se unen inmunoespecíficamente a tal inmunógeno. Estos inmunógenos pueden aislarse por cualquier medio conveniente, incluyendo los métodos descritos anteriormente. El término anticuerpo tal como se usa en la presente descripción se refiere a un péptido o polipéptido derivado de, modelado después o codificado sustancialmente por un gen de inmunoglobulina o genes de inmunoglobulina, o sus fragmentos, capaz de unirse específicamente a un antígeno o epítipo. Ver por ejemplo, *Fundamental Immunology*, 3ra Edición, W.E. Paul, ed., Raven Press, Nueva York (1993); Wilson (1994) *J. Immunol. Methods* 175:267-273; Yarmush (1992) *J. Biochem. Biophys. Methods* 25:85-97. El término anticuerpo incluye porciones de unión al antígeno, es decir, "sitios de unión al antígeno" (por ejemplo, fragmentos, subsecuencias, regiones determinantes de complementariedad (CDR)) que retienen capacidad para unirse al antígeno, incluyendo (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward y otros, (1989) *Nature* 341:544-546), que consiste en un dominio VH; y (vi) una región de determinante de complementariedad (CDR) aislada. Los anticuerpos de cadena única se incluyen también como referencia en el término "anticuerpo". Los anticuerpos de la descripción incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, monoclonales, biespecíficos, humanizados o quiméricos, anticuerpos de cadena única, fragmentos Fab y fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos producidos por una genoteca de expresión Fab, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id), y fragmentos de unión a epítopos de cualquiera de los anteriores. Las moléculas de inmunoglobulina de la descripción pueden ser de cualquier clase (por ejemplo IgG, IgE, IgM, IgD e IgA tal como IgG) o subclase de molécula de inmunoglobulina.

El término "se une específicamente" (o "se une inmunoespecíficamente") no pretende indicar que un anticuerpo se une exclusivamente a su objetivo deseado. Más bien, un anticuerpo "se une específicamente" si su afinidad por su objetivo pretendido es típicamente aproximadamente 5 veces mayor cuando se compara con su afinidad por una molécula no objetivo. Convenientemente no hay reacción cruzada o unión cruzada significativa con sustancias no deseadas, especialmente proteínas o tejidos de origen natural de una persona o animal sano. Preferentemente, la afinidad del anticuerpo será al menos aproximadamente 5 veces, preferentemente 10 veces, con mayor preferencia 25 veces, incluso con mayor preferencia 50 veces, y con máxima preferencia 100 veces o más, mayor para una molécula objetivo que su afinidad por una molécula no objetivo. En algunas modalidades, la unión específica entre un anticuerpo u otro agente de unión y un antígeno significa una afinidad de unión de al menos 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>. Los anticuerpos pueden unirse, por

ejemplo, con afinidades de al menos aproximadamente  $10^7 \text{ M}^{-1}$ , y preferentemente entre aproximadamente  $10^8 \text{ M}^{-1}$  a aproximadamente  $10^9 \text{ M}^{-1}$ , aproximadamente  $10^9 \text{ M}^{-1}$  a aproximadamente  $10^{10} \text{ M}^{-1}$ , o aproximadamente  $10^{10} \text{ M}^{-1}$  a aproximadamente  $10^{11} \text{ M}^{-1}$ .

- 5 La afinidad se calcula como  $K_d = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$  ( $k_{\text{off}}$  es la constante de velocidad de disociación,  $k_{\text{on}}$  es la constante de velocidad de asociación y  $K_d$  es la constante de equilibrio. La afinidad puede determinarse en equilibrio midiendo la fracción unida ( $r$ ) del ligando marcado a diversas concentraciones ( $c$ ). Los datos se representan gráficamente usando la ecuación de Scatchard:  $r/c = K(n-r)$ :  
donde
- 10  $r$  = moles de ligando unido/mol de receptor en equilibrio;  
 $c$  = concentración de ligando libre en equilibrio;  
 $K$  = constante de asociación de equilibrio; y  
 $n$  = número de sitios de unión al ligando por molécula receptora

- 15 En el análisis gráfico,  $r/c$  se grafica en el eje Y versus  $r$  en el eje X, produciendo por lo tanto, un gráfico de Scatchard. La afinidad es la pendiente negativa de la recta.  $k_{\text{off}}$  puede determinarse mediante la competencia del ligando marcado unido con el ligando no marcado en exceso. (ver, por ejemplo patente de los Estados Unidos núm. 6,316,409). La afinidad de un agente objetivo para su molécula objetivo es, por ejemplo, al menos aproximadamente  $1 \times 10^{-6}$  moles/litro, tal como al menos aproximadamente  $1 \times 10^{-7}$  moles/litro, tal como al menos aproximadamente  $1 \times 10^{-8}$  moles/litro, especialmente al menos aproximadamente  $1 \times 10^{-9}$  moles/litro, y particularmente aproximadamente  $1 \times 10^{-10}$  moles/litro. La medición de la afinidad de los anticuerpos mediante el análisis de Scatchard es bien conocida en la técnica. Ver, por ejemplo van Erp y otros, *J. Immunoassay* 12: 425-43, 1991; Nelson y Griswold, *Comput. Methods Programs Biomed.* 27: 65-8, 1988.

- 25 En una modalidad, los anticuerpos que reconocen los productos génicos de genes que codifican BST1 están públicamente disponibles. En otra modalidad, los métodos conocidos por los expertos en la técnica se utilizan para producir anticuerpos que reconocen BST1, un análogo de BST1, un polipéptido relacionado con BST1, o un fragmento o derivado de cualquiera de los anteriores. Un experto en la técnica reconocerá que existen muchos procedimientos disponibles para la producción de anticuerpos, por ejemplo, como se describe en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Ed Harlow y David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988), Cold Spring Harbor, Nueva York. Un experto en la técnica apreciará también que fragmentos de unión o fragmentos Fab que mimetizan anticuerpos pueden prepararse también a partir de la información genética mediante diversos procedimientos (*Antibody Engineering: A Practical Approach* (Borrebäck, C., ed.), 1995, Oxford University Press, Oxford; *J. Immunol.* 149, 3914-3920 (1992)).

- 35 En una modalidad de la descripción, se producen anticuerpos para un dominio específico de BST1. En una modalidad específica, se utilizan fragmentos hidrófilos de BST1 como inmunógenos para la producción de anticuerpos.

- En la producción de anticuerpos, el tamizaje para el anticuerpo deseado puede llevarse a cabo mediante técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima). Por ejemplo, para seleccionar anticuerpos que reconocen un dominio específico de BST1, pueden ensayarse hibridomas generados para un producto que se une a un fragmento BST1 que contiene dicho dominio. Para la selección de un anticuerpo que se une específicamente a un primer homólogo de BST1, pero que no se une específicamente a (o se une menos ávidamente a) un segundo homólogo de BST1, puede seleccionarse sobre la base de la unión positiva al primer homólogo de BST1 y la carencia de unión (o unión reducida) al segundo homólogo de BST1. Similarmente, para la selección de un anticuerpo que se une específicamente a BST1 pero que no se une específicamente a (o se une menos ávidamente a) una isoforma diferente de la misma proteína (tal como una glicofoma diferente que tiene el mismo péptido núcleo que BST1), puede seleccionarse sobre la base de la unión positiva a BST1 y la carencia de unión a (o unión reducida a) la isoforma diferente (por ejemplo, una glicofoma diferente). Por lo tanto, la presente descripción proporciona un anticuerpo (tal como un anticuerpo monoclonal) que se une con mayor afinidad (por ejemplo al menos 2 veces, tal como al menos 5 veces, particularmente al menos 10 veces con mayor afinidad) a BST1 que a una isoforma o isoformas diferentes (por ejemplo glicofomas) de BST1.

- Los anticuerpos policlonales que pueden usarse en los métodos de la invención son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpo derivadas del suero de animales inmunizados. Puede usarse también el suero inmune no fraccionado. Pueden usarse diversos procedimientos conocidos en la técnica para la producción de anticuerpos policlonales contra BST1, un fragmento de BST1, un polipéptido relacionado con BST1, o un fragmento de un polipéptido relacionado con BST1. Por ejemplo, una forma es purificar polipéptidos de interés o sintetizar los polipéptidos de interés usando, por ejemplo los métodos de síntesis de péptidos en fase sólida bien conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo *Guide to Protein Purification*, Murray P. Deutcher, ed., *Meth. Enzymol.* Vol 182 (1990); *Solid Phase Peptide Synthesis*, Greg B. Fields ed., *Meth. Enzymol.* Vol 289 (1997); Kiso y otros, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo) 38: 1192-99, 1990; Mostafavi y otros, *Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids* 1: 255-60, 1995; Fujiwara y otros, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo) 44: 1326-31, 1996. Los polipéptidos seleccionados pueden usarse después para inmunizar diversos animales huésped mediante inyección, incluyendo, pero sin limitarse a, conejos, ratones, ratas, etc., para generar anticuerpos policlonales o monoclonales. Si BST1 se purifica por electroforesis en gel, puede usarse BST1 para la inmunización con o sin extracción previa del gel de poliacrilamida. Pueden usarse diversos adyuvantes (es decir, inmunoestimulantes) para mejorar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie huésped, que incluyen, pero

sin limitarse a, adyuvante completo o incompleto de Freund, un gel mineral tal como hidróxido de aluminio, una sustancia tensioactiva tal como lisolecitina, polioli plurónico, un polianión, un péptido, una emulsión de aceite, una hemocianina de lapa con hendidura, dinitrofenol y un adyuvante tal como BCG (bacilo Calmette-Guerin) o *corinebacterium parvum*. Los adyuvantes adicionales son también bien conocidos en la técnica.

Para la preparación de los anticuerpos monoclonales (mAbs) dirigidos hacia BST1, un fragmento de BST1, un polipéptido relacionado con BST1, o un fragmento de un polipéptido relacionado con BST1, puede usarse cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpos en líneas de células continuas en cultivo. Por ejemplo, la técnica del hibridoma desarrollada originalmente por Kohler y Milstein (1975, *Nature* 256:495-497), así como la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de células B humanas (Kozbor y otros, 1983, *Immunology Today* 4:72), y la técnica del hibridoma de EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole y otros, 1985, in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96). Tales anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de las mismas. El hibridoma de la descripción que produce los mAbs puede cultivarse *in vitro* o *in vivo*. En una modalidad adicional de la descripción, pueden producirse anticuerpos monoclonales en animales libres de gérmenes usando tecnología conocida.

Los anticuerpos monoclonales incluyen pero no se limitan a anticuerpos monoclonales humanos y anticuerpos monoclonales quiméricos (por ejemplo, quimeras de ratón y humano). Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones se derivan de diferentes especies animales, tales como las que tienen una región constante de inmunoglobulina humana y una región variable derivada de un mAb murino. (Ver, por ejemplo Cabilly y otros, patente de los Estados Unidos núm. 4,816,567; y Boss y otros, patente de los Estados Unidos núm. 4,816,397.) Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo de una especie no humana que tiene una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de la especie no humana y una región marco de una molécula de inmunoglobulina humana. Ver, por ejemplo Queen, patente de Estados Unidos núm. 5,023,252.)

Pueden producirse anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica, por ejemplo usando los métodos descritos en publicación PCT núm. WO 87/02671; solicitud de patente europea 184,187; solicitud de patente europea 171,496; solicitud de patente europea 173,494; publicación PCT núm. WO 86/01533; patente de los Estados Unidos núm. 4,816,567; solicitud de patente europea 125,023; Better y otros, 1988, *Science* 240:1041-1043; Liu y otros, 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-3443; Liu y otros, 1987, *J. Immunol.* 139:3521-3526; Sun y otros, 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:214-218; Nishimura y otros, 1987, *Canc. Res.* 47:999-1005; Wood y otros, 1985, *Nature* 314:446-449; y Shaw y otros, 1988, *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-1559; Morrison, 1985, *Science* 229:1202-1207; Oi y otros, 1986, *BioTechniques* 4:214; la patente de los Estados Unidos 5,225,539; Jones y otros, 1986, *Nature* 321:552-525; Verhoeyan y otros (1988) *Science* 239:1534; y Beidler y otros, 1988, *J. Immunol.* 141:4053-4060.

Los anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables para el tratamiento terapéutico de los sujetos humanos. Estos anticuerpos pueden producirse usando ratones transgénicos que son incapaces de expresar genes de la cadena pesada y ligera de la inmunoglobulina endógena, pero que pueden expresar genes de la cadena pesada y ligera de la inmunoglobulina humana. Los ratones transgénicos se inmunizan de manera normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo, todo o una porción de BST1. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno pueden obtenerse usando tecnología de hibridoma convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana contenidos en los ratones transgénicos se reordenan durante la diferenciación de células B, y posteriormente experimentan el cambio de clase y la mutación somática. Por lo tanto, usando una técnica de ese tipo, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para una visión general de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, ver Lonberg y Huszar (1995, *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93). Para una discusión detallada de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para producir tales anticuerpos, ver, por ejemplo la patente de los Estados Unidos 5,625,126; la patente de los Estados Unidos 5,633,425; la patente de los Estados Unidos 5,569,825; la patente de los Estados Unidos 5,661,016; y la patente de los Estados Unidos 5,545,806. Adicionalmente, compañías tales como Abgenix, Inc. (Freemont, California), y Genpharm (San José, California) pueden contratarse para proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado usando la tecnología similar a la que se describió anteriormente.

Anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo seleccionado pueden generarse usando una técnica referida como "selección guiada". En este enfoque un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, se utiliza para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo. (Jespers y otros (1994) *BioTechnology* 12:899-903).

Los anticuerpos de la presente descripción pueden generarse también mediante el uso de la tecnología de presentación en fagos para producir y tamizar genotecas de polipéptidos para la unión a un objetivo seleccionado. Ver por ejemplo, Cwirla y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6378-82, 1990; Devlin y otros, *Science* 249, 404-6, 1990; Scott y Smith, *Science* 249, 386-88, 1990; y Ladner y otros, patente de los Estados Unidos núm. 5,571,698. Un concepto básico de los métodos de presentación en fagos es el establecimiento de una asociación física entre el ADN que codifica un polipéptido a ser tamizado y el polipéptido. Esta asociación física se proporciona por la partícula fágica, que muestra un polipéptido como parte de una cápsida que encierra el genoma del fago que codifica el polipéptido. El establecimiento de una asociación física entre los polipéptidos y su material genético permite la detección masiva simultánea de un gran

número de fagos que portan diferentes polipéptidos. Los fagos que muestran un polipéptido con afinidad a un objetivo unido al objetivo y estos fagos se enriquecen mediante el tamizaje de afinidad al objetivo. La identidad de los polipéptidos mostrados a partir de estos fagos puede determinarse a partir de sus respectivos genomas. Usando estos métodos, un polipéptido identificado como que tiene una afinidad de unión para un objetivo deseado puede ser sintetizado en crudo por los medios convencionales. Ver, por ejemplo patente de Estados Unidos núm. 6,057,098.) Particularmente, tal fago puede usarse para mostrar los dominios de unión al antígeno expresado a partir de un repertorio o genoteca de anticuerpo combinatoria (por ejemplo, humano o murino). Los fagos que expresan un dominio de unión al antígeno que se une al antígeno de interés pueden seleccionarse o identificarse con el antígeno, por ejemplo, usando el antígeno marcado o antígeno unido o capturado a una superficie sólida o perla. Los fagos utilizados en estos métodos son típicamente fagos filamentosos que incluyen dominios de unión fd y M13 expresados a partir de fagos con dominios de anticuerpo Fa, Fv o Fv estabilizados con disulfuro fusionados de forma recombinante ya sea con el gen del fago III o con la proteína del gen VIII. Los métodos de presentación de fagos que pueden usarse para preparar los anticuerpos de la presente descripción incluyen los descritos en Brinkman y otros, *J. Immunol. Methods* 182:41-50 (1995); Ames y otros, *J. Immunol. Methods* 184:177-186 (1995); Kettleborough y otros, *Eur. J. Immunol.* 24:952-958 (1994); Persic y otros, *Gene*, 187:9-18 (1997); Burton y otros, *Advances in Immunology*, 57:191-280 (1994); las publicaciones del PCT núm. WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y las patentes de Estados Unidos núms. 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727; 5,733,743 y 5,969,108. Como se describe en las referencias anteriores, después de la selección de fagos, las regiones que codifican el anticuerpo a partir del fago pueden aislarse y usarse para generar anticuerpos completos, que incluyen anticuerpos humanos, o cualquier otro fragmento de unión al antígeno deseado, y expresar en cualquier huésped deseado, que incluyen células de mamífero, células de insecto, células de planta, levaduras y bacterias por ejemplo, como se describe en detalle más abajo. Por ejemplo, pueden emplearse también técnicas para producir de manera recombinante fragmentos Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub> usando los procedimientos conocidos en la técnica, tales como los descritos en la publicación de PCT WO 92/22324; Mullinax y otros, *BioTechniques* 12(6):864-869 (1992); y Sawai y otros, *AJRI* 34:26-34 (1995); y Better y otros, *Science* 240:1041-1043 (1988).

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

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

De conformidad con un enfoque diferente y con mayor preferencia, los dominios variables del anticuerpo con especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan con secuencias del dominio constante de la inmunoglobulina. La fusión preferentemente es con un dominio constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina, que comprende al menos parte de la bisagra, regiones CH<sub>2</sub>, y CH<sub>3</sub>. Se prefiere tener la primera región constante de la cadena pesada (CH<sub>1</sub>) que contiene el sitio necesario para la unión de la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de la inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de la inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresiones separados, y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en modalidades mientras que las relaciones desiguales de las tres cadenas de polipéptido usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Es posible, sin embargo, insertar las secuencias codificantes de dos o las tres cadenas de polipéptido en un vector de expresión, cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptido en relaciones iguales resulta en altos rendimientos o cuando las relaciones no son de particular importancia.

En una modalidad preferida de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos se componen de un híbrido de cadena pesada de la inmunoglobulina con una primera especificidad de unión en un brazo, y un híbrido del par cadena pesada-cadena ligera de la inmunoglobulina (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se encontró que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de la inmunoglobulina en sólo la mitad de la molécula biespecífica proporciona una forma fácil de separación. Este enfoque se describe en WO 94/04690 publicado el 3 de Marzo de 1994. Para detalles adicionales sobre la generación de anticuerpos biespecíficos ver, por ejemplo, Suresh y otros, *Methods in Enzymology*, 1986, 121:210.

La descripción se refiere a fragmentos, derivados o análogos funcionalmente activos de las moléculas de inmunoglobulina anti-BST1. Funcionalmente activo significa que el fragmento, derivado o análogo es capaz de inducir

anticuerpos anti anti-idiotipo (*es decir*, anticuerpos terciarios) que reconocen el mismo antígeno que se reconoce por el anticuerpo del que se deriva el fragmento, derivado o análogo. Específicamente, en una modalidad preferida, la antigenicidad del idiotipo de la molécula de inmunoglobulina puede potenciarse por delección de secuencias de marco y CDR que son C-terminales a la secuencia CDR que reconoce específicamente el antígeno. Para determinar qué secuencias CDR se unen al antígeno, pueden usarse péptidos sintéticos que contienen las secuencias CDR en los ensayos de unión con el antígeno por cualquier método de ensayo de unión conocido en la técnica.

La presente descripción se refiere a los fragmentos de anticuerpos tales como, pero sin limitarse a, fragmentos F(ab')<sub>2</sub> y fragmentos Fab. Los fragmentos de anticuerpo que reconocen los epítomos específicos pueden generarse por técnicas conocidas. Los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> consisten en la región variable, la región constante de la cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada y se generan por digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo. Los fragmentos Fab se generan al reducir los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')<sub>2</sub>. La descripción se refiere también a dímeros de cadena pesada y cadena ligera de los anticuerpos de la descripción, o a cualquier fragmento mínimo de los mismos, tales como Fvs o anticuerpos de cadena simple (SCAs) (*por ejemplo*, como se describe en la patente de Estados Unidos 4,946,778; Bird, 1988, *Science* 242:423-42; Huston y otros, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; y Ward y otros, 1989, *Nature* 334:544-54), o cualquier otra molécula con la misma especificidad que el anticuerpo de la invención. Los anticuerpos de cadena simple se forman al unir los fragmentos de cadena pesada y ligera de la región Fv a través de un puente de aminoácidos, que resulta en un polipéptido de cadena simple. Las técnicas para el ensamblaje de los fragmentos Fv funcionales en *E. coli* pueden usarse (Skerra y otros, 1988, *Science* 242:1038-1041).

En otras modalidades, la descripción se refiere a las proteínas de fusión de las inmunoglobulinas de la invención (o a fragmentos funcionalmente activos de las mismas), por ejemplo, en las que la inmunoglobulina se fusiona a través de un enlace covalente (por ejemplo, un enlace peptídico), ya sea el extremo N terminal o C terminal a una secuencia de aminoácidos de otra proteína (o porción de la misma, preferentemente al menos 10, 20 ó 50 porciones de aminoácidos de la proteína) que no es la inmunoglobulina. Preferentemente, la inmunoglobulina, o su fragmento, está unida covalentemente a la otra proteína en el extremo N terminal del dominio constante. Como se indicó anteriormente, dichas proteínas de fusión pueden facilitar la purificación, aumentar la vida media *in vivo*, y mejorar la entrega de un antígeno a través de una barrera epitelial al sistema inmune.

Las inmunoglobulinas de la descripción incluyen análogos y derivados que se modifican, es decir, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula, siempre y cuando dicha unión covalente no perjudique la unión inmuno-específica. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados y análogos de las inmunoglobulinas incluyen los que se han modificado adicionalmente, por ejemplo, por glicosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/bloqueadores conocidos, escisión proteolítica, enlace a un ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas puede llevarse a cabo por técnicas conocidas, que incluyen, pero sin limitarse a, la escisión química específica, acetilación, formilación, etc. Adicionalmente, el análogo o derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Los anticuerpos anteriores pueden usarse en los procedimientos conocidos en la técnica relativos a la localización y actividad de BST1, por ejemplo, para la formación de imágenes de esta proteína, la medición de sus niveles en muestras fisiológicas apropiadas, en métodos de diagnóstico, etc.

#### Producción de Afficuerpos a BST1

Las moléculas Afficuerpos representan una nueva clase de proteínas de afinidad basadas en un dominio de la proteína del residuo de 58 aminoácidos, que se deriva de uno de los dominios de unión a IgG de la proteína A estafilocócica. Este dominio de haz de tres hélices se ha utilizado como una estructura para la construcción de genotecas de fagémidos combinatorias, a partir de las cuales pueden seleccionarse variantes de Afficuerpos que se orientan a las moléculas deseadas usando tecnología de presentación de fagos (Nord K, Gunneriusson E, Ringdahl J, Stahl S, Uhlen M, Nygren PA, Binding proteins selected from combinatorial libraries of an  $\alpha$ -helical bacterial receptor domain, *Nat Biotechnol* 1997;15:772-7. Ronmark J, Gronlund H, Uhlen M, Nygren PA, Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A, *Eur J Biochem* 2002;269:2647-55.). La estructura simple y robusta de las moléculas Afficuerpos en combinación con su bajo peso molecular (6 kDa), las hace adecuadas para una amplia variedad de aplicaciones, por ejemplo, como reactivos de detección (Ronmark J, Hansson M, Nguyen T, y otros, Construction and characterization of Affibody-Fc chimeras produced in *Escherichia coli*, *J Immunol Methods* 2002;261:199-211) y para inhibir las interacciones del receptor (Sandstorm K, Xu Z, Forsberg G, Nygren PA, Inhibition of the CD28-CD80 co-stimulation signal by a CD28-binding Affibody ligand developed by combinatorial protein engineering, *Protein Eng* 2003;16:691-7). Detalles adicionales de los Afficuerpos y sus métodos de producción pueden obtenerse mediante referencia a la patente de Estados Unidos núm. 5,831,012.

Los Afficuerpos marcados pueden ser útiles también en aplicaciones de imágenes para determinar la abundancia de las isoformas.

#### Producción de Anticuerpos de Dominio para BST1

Las referencias a los anticuerpos en la presente descripción incluyen las referencias a los Anticuerpos de Dominio. Los Anticuerpos de Dominio (dAbs) son las unidades de unión funcional más pequeñas de los anticuerpos, correspondientes a las regiones variables ya sea de las cadenas pesadas (VH) o ligeras (VL) de los anticuerpos humanos. Los Anticuerpos de dominio tienen un peso molecular de aproximadamente 13 kDa. Domantis ha desarrollado una serie de genotecas grandes y altamente funcionales de los dAb de VH y VL completamente humanos (más de diez mil millones de secuencias diferentes en cada genoteca), y utiliza estas genotecas para seleccionar los dAb que son específicos a objetivos terapéuticos. A diferencia de muchos anticuerpos convencionales, los Anticuerpos de dominio se expresan bien en los sistemas de células bacterianas, de levadura y de mamíferos. Detalles adicionales de los anticuerpos de dominio y sus métodos de producción pueden obtenerse mediante referencia a la Patente de los Estados Unidos núm. 6,291,158; 6,582,915; 6,593,081; 6,172,197; 6,696,245; la serie de los Estados Unidos 2004/0110941; la aplicación de la patente Europea núm. 1433846 y las patentes Europeas 0368684 y 0616640; el documento de patente núm. WO 05/035572, el documento de patente núm. WO 04/101790, el documento de patente núm. WO 04/081026, el documento de patente núm. WO 04/058821, el documento de patente núm. WO 04/003019 y el documento de patente núm. WO 03/002609.

#### Producción de Nanocuerpos a BST1

Los nanocuerpos son proteínas terapéuticas que se derivan de los anticuerpos que contienen las propiedades estructurales y funcionales únicas de los anticuerpos de cadena pesada de origen natural. Estos anticuerpos de cadena pesada contienen un dominio variable simple (VHH) y dos dominios constantes (C<sub>H</sub>2 y C<sub>H</sub>3). Es importante destacar, que el dominio VHH clonado y aislado es un polipéptido perfectamente estable que alberga la capacidad completa de unión al antígeno del anticuerpo de cadena pesada original. Los Nanocuerpos tienen una alta homología con los dominios V<sub>H</sub> de los anticuerpos humanos y pueden humanizarse además sin ninguna pérdida de la actividad. Es importante destacar, que los Nanocuerpos tienen un potencial inmunogénico bajo, lo que se ha confirmado en estudios de primates con compuestos líderes de los nanocuerpos.

Los nanocuerpos combinan las ventajas de los anticuerpos convencionales con características importantes de los fármacos de moléculas pequeñas. Similar a los anticuerpos convencionales, los nanocuerpos muestran alta especificidad, alta afinidad por su objetivo y baja toxicidad inherente. Sin embargo, similar a los fármacos de moléculas pequeñas, pueden inhibir las enzimas y acceder fácilmente a las hendiduras de los receptores. Además, los nanocuerpos son extremadamente estables, pueden administrarse por distintos medios de inyección (ver, por ejemplo, el documento núm. WO 04/041867) y son fáciles de fabricar. Otras ventajas de los nanocuerpos incluyen reconocer epítomos poco comunes u ocultos como resultado de su pequeño tamaño, que se unen en cavidades o sitios activos de objetivos proteicos con alta afinidad y selectividad debido a su flexibilidad única en formato de fármaco tridimensional, adaptación a la vida media y la facilidad y la velocidad de descubrimiento de fármacos.

Los nanocuerpos se codifican por genes únicos y se producen eficientemente en casi todos los huéspedes procarióticos y eucariotas, por ejemplo, *E. coli* (ver, por ejemplo, el documento de patente núm. EE.UU. 6,765,087), mohos (por ejemplo, *Aspergillus* o *Trichoderma*) y levadura (por ejemplo *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Hansenula* o *Pichia*) (ver, por ejemplo la patente de los Estados Unidos núm. 6,838,254). El proceso de producción es escalable y se han producido cantidades de varios kilogramos de nanocuerpos. Debido a que los nanocuerpos exhiben una estabilidad superior en comparación con los anticuerpos convencionales, pueden formularse como una solución de larga vida útil, lista para usar.

El método de Nanoclon (ver, por ejemplo el documento de patente núm. WO 06/079372) es un método patentado para generar Nanocuerpos contra un objetivo deseado, basado en la selección optimizada automática de células B.

#### Producción de unicuerpos contra BST1

Los Unicuerpos son otra tecnología de fragmentos de anticuerpos; sin embargo, ésta se basa en la eliminación de la región bisagra de los anticuerpos IgG4. La delección de la región bisagra resulta en una molécula que es esencialmente la mitad del tamaño de los anticuerpos IgG4 tradicionales y tiene una región de unión univalente en lugar de la región de unión bivalente de los anticuerpos IgG4. Se conoce bien además, que los anticuerpos IgG4 son inertes y, por lo tanto, no interactúan con el sistema inmune, lo que puede ser ventajoso para el tratamiento de enfermedades en las que no se desea una respuesta inmunitaria y esta ventaja se transmite a los unicuerpos. Por ejemplo, los unicuerpos pueden funcionar para inhibir o silenciar, pero no para matar, a las células a las que se unen. Además, la unión de unicuerpos a las células cancerosas no estimula su proliferación. Además, debido a que los unicuerpos tienen aproximadamente la mitad del tamaño de anticuerpos IgG4 tradicionales, pueden mostrar una mejor distribución sobre tumores sólidos más grandes con una eficacia potencialmente ventajosa. Los unicuerpos se eliminan del cuerpo a una velocidad similar a los anticuerpos IgG4 enteros y son capaces de unirse con una afinidad similar a sus antígenos que los anticuerpos enteros. Detalles adicionales de unicuerpos pueden obtenerse mediante la referencia al documento de la patente WO2007/059782.

#### Producción de darpinas contra BST1

Las darpinas (Proteínas de Repetición de Anquirina Diseñadas) son un ejemplo de una tecnología de anticuerpos miméticos DRP (Proteína de Repetición Diseñada) que se ha desarrollado para explotar las capacidades de unión de polipéptidos no anticuerpos. Las proteínas de repetición, como la anquirina o las proteínas repetidas ricas en leucina, son moléculas de unión ubicuas, que ocurren, a diferencia de los anticuerpos, intra y extracelularmente. Su arquitectura modular única presenta unidades estructurales repetitivas (repeticiones), que se apilan juntas para formar dominios de repetición alargados que muestran superficies de unión al objetivo variables y modulares. Basado en esta modularidad, pueden generarse genotecas combinatorias de polipéptidos con especificidades de unión altamente diversificadas. Esta estrategia incluye el diseño consensado de repeticiones autocompatibles que muestran residuos de superficie variables y su ensamblado aleatorio en dominios repetitivos.

Las darpinas pueden producirse en sistemas de expresión bacteriana con rendimientos muy elevados y pertenecen a las proteínas más estables que se conoce. Se han seleccionado darpinas de alta afinidad, muy específicas a un amplio intervalo de proteínas objetivo, que incluyen receptores humanos, citoquinas, quinasas, proteasas humanas, virus y proteínas de membrana. Pueden obtenerse las darpinas que tienen afinidades en el intervalo nanomolar a picomolar de un solo dígito.

Las darpinas se han utilizado en un amplio intervalo de aplicaciones, que incluyen el ELISA, ELISA sándwich, análisis de citometría de flujo (FACS), inmunohistoquímica (IHC), aplicaciones de chips, purificación por afinidad o transferencia en membrana de tipo Western. Las darpinas demostraron también ser altamente activas en el compartimento intracelular por ejemplo como proteínas marcadoras intracelulares fusionadas con la proteína fluorescente verde (GFP). Las darpinas se usaron además para inhibir la entrada viral con IC50 en el intervalo pM. Las darpinas no sólo son ideales para bloquear las interacciones proteína proteína, sino además para inhibir las enzimas. Las proteasas, quinasas y transportadores se han inhibido con éxito, más frecuentemente en un modo de inhibición alostérica. Los enriquecimientos muy rápidos y específicos en el tumor y las relaciones muy favorables del tumor con respecto a la sangre hacen que las darpinas sean adecuados para diagnósticos in vivo o enfoques terapéuticos.

La información adicional sobre las darpinas y otras tecnologías de DRP puede encontrarse en la publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 2004/0132028, y en la publicación de la solicitud de patente internacional núm.WO02/20565.

#### Producción de Anticalinas contra BST1

Las anticalinas son una tecnología adicional de mimetismo de anticuerpos, sin embargo en este caso la especificidad de unión se deriva de lipocalinas, una familia de proteínas de bajo peso molecular que se expresan natural y abundantemente en los tejidos humanos y fluidos corporales. Las lipocalinas han evolucionado para desempeñar una variedad de funciones in vivo asociadas con el transporte fisiológico y el almacenamiento de compuestos químicamente sensibles o insolubles. Las lipocalinas tienen una estructura intrínseca robusta que comprende un barril  $\beta$  altamente conservado que soporta cuatro lazos en un extremo de la proteína. Estos lazos forman la entrada a un bolsillo de unión y las diferencias conformacionales en esta parte de la molécula explican la variación en la especificidad de unión entre las lipocalinas individuales.

Aunque la estructura completa de los lazos hipervariables apoyados por un marco de hoja  $\beta$  conservada es reminiscente de las inmunoglobulinas, las lipocalinas difieren considerablemente de los anticuerpos en términos de tamaño, están compuestas por una única cadena polipeptídica de 160 a 180 aminoácidos que es marginalmente mayor que un simple dominio de la inmunoglobulina.

Las lipocalinas se clonan y sus lazos se someten a ingeniería genética para crear las anticalinas. La genotecas de anticalinas estructuralmente diversas se han generado y la anticalina permite mostrar la selección y tamizaje de la función de unión, seguido por la expresión y la producción de la proteína soluble para análisis adicional en los sistemas de procariones o eucariones. Los estudios han demostrado con éxito que pueden desarrollarse anticalinas que son específicas para virtualmente cualquier proteína humana objetivo; pueden aislarse y obtenerse afinidades de unión en el intervalo nanomolar o superior.

Las anticalinas pueden formarse además como proteínas de doble orientación, denominadas duocalinas. Una duocalina se une a dos objetivos terapéuticos separados en una proteína monomérica de fácil producción usando procesos de fabricación estándar, mientras se conserva la especificidad y afinidad del objetivo a pesar de la orientación estructural de sus dos dominios de unión.

La modulación de múltiples objetivos a través de una sola molécula es particularmente ventajosa en las enfermedades conocidas que involucran más de un simple factor causal. Además, los formatos de unión bi o multivalentes como las duocalinas tienen un potencial significativo en orientar las moléculas a la superficie celular en la enfermedad, mediar los efectos agonistas en las vías de transducción de señales o inducir efectos de internalización mejorados a través de la unión y el agrupamiento de los receptores de la superficie celular. Además, la alta estabilidad intrínseca de las duocalinas es comparable a las anticalinas monoméricas, lo que ofrece una formulación flexible y un potencial de entrega para las duocalinas.

La información adicional sobre las anticalinas puede encontrarse en la patente de los Estados Unidos núm. 7,250,297, y en la publicación de la solicitud de patente internacional núm. WO 99/16873.

5 Producción de avímeros contra BST1

10 Los avímeros se desarrollan a partir de una gran familia de dominios de receptores extracelulares humanos mediante el reordenamiento del exón in vitro y la presentación de fagos, lo que genera proteínas multidominios con propiedades de unión e inhibición. La unión de múltiples dominios de unión ha mostrado crear avidez y resulta en una afinidad y una especificidad mejoradas en comparación con las proteínas de unión a un solo epítipo convencional. Otras ventajas potenciales incluyen la producción simple y eficiente de las moléculas específicas multiobjetivos en *Escherichia coli*, termoestabilidad mejorada y resistencia a proteasas. Los avímeros con afinidades subnanomolares se han obtenido contra una variedad de objetivos.

15 La información adicional sobre los avímeros puede encontrarse en la publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos núms. 2006/0286603, 2006/0234299, 2006/0223114, 2006/0177831, 2006/0008844, 2005/0221384, 2005/0164301, 2005/0089932, 2005/0053973, 2005/0048512, 2004/0175756.

20 Producción de versacuerpos contra BST1

25 Los Versacuerpos son pequeñas proteínas de 3 a 5 kDa con >15 % de cisteínas, que forman un alto patrón de densidad de disulfuro, que reemplazan al núcleo hidrofóbico que tienen las proteínas típicas. La sustitución de un gran número de aminoácidos hidrofóbicos, que comprenden el núcleo hidrofóbico, con un número pequeño de disulfuros que resulta en una proteína que es más pequeña, más hidrófila (de menor agregación y unión no específica), más resistente a las proteasas y al calor, y tiene una menor densidad de epítopos de células T, debido a que los residuos que más contribuyen a la presentación del MHC son hidrofóbicos. Estas cuatro propiedades se conocen bien que afectan la inmunogenicidad, y juntas se espera que causen una gran disminución en la inmunogenicidad.

30 La inspiración para los versacuerpos proviene de los productos biofarmacéuticos inyectables naturales producidos por las sanguijuelas, serpientes, arañas, escorpiones, caracoles y anémonas, que se sabe exhiben inesperadamente baja inmunogenicidad. A partir de las familias de proteínas naturales seleccionadas, mediante el diseño y la selección del tamaño, la hidrofobicidad, el procesamiento del antígeno proteolítico y la densidad del epítipo se minimizan a niveles muy por debajo del promedio de las proteínas naturales inyectables.

35 Dada la estructura de los versacuerpos, estos miméticos de anticuerpos ofrecen un formato versátil que incluye la multivalencia, multiespecificidad, una diversidad de mecanismos de vida útil, módulos de orientación a tejidos y la ausencia de la región Fc del anticuerpo. Además, los Versacuerpos se fabrican en *E. coli* con altos rendimientos, y debido a su hidrofiliidad y tamaño pequeño, los versacuerpos son altamente solubles y pueden formularse a altas concentraciones. Los versacuerpos son excepcionalmente estables al calor (pueden hervirse) y ofrecen una vida útil prolongada.

40 La información adicional sobre los versacuerpos puede encontrarse en la publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 2007/0191272.

45 Expresión de Reactivos de Afinidad

Expresión de anticuerpos

50 Los anticuerpos de la descripción pueden producirse por cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de anticuerpos, particularmente, por síntesis química o por expresión recombinante, y se producen preferentemente mediante las técnicas de expresión recombinante.

55 La expresión recombinante de anticuerpos, o sus fragmentos, derivados o análogos, requiere la construcción de un ácido nucleico que codifica el anticuerpo. Si se conoce la secuencia de nucleótidos del anticuerpo, puede ensamblarse un ácido nucleico que codifica el anticuerpo a partir de los oligonucleótidos sintetizados químicamente (por ejemplo, como descrito en Kutmeier y otros, 1994, *BioTechniques* 17:242), lo que brevemente, implica la síntesis de los oligonucleótidos que se solapan y contienen las porciones de la secuencia que codifica el anticuerpo, hibridación y unión de los oligonucleótidos, y después la amplificación de los oligonucleótidos unidos por RCP.

60 Alternativamente, el ácido nucleico que codifica el anticuerpo puede obtenerse clonando el anticuerpo. Si no se dispone de un clon que contiene el ácido nucleico que codifica el anticuerpo particular, pero se conoce la secuencia de la molécula de anticuerpo, puede obtenerse un ácido nucleico que codifica el anticuerpo a partir de una fuente adecuada (por ejemplo, una genoteca de ADNc de anticuerpos, o una genoteca de ADNc que se genera de cualquier tejido o células que expresan el anticuerpo) mediante amplificación por PCR usando iniciadores sintéticos que hibridan a los extremos 3' y 5' de la secuencia o mediante la clonación usando una sonda oligonucleotídica específica para la secuencia génica particular.

Si no se dispone de una molécula de anticuerpo que reconozca específicamente un antígeno particular (o una fuente para una genoteca de ADNc para clonar un ácido nucleico que codifica dicho anticuerpo), pueden generarse anticuerpos específicos para un antígeno particular por cualquier método que se conoce en la técnica, por ejemplo, mediante la inmunización de un animal, tal como un conejo, para generar anticuerpos policlonales o, por ejemplo, mediante la generación de anticuerpos monoclonales. Alternativamente, puede obtenerse un clon que codifica al menos la porción Fab del anticuerpo mediante el tamizaje en genotecas de expresión de Fab (por ejemplo, como se describe en Huse y otros, 1989, *Science* 246:1275-1281) para clones de fragmentos Fab que se unen al antígeno específico o mediante la selección de las genotecas de anticuerpos (ver, por ejemplo Clackson y otros, 1991, *Nature* 352:624; Hane y otros, 1997 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4937).

Una vez que se obtiene un ácido nucleico que codifica al menos el dominio variable de la molécula de anticuerpo, puede introducirse en un vector que contiene la secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de la molécula de anticuerpo (ver, por ejemplo, la publicación PCT WO 86/05807; la publicación PCT WO 89/01036; y la patente de los Estados Unidos núm. 5,122,464). Los vectores que contienen la cadena completa ligera o pesada para la coexpresión con el ácido nucleico que permiten la expresión de una molécula completa de anticuerpo están disponibles también. Después, el ácido nucleico que codifica el anticuerpo puede usarse para introducir las sustituciones o deleciones nucleotídicas necesarias para sustituir (o eliminar) uno o más residuos de cisteína de la región variable que participan en un enlace de disulfuro intracadena con un residuo de aminoácido que no contiene un grupo sulfhidrilo. Modificaciones de este tipo pueden llevarse a cabo por cualquier método conocido en la técnica para la introducción de mutaciones o deleciones específicas en una secuencia de nucleótidos, por ejemplo, pero sin limitarse a, mutagénesis química, mutagénesis dirigida *in vitro* (Hutchinson y otros, 1978, *J. Biol. Chem.* 253:6551), métodos basados en PCT, etc.

Adicionalmente, pueden usarse técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison y otros, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:851-855; Neuberger y otros, 1984, *Nature* 312:604-608; Takeda y otros, 1985, *Nature* 314:452-454) mediante empalme de genes de una molécula de anticuerpo de ratón de especificidad de antígeno apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica apropiada. Como se describió arriba, un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones se derivan de diferentes especies de animales, tales como aquellas que tienen una región variable derivada de un mAb murino y una región constante de anticuerpo humano, por ejemplo, anticuerpos humanizados.

Una vez que se obtiene la secuencia del ácido nucleico que codifica la molécula del anticuerpo de la invención, el vector para la producción de las moléculas puede producirse por tecnología de ADN recombinante usando metodologías que se conocen bien en la técnica. Por lo tanto, se describen en la presente descripción los métodos para preparar la proteína de la descripción mediante la expresión del ácido nucleico que contiene las secuencias de moléculas de anticuerpo. Los métodos que se conocen bien por los expertos en la técnica pueden usarse para construir vectores de expresión que contienen las secuencias que codifican la molécula del anticuerpo y señales de control adecuadas para la transcripción y traducción. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas, y recombinación genética *in vivo*. Ver, por ejemplo, las técnicas que se describen en Sambrook y otros (1990, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2da Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York) y Ausubel y otros (eds., 1998, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York).

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

Las células huésped usadas para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención pueden ser ya sea células bacterianas tales como *Escherichia coli*, o, preferentemente, células eucariotas, especialmente para la expresión de una molécula completa de inmunoglobulina recombinante. Particularmente, las células de mamífero tal como las células de ovario de hámster Chino (CHO), junto con un vector tal como el elemento promotor temprano del gen intermedio principal del citomegalovirus humano es un sistema de expresión eficaz para anticuerpos (Foecking y otros, 1986, *Gene* 45:101; Cockett y otros, 1990, *BioTechnology* 8:2).

Una variedad de sistemas de vectores de expresión del huésped pueden usarse para expresar una molécula de anticuerpo de la invención. Dichos sistemas de expresión de huésped representan vehículos mediante los cuales pueden producirse y purificarse posteriormente las secuencias codificantes de interés, pero además representan las células que pueden transformarse o transfectarse con las secuencias codificantes de nucleótidos apropiadas, expresando la molécula de anticuerpo de la descripción *in situ*. Estos incluyen pero no se limitan a microorganismos tales como las bacterias (por ejemplo, *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas con ADN recombinante de bacteriófago, ADN plasmídico o vectores de expresión de ADN cosmídico que contienen secuencias que codifican anticuerpos; levadura (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformada con vectores de expresión recombinante de levadura que contienen secuencias codificadoras de anticuerpos; sistemas de células de insectos infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen las secuencias que codifican el anticuerpo; sistemas de células vegetales infectadas con vectores de expresión del virus recombinante (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV, virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; o sistemas de células de mamífero (por ejemplo células COS, CHO, BHK, 293, 3T3) que albergan los constructos de expresión

recombinante que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; promotor del virus vaccinia de 7,5K).

5 En sistemas bacterianos, un número de vectores de expresión puede seleccionarse ventajosamente en dependencia del uso previsto para la molécula que se expresa. Por ejemplo, cuando una gran cantidad de una proteína de este tipo, que se produce por la generación de composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula de anticuerpo, puede ser deseable que se purifiquen fácilmente los vectores que dirigen la expresión de altos niveles de los productos de la proteína de fusión. Tales vectores incluyen, pero no se limitan, al vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther y otros, 10 1983, *EMBO J.* 2:1791), en el que la secuencia que codifica el anticuerpo puede unirse individualmente al vector en el marco con la región codificante *lac Z* de manera que se produce una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye & Inouye, 1985, *Nucleic Acids Res.* 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, *J. Biol. Chem.* 24:5503-5509); y similares. Los vectores pGEX pueden usarse además para expresar polipéptidos foráneos como las proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). Generalmente, tales proteínas de fusión son solubles y pueden purificarse fácilmente a partir de 15 células lisadas por adsorción y unión a una matriz de perlas de agarosa y glutatión seguido por la elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX se diseñan para incluir sitios de escisión para trombina o proteasa factor Xa tal que el producto génico objetivo clonado puede liberarse de la porción GST.

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

25 Como se discutió anteriormente, puede elegirse una cepa de célula huésped que modula la expresión de las secuencias insertadas o modifica y procesa el producto génico de la manera específica deseada. Estas modificaciones (por ejemplo, la glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, la escisión) de los productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína.

30 Para la producción de anticuerpos recombinantes de alto rendimiento, a largo plazo, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan de forma estable un anticuerpo de interés pueden producirse transfectando las células con un vector de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos del anticuerpo y la secuencia de nucleótidos de una seleccionable (por ejemplo, neomicina o higromicina) y seleccionando para la 35 expresión del marcador seleccionado. Estas líneas celulares diseñadas por ingeniería genética pueden ser particularmente útiles en el tamizaje y la evaluación de los compuestos que interactúan directamente o indirectamente con la molécula de anticuerpo.

40 Los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo pueden incrementarse mediante la amplificación del vector (para una revisión, ver Bebbington y Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells en *DNA cloning*, Vol.3. (Academic Press, New York, 1987). Cuando un marcador en el sistema vector que expresa un anticuerpo es amplificable, el incremento del nivel de inhibidor presente en el cultivo de la célula huésped incrementará el número de copias del gen marcador. Dado que la región amplificada está asociada con el gen del anticuerpo, la producción del anticuerpo se incrementará también (Crouse y otros, 1983, *Mol. Cell. Biol.* 3:257).

45 La célula huésped puede cotransfectarse con dos vectores de expresión de la invención, el primer vector que codifica un polipéptido derivado de la cadena pesada y el segundo vector que codifica un polipéptido derivado de la cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos, lo cual permite la expresión similar de polipéptidos de cadena pesada y ligera. Alternativamente, un único vector puede usarse, que codifica los polipéptidos tanto de cadena pesada como ligera. En tales situaciones, la cadena ligera debe situarse antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre de tóxico (Proudfoot, 1986, *Nature* 322:52; Kohler, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:2197). Las secuencias codificantes para las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc o ADN genómico.

50 Una vez que la molécula de anticuerpo de la invención se expresó de forma recombinante, puede purificarse mediante cualquier método que se conoce en la técnica para la purificación de una molécula de anticuerpo, por ejemplo, mediante cromatografía (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía por afinidad como con la proteína A o antígeno específico y cromatografía en columna de separación por tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial o 60 mediante cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas.

65 Alternativamente, cualquier proteína de fusión puede purificarse fácilmente mediante el uso de un anticuerpo específico para la proteína de fusión que se expresa. Por ejemplo, un sistema descrito por Janknecht y otros permite la purificación rápida de proteínas de fusión no desnaturalizadas que se expresan en las líneas celulares humanas (Janknecht y otros, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8972-8977). En este sistema, el gen de interés se subclona en un plásmido de recombinación de vaccinia tal que el marco de lectura abierto del gen se fusiona de forma traduccional a una etiqueta

amino terminal que consiste en seis residuos de histidina. La etiqueta sirve como un dominio de unión a la matriz para la proteína de fusión. Los extractos de células infectadas con virus vaccinia recombinante se cargan sobre columnas de agarosa y ácido nitriloacético  $\text{Ni}^{2+}$  y las proteínas marcadas con histidina se eluyen selectivamente con tampones que contienen imidazol.

5 Los anticuerpos que se generan mediante estos métodos pueden seleccionarse además mediante un primer tamizaje por afinidad y especificidad con el polipéptido purificado de interés y, si es necesario, se comparan los resultados con la afinidad y la especificidad de los anticuerpos con los polipéptidos que se desean excluir de la unión. El procedimiento de selección puede implicar la inmovilización de los polipéptidos purificados en pocillos separados en las placas de microtitulación. La solución que contiene un anticuerpo potencial o grupos de anticuerpos se coloca después en los respectivos pocillos de microtitulación y se incuba durante aproximadamente 30 minutos a 2 h. Los pocillos de microtitulación se lavan después y se añade un anticuerpo secundario marcado (por ejemplo, un anticuerpo anti ratón conjugado con fosfatasa alcalina si los anticuerpos originados son anticuerpos de ratón) a los pocillos y se incuba durante aproximadamente 30 minutos y se lavan después. Se añade un sustrato a los pocillos y aparecerá una reacción de color donde está presente el anticuerpo frente a los polipéptidos inmovilizados.

Los anticuerpos así identificados pueden analizarse posteriormente por afinidad y especificidad en el diseño de ensayo seleccionado. En el desarrollo de inmunoensayos para una proteína objetivo, la proteína objetivo purificada actúa como un estándar con el que se juzga la sensibilidad y especificidad del inmunoensayo usando los anticuerpos que se seleccionaron. Debido a que la afinidad de unión de diversos anticuerpos puede diferir; ciertos pares de anticuerpos (por ejemplo, en ensayos en sándwich) pueden interferir uno con otro estéricamente, etc., el rendimiento del ensayo de un anticuerpo puede ser una medida más importante que la afinidad absoluta y la especificidad de un anticuerpo.

Los expertos en la técnica reconocerán que pueden adoptarse muchos enfoques para producir anticuerpos o fragmentos de unión y tamizar y seleccionar para la afinidad y especificidad de los diversos polipéptidos, pero estos enfoques no cambian el alcance de la descripción.

Para aplicaciones terapéuticas, los anticuerpos (particularmente, anticuerpos monoclonales) pueden adecuadamente ser anticuerpos humanos o de animales humanizados (por ejemplo, ratón). Pueden producirse anticuerpos animales usando la proteína humana (por ejemplo, BST1) como inmunógeno en animales. La humanización típicamente implica el injerto de las CDR que se identifican de ese modo en las regiones del marco de lectura humano. Normalmente se requiere una posterior retromutación para optimizar la conformación de cadenas. La persona experta en la técnica conoce los procesos de este tipo.

35 Expresión de Anticuerpos.

La construcción de anticuerpos se ha descrito en otra parte (Ronmark J, Gronlund H, Uhlen, M., Nygren P.A, Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A, 2002, *Eur. J. Biochem.* 269, 2647-2655.), que incluye la construcción de genotecas de presentación de fagos Anticuerpos (Nord, K., Nilsson, J., Nilsson, B., Uhlen, M. & Nygren, P.A, A combinatorial library of an a-helical bacterial receptor domain, 1995, *Protein Eng.* 8, 601-608. Nord, K., Gunneriusson, E., Ringdahl, J., Stahl, S., Uhlen, M. & Nygren, P.A, Binding proteins selected from combinatorial libraries of an a-helical bacterial receptor domain, 1997, *Nat. Biotechnol.* 15, 772-777.)

Los análisis de biosensor para investigar las variantes óptimas de Anticuerpos que usan estudios de unión a biosensores se han descrito también en otra parte (Ronmark J, Gronlund H, Uhlen, M., Nygren P.A, Human immunoglobulin A (IgA)-specific ligands from combinatorial engineering of protein A, 2002, *Eur. J. Biochem.* 269, 2647-2655.)

Modificaciones de Reactivos de Afinidad.

50 En una modalidad preferida, los reactivos de afinidad anti BST1 tales como los anticuerpos o sus fragmentos se conjugan con una porción diagnóstico (tal como un marcador detectable) o una porción terapéutica. Los anticuerpos pueden usarse para el diagnóstico o para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección puede facilitarse acoplado el anticuerpo a una sustancia detectable (marcador). Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, metales emisores de positrones (para el uso en tomografía de emisión de positrón), e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. Ver generalmente la patente de los Estados Unidos núm. 4,741,900 para iones metálicos que pueden conjugarse a anticuerpos para el uso como diagnóstico de conformidad con la presente invención. Las enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; los grupos protéticos adecuados incluyen estreptavidina, avidina y biotina; los materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, fluoresceína de diclorotriazinilamina, cloruro de dansilo y ficoeritrina; los materiales luminiscentes adecuados incluyen luminol; materiales bioluminiscentes adecuados incluyen luciferasa, luciferina y aequorina; y nucleidos radiactivos adecuados incluyen  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$  y  $^{99}\text{Tc}$ .  $^{68}\text{Ga}$  puede emplearse además.

65 Como se indicó anteriormente, los reactivos de afinidad, tales como anticuerpos para usar en la invención, pueden conjugarse con una porción terapéutica, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o una

- radiotoxina. Los conjugados de este tipo se denominan en la presente como "inmunconjugados". Los inmunconjugados que incluyen una o más citotoxinas que se denominan como "inmunotoxinas". Las citotoxinas o agentes citotóxicos incluyen cualquier agente que es perjudicial para las células (por ejemplo, matan). Los ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrottestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaina, lidocaina, propranolol, y puromicina y sus análogos u homólogos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitarse a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, clorambucil tioepa, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, y platino cisdiclorodiamina (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramcina (AMC)), y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).
- 5 Otros ejemplos preferidos de citotoxinas terapéuticas que pueden conjugarse con un anticuerpo de la descripción incluyen duocarmicinas, caliqueamicinas, maitansinas y auristatinas, y sus derivados. Un ejemplo de un conjugado de anticuerpo de caliceamicina está disponible en el comercio (Mylotarg®; American Home Products).
- 15 Las citotoxinas pueden conjugarse con anticuerpos de la descripción al usar la tecnología de ligando disponible en la técnica. Ejemplos de tipos de ligandos que se han usado para conjugar una citotoxina con un anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, hidrazonas, tioéteres, ésteres, disulfuros y ligandos que contienen péptidos. Puede seleccionarse un ligando que sea, por ejemplo, susceptible a la escisión mediante pH bajo dentro del compartimento lisosómico o susceptible a la escisión por proteasas, tales como proteasas preferentemente expresadas en el tejido tumoral tales como catepsinas (por ejemplo, catepsinas B, C, D).
- 20 Ejemplos de citotoxinas se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos núms 6,989,452, 7,087,600, y 7,129,261, y en la solicitud PCT WO2006/110476, y en la solicitud de patente de Estados Unidos núm. 60/891,028. Para información adicional sobre los tipos de citotoxinas, ligandos y métodos para conjugar los agentes terapéuticos con anticuerpos, ver además Saito, G. y otros (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215; Trail, P.A. y otros (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Allen, T.M. (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan, I. y Kreitman, R. J. (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091; Senter, P.D. y Springer, C.J. (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264.
- 25 Los reactivos de afinidad pueden conjugarse además con un isótopo radiactivo para generar radiofármacos citotóxicos, además denominados como radioinmunconjugados. Ejemplos de isótopos radiactivos que pueden conjugarse con anticuerpos para uso diagnóstico o terapéutico incluyen, pero no se limitan a, yodo131, indio111, itrio90 y lutecio177. Los métodos para preparar los radioinmunconjugados se establecen en la técnica. Ejemplos de radioinmunconjugados están disponibles en el comercio, que incluyen Zevalin® (IDEC Pharmaceuticals) y Bexxar® (Corixa Pharmaceuticals), y pueden usarse métodos similares para preparar radioinmunconjugados usando los anticuerpos de la descripción.
- 30 Los conjugados pueden usarse para modificar una respuesta biológica dada, y la porción del fármaco no debe interpretarse como limitado para agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la porción de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa, o su fragmento activo, tales como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina diftérica; una proteína tales como factor de necrosis tumoral o interferón-γ; o, modificadores de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfoquinas, interleuquina-1 ("IL-1"), interleuquina 2 ("IL-2"), interleuquina 6 ("IL-6"), factor de estimulación de colonias de macrófagos granulocitos ("GM-CSF"), factor de estimulación de colonias de granulocitos ("G-CSF"), u otros factores de crecimiento. Senter P.D. (2009) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13(3):235-244; Kovtun y otros (2010) *Cancer Res.* 70(6):2528-2537.
- 35 Las técnicas para la conjugación de tales porciones terapéuticas con anticuerpos se conocen bien, ver, por ejemplo, Arnon y otros, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy," en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld y otros (eds.), págs. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom y otros, "Antibodies For Drug Delivery," en *Controlled Drug Delivery* (2da Ed.), Robinson y otros (eds.), págs. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera y otros (eds.), págs. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy," en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin y otros (eds.), págs. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe y otros, *Immunol. Rev.*, 62:119-58, 1982.
- 40 Alternativamente, un anticuerpo puede conjugarse a un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpo como se describe por Segal en la patente de Estados Unidos núm. 4,676,980.
- 45 Un anticuerpo con o sin la conjugación de una porción terapéutica, puede usarse como un agente terapéutico que se administra sólo o en combinación con factores citotóxicos y/o citoquinas.
- 50
- 55
- 60
- 65

La descripción se refiere a anticuerpos totalmente humanos, o humanizados que inducen citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Un anticuerpo totalmente humano es aquel en el que las secuencias de proteínas se codifican por secuencias de inmunoglobulinas humanas naturales, ya sea de linfocitos B humanos productores de anticuerpos aislados, o de linfocitos B murinos transgénicos de ratones en los que las regiones cromosómicas que codifican la inmunoglobulina murina se han reemplazado por secuencias humanas ortólogas. Los anticuerpos transgénicos del último tipo incluyen, pero no se limitan a, HuMab (Medarex, Inc, California) y XenoMouse (Abgenix Inc., California). Un anticuerpo humanizado es aquel en el que la región constante de una molécula de anticuerpo no humano de especificidad de antígeno apropiada, se reemplaza por la región constante de un anticuerpo humano, preferentemente del subtipo IgG, con funciones efectoras apropiadas (Morrison y otros, 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:851-855; Neuberger y otros, 1984, *Nature* 312:604-608; Takeda y otros, 1985, *Nature* 314:452-454). Las funciones efectoras apropiadas incluyen ADCC, que es un proceso natural por el cual anticuerpos totalmente humanos o anticuerpos humanizados, cuando se unen a objetivos sobre la superficie de células cancerosas, activan las propiedades de muerte celular de los linfocitos que forman parte del sistema inmune normal. Estos linfocitos activos, denominados células Asesinas Naturales (NK), usan un proceso citotóxico para destruir las células vivas a las que se unen los anticuerpos. La actividad de ADCC puede detectarse y cuantificarse midiendo la liberación de Europio ( $\text{Eu}^{3+}$ ) de  $\text{Eu}^{3+}$  marcado, en células vivas en presencia de un anticuerpo específico de antígeno y células mononucleares de sangre periférica que se extraen de un sujeto humano vivo inmunocompetente. El proceso ADCC se describe en detalle en Janeway Jr. C.A. y otros, *Immunobiology*, 5ta ed., 2001, Garland Publishing, ISBN 0-8153-3642-X; Pier G.B. y otros, *Immunology, Infection, and Immunity*, 2004, págs. 246-5; Albanell J. y otros, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2003, 532:págs.2153-68 y Weng, W.-K. y otros, *Journal of Clinical Oncology*, 2003, 21:págs. 3940-3947. Los métodos adecuados para la detección y cuantificación de la ADCC pueden encontrarse en Blomberg y otros, *Journal of Immunological Methods*. 1986, 86:págs.225-9; Blomberg *et al.*, *Journal of Immunological Methods*. 1986, 21;92:págs.117-23 y Patel & Boyd, *Journal of Immunological Methods*. 1995, 184:p29-38.

La ADCC típicamente implica la activación de células NK y depende del reconocimiento de células recubiertas de anticuerpo por receptores Fc en la superficie de la célula NK. Los receptores Fc reconocen la porción Fc (cristalina) de anticuerpos tales como la IgG, unidos específicamente a la superficie de una célula objetivo. El receptor Fc que desencadena la activación de la célula NK se denomina CD16 o Fc $\gamma$ R1IIa. Una vez que el receptor Fc $\gamma$ R1IIa se une a la Fc de la IgG, la célula NK libera citoquinas tales como IFN- $\gamma$ , y gránulos citotóxicos que contienen perforina y granzimas que entran en la célula objetivo y promueven la muerte celular desencadenando la apoptosis.

La inducción de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) por un anticuerpo puede mejorarse mediante modificaciones que alteran las interacciones entre la región constante del anticuerpo (Fc) y diversos receptores que están presentes en la superficie de las células del sistema inmune. Modificaciones de este tipo incluyen la reducción o la ausencia de porciones de fucosa unidas a alfa 1,6 en las cadenas complejas de oligosacáridos que se añaden normalmente al Fc de anticuerpos durante la síntesis natural o recombinante en las células de mamíferos. En una modalidad preferida, se producen reactivos de afinidad antiBST1 no fucosilados tales como anticuerpos o fragmentos de estos para mejorar su capacidad de inducir la respuesta de ADCC.

Las técnicas para reducir o suprimir las porciones de fucosa unidas a alfa 1,6 en las cadenas de oligosacáridos de la Fc están bien establecidas. En un ejemplo, el anticuerpo recombinante se sintetiza en una línea celular que está alterada en su capacidad para añadir fucosa en un enlace alfa 1,6 unido a la N-acetilglucosamina más interna de los oligosacáridos Fc del tipo biantenarío unidos a N. Estas líneas celulares incluyen, pero no se limitan a, el híbrido de rata YB2/0, que expresa un nivel reducido del gen de la 1,6-fucosiltransferasa-alfa, FUT8. Preferentemente, el anticuerpo se sintetiza en una línea celular que es incapaz de añadir las porciones de fucosil unidas a alfa-1,6 a cadenas de oligosacáridos complejas, debido a la delección de ambas copias del gen FUT8. Líneas celulares de este tipo incluyen, pero no se limitan a, líneas celulares FUT8-/- CHO/DG44. Las técnicas para sintetizar anticuerpos parcialmente fucosilados o no fucosilados y reactivos de afinidad se describen en Shinkawa y otros, *J. Biol. Chem.* 278:3466-34735 (2003); Yamane-Ohnuki y otros, *Biotechnology and Bioengineering* 87: 614-22 (2004) y en los documentos de patentes núms. WO00/61739 A1, WO02/31140 A1 yWO03/085107 A1. En un segundo ejemplo, la fucosilación de un anticuerpo recombinante se reduce o suprime mediante la síntesis en una línea celular que se modifica genéticamente para sobreexpresar una glicosil transferasa modificadora de glucoproteínas a un nivel que maximiza la producción de oligosacáridos complejos unidos a N que portan N-acetilglucosamina bisectantes. Por ejemplo, el anticuerpo se sintetiza en una línea celular de Ovario de Hámster Chino que expresa la enzima N-acetil glucosamina transferasa III (GnT III). Las líneas celulares transfectadas de forma estable con glucosil transferasas modificadoras de la glucoproteína adecuada, y los métodos para sintetizar anticuerpos que usan estas células se describen en el documento de patente núm. WO99/54342.

Un anticuerpo no fucosilado o reactivo de afinidad puede usarse como un fármaco terapéutico que se administra solo o en combinación con factores citotóxicos y/o citoquinas.

En una modificación adicional, las secuencias de aminoácidos del anticuerpo Fc se alteran de una manera que mejora la activación de ADCC, sin afectar la afinidad del ligando. Ejemplos de tales modificaciones se describen en Lazar y otros, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006, 103: págs.4005-4010; el documento de patente núm. WO03/074679 y el documento de patente núm. WO2007/039818. En estos ejemplos, la sustitución de aminoácidos en

el anticuerpo Fc, tal como aspartato por serina en la posición 239, e isoleucina por glutamato en la posición 332, alteró la afinidad de unión de un anticuerpo para receptores Fc, dando lugar a un aumento en la activación de ADCC.

5 Un reactivo de anticuerpo con activación de ADCC mejorada debido a sustituciones de aminoácidos puede usarse como un terapéutico que se administra solo o en combinación con factores citotóxicos y/o citoquinas.

10 La descripción además se refiere a moléculas biespecíficas que comprenden al menos una primera especificidad de unión para un primer epítipo objetivo (es decir, BST1) y una segunda especificidad de unión para un segundo epítipo objetivo. El segundo epítipo objetivo puede estar presente en la misma proteína objetivo que la unida por la primera especificidad de unión; o en el segundo epítipo objetivo puede estar presente de una proteína objetivo diferente a la unida por la primera proteína a la que está unida por la primera especificidad de unión. El segundo epítipo objetivo puede estar presente en la misma célula que el primer epítipo objetivo (es decir, BST1); o el segundo epítipo objetivo puede estar presente en un objetivo que no se muestra por la célula que muestra el primer epítipo objetivo. Como se utiliza en la presente, el término "especificidad de unión" se refiere a una porción que comprende al menos un dominio variable de anticuerpo.

15 Estas moléculas biespecíficas dirigen las células que expresan BST1 hacia las células efectoras que expresan CD3 o CD5 (por ejemplo, células T citotóxicas que expresan CD3 o CD5) e inducen actividades de células efectoras mediadas por CD3 o CD5, tales como la expansión clonal de células T y la citotoxicidad de células T. Los anticuerpos biespecíficos de la descripción pueden tener un total de dos o tres dominios variables de anticuerpo, en donde la primera porción del anticuerpo biespecífico es capaz de reclutar la actividad de una célula efectora inmune humana por la unión específica a un antígeno efector localizado en la célula efectora inmune humana, en la que el antígeno efector es el antígeno CD3 o CD5 humano, dicha primera porción consiste en un anticuerpo de dominio variable, y una segunda porción del anticuerpo biespecífico es capaz de unirse específicamente a un antígeno objetivo distinto del antígeno efector, por ejemplo, BST1, dicho antígeno objetivo está situado en una célula objetivo distinta de dicha célula efectora inmune humana, y dicha segunda porción comprende uno o dos dominios variables de anticuerpo.

Diagnóstico de cáncer que incluye las enfermedades de la invención.

30 De conformidad con la presente invención, las muestras de prueba de, por ejemplo, un tejido mieloide, mamario, colorrectal, renal, pulmonar o pancreático, suero, plasma u orina que se obtiene de un sujeto sospechoso de tener o que se sabe que tiene las enfermedades de la invención, pueden usarse para el diagnóstico o el seguimiento. En una modalidad, un cambio en la abundancia de BST1 en una muestra de prueba con respecto a una muestra de control (de un sujeto o sujetos libres de las enfermedades de la invención) o un intervalo de referencia previamente determinado, indica la presencia de las enfermedades de la invención. En otra modalidad, la abundancia relativa de BST1 en una muestra de prueba de comparación con una muestra de control o un intervalo de referencia determinado previamente, indica un subtipo de las enfermedades de la invención (por ejemplo, cáncer de mama inflamatorio, cáncer colorrectal familiar o esporádico, carcinoma de células renales, carcinoma de pulmón de células escamosas, carcinoma de células pequeñas o tumores endocrinos del páncreas). En aun otra modalidad, la abundancia relativa de BST1 en una muestra de prueba con relación a una muestra de control o un intervalo de referencia previamente determinado indica el grado o la gravedad de las enfermedades de la invención (por ejemplo, la probabilidad de metástasis). En cualquiera de los métodos antes mencionados, la detección de BST1 puede combinarse opcionalmente con la detección de uno o más biomarcadores adicionales para las enfermedades de la invención. Cualquier método adecuado puede emplearse en la técnica para medir el nivel de BST1, que incluye pero sin limitarse, a las tecnologías preferidas descritas en la presente, ensayos de quinasa, inmunoensayos para detectar y/o visualizar el BST1 (por ejemplo, transferencia en membrana de tipo Western, inmunoprecipitación seguido de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio, inmunocitoquímica, etc.). En una modalidad adicional, un cambio en la abundancia del ARNm que codifica BST1 en una muestra de prueba con respecto a una muestra de control o un intervalo de referencia previamente determinado indica la presencia de las enfermedades de la invención. Cualquier ensayo de hibridación adecuado puede usarse para detectar la expresión de BST1 mediante la detección y/o visualización del ARNm que codifica BST1 (por ejemplo, ensayos de Northern, dot blots, hibridación *in situ*, etc.).

55 En otra modalidad de la invención, pueden usarse anticuerpos marcados (u otros reactivos de afinidad), derivados y análogos de éstos, que se unen específicamente a BST1 con fines de diagnóstico, para detectar, diagnosticar o supervisar las enfermedades de la invención. Preferentemente, las enfermedades de la invención se detectan en un animal, con mayor preferencia en un mamífero y con la máxima preferencia en un ser humano.

Ensayos de tamizaje

60 La descripción proporciona métodos para identificar agentes (por ejemplo, compuestos candidatos o compuestos de prueba) que se unen a BST1 o tienen un efecto estimulador o inhibidor sobre la expresión o la actividad de BST1. La descripción proporciona también métodos para identificar agentes, compuestos candidatos o compuestos de prueba que se unen al polipéptido relacionado con BST1 o la proteína de fusión a BST1 o tienen un efecto estimulador o inhibidor sobre la expresión o actividad del polipéptido relacionado con BST1 o de la proteína de fusión a BST1. Ejemplos de agentes, compuestos candidatos o compuestos de prueba incluyen, pero no se limitan a, ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN y ARN), carbohidratos, lípidos, proteínas, péptidos, peptidomiméticos, moléculas pequeñas y otros fármacos. Los

agentes pueden obtenerse usando cualquiera de los numerosos enfoques en métodos de genoteca combinatoria conocidos en la técnica, que incluyen: genotecas biológicas; genotecas de fase sólida paralela espacialmente direccionable o fase en solución; métodos de genoteca sintética que requieren deconvolución; el método de genoteca "una perla un compuesto"; y métodos de genoteca sintética que utilizan la selección por cromatografía de afinidad. El enfoque de la genoteca biológica se limita a las genotecas de péptidos, mientras que los otros cuatro enfoques se aplican a genotecas de compuestos de oligómeros no peptídicos o de moléculas pequeñas (Lam, 1997, *Anticancer Drug Des.* 12:145; la patente de los Estados Unidos núm. 5,738,996; y la patente de los Estados Unidos núm. 5,807,683).

Ejemplos de métodos para la síntesis de genotecas moleculares pueden encontrarse en la técnica, por ejemplo en: DeWitt y otros, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6909; Erb y otros, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422; Zuckermann y otros, 1994, *J. Med. Chem.* 37:2678; Cho y otros, 1993, *Science* 261:1303; Carrell y otros, 1994, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059; Carell y otros, 1994, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2061; y Gallop y otros, 1994, *J. Med. Chem.* 37:1233.

Las genotecas de compuestos pueden presentarse, por ejemplo, en solución (por ejemplo, Houghten, 1992, *BioTechniques* 13:412-421), o sobre perlas (Lam, 1991, *Nature* 354:82-84), chips (Fodor, 1993, *Nature* 364:555-556), bacteria (la patente de los Estados Unidos núm. 5,223,409), esporas (los documentos de patentes núms. 5,571,698; 5,403,484; y 5,223,409), plásmidos (Cull y otros, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1865-1869) o fagos (Scott y Smith, 1990, *Science* 249:386-390; Devlin, 1990, *Science* 249:404-406; Cwirla y otros, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6378-6382; y Felici, 1991, *J. Mol. Biol.* 222:301-310).

En un ejemplo, los agentes que interaccionan con (es decir, se unen a) BST1, a un fragmento BST1 (por ejemplo, un fragmento funcionalmente activo), un polipéptido relacionado con BST1, un fragmento de un polipéptido relacionado con BST1, o una proteína de fusión a BST1 se identifican en un sistema de ensayo basado en células. De conformidad con este ejemplo, las células que expresan BST1, un fragmento de un BST1, un polipéptido relacionado con BST1, un fragmento del polipéptido relacionado con BST1 o una proteína de fusión BST1 están en contacto con un compuesto candidato o un compuesto de control y se determina la capacidad del compuesto candidato para interactuar con BST1. Si se desea, este ensayo puede usarse para examinar una pluralidad (por ejemplo, una genoteca) de compuestos candidatos. La célula, por ejemplo, puede ser de origen procariótico (por ejemplo, *E. coli*) u origen eucariótico (por ejemplo, levadura o mamífero). Además, las células pueden expresar BST1, un fragmento de BST1, un polipéptido relacionado con BST1, un fragmento del polipéptido relacionado con BST1, o una proteína de fusión BST1 endógena o ser modificadas genéticamente para expresar BST1, un fragmento de BST1, un fragmento BST1, un fragmento del polipéptido relacionado con BST1, o una proteína de fusión BST1. En ciertos casos, BST1, un fragmento de BST1, un polipéptido relacionado con BST1, un fragmento del polipéptido relacionado con BST1, o una proteína de fusión BST1 o el compuesto candidato, se marca, por ejemplo, con un marcador radioactivo (tal como P<sup>32</sup>, S<sup>35</sup> e I<sup>125</sup>) o un marcador fluorescente (tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofococianina, o-ftaldehído o fluorescamina) para permitir la detección de una interacción entre BST1 y un compuesto candidato. La capacidad del compuesto candidato para interactuar directa o indirectamente con BST1, un fragmento de un BST1, un polipéptido relacionado con BST1, un fragmento de un polipéptido relacionado con BST1 o una proteína de fusión BST1 puede determinarse por métodos conocidos por un experto en la técnica. Por ejemplo, la interacción entre un compuesto candidato y BST1, un polipéptido relacionado con BST1, un fragmento de un polipéptido relacionado con BST1, o una proteína de fusión BST1 puede determinarse mediante citometría de flujo, un ensayo de escintilación, inmunoprecipitación o análisis de transferencia en membrana de tipo Western.

En otro ejemplo, los agentes que interactúan con (es decir, se unen a) BST1, a un fragmento BST1 (por ejemplo, un fragmento funcionalmente activo), un polipéptido relacionado con BST1, un fragmento de un polipéptido relacionado con BST1, o una proteína de fusión BST1 se identifican en un sistema de ensayo libre de células. De conformidad con este ejemplo, BST1 nativo o recombinante o su fragmento, o un polipéptido relacionado con BST1 nativo o recombinante o su fragmento, o una proteína de fusión a BST1 o su fragmento, se pone en contacto con un compuesto candidato o un compuesto de control y se determina la capacidad del compuesto candidato para interactuar con BST1 o un polipéptido relacionado, o una proteína de fusión a BST1. Si se desea, este ensayo puede usarse para examinar una pluralidad (por ejemplo, una genoteca) de compuestos candidatos. Preferentemente, se inmoviliza primero, BST1, un fragmento BST1, un polipéptido relacionado con BST1, un fragmento de un polipéptido relacionado con BST1 o una proteína de fusión a BST1, mediante, por ejemplo, poner en contacto a BST1, un fragmento de BST1, un polipéptido relacionado con BST1, un fragmento de un polipéptido relacionado con BST1, o una proteína de fusión a BST1 con un anticuerpo inmovilizado (u otro reactivo de afinidad) que lo reconoce específicamente y lo une, o mediante el contacto de una preparación purificada de BST1, un fragmento BST1, un polipéptido relacionado con BST1, un fragmento de un polipéptido relacionado con BST1, o una proteína de fusión a BST1 con una superficie diseñada para unir proteínas. BST1, un fragmento BST1, un polipéptido relacionado con BST1, un fragmento de un polipéptido relacionado con BST1, o una proteína de fusión BST1 pueden purificarse parcialmente o completamente (por ejemplo, parcial o totalmente libres de otros polipéptidos) o parte de un lisado celular. Además, BST1, un fragmento BST1, un polipéptido relacionado con BST1 o un fragmento de un polipéptido relacionado con BST1 puede ser una proteína de fusión que comprende BST1 o una porción biológicamente activa de la misma o un polipéptido relacionado con BST1 y un dominio tal como glutatión S- transferasa. Alternativamente, BST1, un fragmento BST1, un polipéptido relacionado con BST1, un fragmento de un polipéptido relacionado con BST1 o una proteína de fusión BST1 pueden biotinilarse usando técnicas que se conocen

bien por los expertos en la técnica (por ejemplo, estuche de biotilación, Pierce Chemicals; Rockford, Illinois). La capacidad del compuesto candidato para interactuar con BST1, un fragmento de un BST1, un polipéptido relacionado con BST1, un fragmento de un polipéptido relacionado con BST1 o una proteína de fusión BST1 puede determinarse por los métodos que se conocen por un experto en la técnica.

5

En otro ejemplo, se usa un sistema de ensayo basado en células para identificar agentes que se unen o modulan la actividad de una proteína, tal como una enzima, o su porción biológicamente activa, que es responsable de la producción o degradación de BST1 o es responsable de la modificación postraduccional de BST1. En una selección primaria, se ponen en contacto una pluralidad (por ejemplo, una genoteca) de compuestos con las células que expresan natural o recombinantemente: (i) BST1, una isoforma de BST1, un homólogo de BST1, un polipéptido relacionado con BST1, una proteína de fusión BST1, o cualquier fragmento activo biológicamente de los anteriores; y (ii) una proteína que es responsable del procesamiento de BST1, una isoforma de BST1, un homólogo de BST1, un polipéptido relacionado con BST1, una proteína de fusión BST1, o un fragmento para identificar compuestos que modulan la producción, degradación, o modificación post translacional de BST1, una isoforma de BST1, un homólogo de BST1, un polipéptido relacionado con BST1, una proteína o fragmento de fusión BST1. Si se desea, los compuestos identificados en el tamizaje primario pueden ensayarse en un tamizaje secundario frente a las células que expresan a BST1 natural o de forma recombinante. La capacidad del compuesto candidato para modular la producción, degradación o modificación postraduccional de BST1, isoforma, homólogo, polipéptido relacionado con BST1 o proteína de fusión BST1 puede determinarse por métodos que se conocen por los expertos en la técnica, que incluyen sin limitarse, citometría de flujo, un ensayo de escintilación, inmunoprecipitación y análisis de transferencia en membrana de tipo Western.

10

15

20

En otro ejemplo, los agentes que interactúan competitivamente con (es decir, se unen a) BST1, a un fragmento BST1, un polipéptido relacionado con BST1, un fragmento de un polipéptido relacionado con BST1, o una proteína de fusión a BST1 se identifican en un ensayo de unión competitiva. De conformidad con este ejemplo, las células que expresan BST1, un fragmento de BST1, un polipéptido relacionado con BST1, un fragmento de un polipéptido relacionado con BST1 o una proteína de fusión a BST1 se ponen en contacto con un compuesto candidato y un compuesto que se conoce que interactúa con BST1, un fragmento de BST1, un polipéptido relacionado con BST1, un fragmento de un polipéptido relacionado con BST1 o una proteína de fusión a BST1; después se determina la capacidad del compuesto candidato para interactuar preferentemente con BST1, un fragmento BST1, un polipéptido relacionado con BST1, un fragmento de un polipéptido relacionado con BST1 o una proteína de fusión a BST1. Alternativamente, los agentes que interactúan preferentemente (es decir, se unen a) BST1, un fragmento de BST1, un polipéptido relacionado con BST1 o un fragmento de un polipéptido relacionado con BST1 se identifican en un sistema de ensayo libre de células mediante el contacto con BST1, un fragmento de BST1, un polipéptido relacionado con BST1, un fragmento de un polipéptido relacionado con BST1, o una proteína de fusión a BST1 con un compuesto candidato y un compuesto que se conoce que interactúa con BST1, un polipéptido relacionado con BST1 o una proteína de fusión a BST1. Como se indicó anteriormente, la capacidad del compuesto candidato para interactuar con BST1, un fragmento de un BST1, un polipéptido relacionado con BST1, un fragmento de un polipéptido relacionado con BST1 o una proteína de fusión a BST1 puede determinarse por los métodos que se conocen por un experto en la técnica. Estos ensayos, ya sean celulares o libres de células, pueden usarse para tamizar una pluralidad (por ejemplo, una genoteca) de compuestos candidatos.

25

30

35

40

En otro ejemplo, los agentes que modulan (es decir, sobrerregulan o regulan negativamente) la expresión o la actividad de BST1 o un polipéptido relacionado con BST1 se identifican poniendo en contacto las células (por ejemplo, células de origen procariota u origen eucariótico) que expresan BST1 o un polipéptido relacionado con un compuesto candidato o un compuesto control (por ejemplo, solución salina regulada con fosfato (PBS)) y que determinan la expresión de BST1, un polipéptido relacionado con BST1, o una proteína de fusión BST1, o el ARNm que codifica el polipéptido relacionado con BST1. El nivel de expresión de BST1, el polipéptido relacionado con BST1, el ARNm que codifica BST1, o el ARNm que codifica el polipéptido relacionado con BST1 en presencia del compuesto candidato se compara con el nivel de expresión de BST1, el polipéptido relacionado con BST1, el ARNm que codifica BST1, o el ARNm que codifica el polipéptido relacionado con BST1 en ausencia del compuesto candidato (por ejemplo, en presencia de un compuesto control). El compuesto candidato puede identificarse después como un modulador de la expresión de BST1, o el polipéptido relacionado con BST1 basado en esta comparación. Por ejemplo, cuando la expresión de BST1 o el ARNm es significativamente mayor en presencia del compuesto candidato que en su ausencia, el compuesto candidato se identifica como un estimulador de expresión de BST1 o del ARNm. Alternativamente, cuando la expresión de BST1 o el ARNm es significativamente menor en presencia del compuesto candidato que en su ausencia, el compuesto candidato se identifica como un inhibidor de la expresión de BST1 o del ARNm. El nivel de expresión de BST1 o el ARNm que lo codifica puede determinarse por métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la expresión de ARNm puede evaluarse mediante análisis de transferencia de tipo Northern o RT-PCR, y los niveles de proteína pueden evaluarse mediante el análisis de transferencia en membranas de tipo Western.

45

50

55

60

En otro ejemplo, los agentes que modulan la actividad de BST1 o un polipéptido relacionado con BST1 se identifican poniendo en contacto una preparación que contiene BST1 o un polipéptido relacionado con BST1 (por ejemplo, células procarióticas o eucariotas) que expresan BST1 o polipéptido relacionado con BST1 con un compuesto de prueba o un compuesto de control y determinan la capacidad del compuesto de prueba para modular (por ejemplo, estimular o inhibir) la actividad del BST1 o del polipéptido relacionado con BST1. La actividad de BST1 o un polipéptido relacionado con BST1 puede evaluarse mediante la detección de la inducción de una vía celular de transducción de señales de

65

BST1 o un polipéptido relacionado con BST1 (por ejemplo, Ca<sup>2+</sup> intracelular, diacilglicerol, IP3, etc.), la detección de actividad catalítica o enzimática del objetivo en un sustrato adecuado, la detección de la inducción de un gen reportero (por ejemplo, un elemento regulador que es responsable del BST1 o un polipéptido relacionado con BST1 y que está operativamente unido a un ácido nucleico que codifica un marcador detectable, por ejemplo, luciferasa), o la detección de una respuesta celular, por ejemplo, la diferenciación celular, o la proliferación celular. Basado en la presente descripción, pueden usarse técnicas conocidas por los expertos en la técnica para medir estas actividades (ver, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos núm. 5,401,639). El compuesto candidato puede identificarse después como un modulador de la actividad de BST1 o un polipéptido relacionado con BST1 al comparar los efectos del compuesto candidato con el compuesto de control. Los compuestos de control adecuados incluyen solución salina tamponada con fosfato (PBS) y solución salina normal (NS).

En otro ejemplo, los agentes que modulan (es decir, sobrerregulan o regulan negativamente) la expresión, la actividad o tanto la expresión como la actividad de BST1 o un polipéptido relacionado con BST1 se identifican en un modelo animal. Ejemplos de animales adecuados incluyen, pero no se limitan a, ratones, ratas, conejos, monos, conejillos de indias, perros y gatos. Preferentemente, el animal que se usa representa un modelo de las enfermedades de la invención (por ejemplo, xenoinjertos de líneas celulares de cáncer de mama tales como MCF-7 (Ozzello L, Sordat M., *Eur J Cancer*. 1980;16:553-559) y MCF10AT (Miller y otros, *J Natl Cancer Inst*. 1993;85:1725-1732) en ratones desnudos o SCID; xenoinjertos de líneas celulares de cáncer colorrectal humano tales como MDA-MB-345 en ratones SCID privados de estrógenos, Eccles y otros 1994 *Cell Biophysics* 24/25, 279; xenoinjertos de líneas celulares de cáncer de riñón tales como CAKI-1 (Matthews PN, Grant AG, Hermon-Taylor J. *Br J Cancer*. 1984 febrero; 49(2): 193-198), 786-O (G. J. STREWLER y otros *Endocrinology* Vol. 119, No. 1 303-310) y ACHN (Zeng J, Mei W, Huang H, Li X, Kong P.; *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2002;22(4):331-3) en ratones desnudos; xenoinjertos de líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas tales como A549 y H460 y xenoinjertos de líneas celulares de cáncer de pulmón de células pequeñas tales como NCI-H345 o xenoinjertos de líneas celulares de cáncer pancreático tales como MIA PaCa-2 en ratones desnudos, Marincola y otros, *J Surg Res* 1989 Diciembre;47(6):520-9). Estos pueden usarse para probar los compuestos que modulan los niveles de BST1, ya que la patología que se exhibe en estos modelos es similar a la de, por ejemplo, las enfermedades de la invención. De conformidad con este ejemplo, se administra el compuesto de prueba o un compuesto de control (por ejemplo, por vía oral, rectal o parenteral, tales como intraperitoneal o intravenosa) a un animal adecuado y se determina el efecto sobre la expresión, la actividad o tanto la expresión como la actividad de BST1 o el polipéptido relacionado con BST1. Los cambios en la expresión de BST1 o de un polipéptido relacionado con BST1 pueden evaluarse por los métodos descritos anteriormente.

Aún en otro ejemplo, BST1 o un polipéptido relacionado con BST1 se utiliza como una "proteína de cebo" en un ensayo de dos híbridos o ensayo de tres híbridos para identificar otras proteínas que se unen o interactúan con BST1 o un polipéptido relacionado con BST1 (ver, por ejemplo la patente de los Estados Unidos núm. 5,283,317; Zervos y otros (1993) *Cell* 72:223-232; Madura y otros (1993) *J. Biol. Chem*. 268:12046-12054; Bartel y otros (1993) *BioTechniques* 14:920-924; Iwabuchi y otros (1993) *Oncogene* 8:1693-1696; y la publicación PCT núm. WO 94/10300). Como apreciarán los expertos en la técnica, tales proteínas de unión estarán probablemente implicadas también en la propagación de señales por BST1 como, por ejemplo, elementos corriente arriba o corriente abajo de una vía de señalización que involucra BST1.

Esta descripción proporciona además nuevos agentes que se identifican mediante los ensayos de tamizaje descritos anteriormente y sus usos para tratamientos como se describen en la presente descripción. Adicionalmente, la descripción se refiere también al uso de un agente que interactúa con, o modula la actividad de, BST1 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de las enfermedades de la invención.

#### Uso terapéutico de BST1

La invención se refiere al tratamiento o prevención de diversas enfermedades y trastornos mediante la administración de un anticuerpo, su fragmento funcional o un mimético de anticuerpo que se une a BST1. Otros compuestos terapéuticos descritos incluyen pero no se limitan a: BST1, análogos de BST1, polipéptidos y derivados relacionados con BST1 (que incluyen sus fragmentos); u otros reactivos de afinidad para los anteriores; ácidos nucleicos que codifican BST1, análogos de BST1, polipéptidos relacionados con BST1 y sus fragmentos; ácidos nucleicos antisentido a un gen que codifica BST1 o un polipéptido relacionado con BST1; y un modulador (por ejemplo agonistas y antagonistas) de un gen que codifica BST1 o a un polipéptido relacionado con BST1. Una característica importante de la descripción es la identificación de genes que codifican la variante iónica de BST1 implicada en cánceres tales como las enfermedades de la invención. Las enfermedades de la invención, por ejemplo, pueden tratarse (por ejemplo, para mejorar los síntomas o para retrasar el inicio o la progresión) o prevenir mediante la administración de un compuesto terapéutico que reduce la función o expresión de BST1 en el suero o tejido de sujetos que tienen las enfermedades de la invención.

En una modalidad, uno o más anticuerpos (u otros reactivos de afinidad) que se unen específicamente a BST1 se administran solos o en combinación con uno o más compuestos terapéuticos o tratamientos adicionales.

Un producto biológico tal como un anticuerpo (u otro reactivo de afinidad) es alogénico para el sujeto al que se le administra. En una modalidad, un anticuerpo (u otro reactivo de afinidad) a un BST1 humano o un polipéptido

relacionado con BST1 humano, se administra a un sujeto humano para la terapia (por ejemplo, para mejorar los síntomas o para retardar el inicio o la progresión) o profilaxis.

5 Sin estar limitado por la teoría, se concibe que la actividad terapéutica de los anticuerpos (u otros reactivos de afinidad) que se unen específicamente a BST1 puede lograrse a través del fenómeno de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) (ver, por ejemplo, Janeway Jr. C.A. y otros, *Immunobiology*, 5ta ed., 2001, Garland Publishing, ISBN 0-8153-3642-X; Pier G.B. y otros, *Immunology, Infection, and Immunity*, 2004, págs. 246-5; Albanell J. y otros, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2003, 532:págs.2153-68 y Weng, W.-K. y otros, *Journal of Clinical Oncology*, 2003, 21:págs 3940-3947).

10 Tratamiento y prevención de las enfermedades de la invención

15 Las enfermedades de la invención, por ejemplo, se tratan o se previenen mediante la administración a un sujeto que se sospecha que tiene o se sabe que tiene las enfermedades de la invención o que está en riesgo de desarrollar las enfermedades de la invención, de un compuesto que modula (es decir, aumenta o disminuye) el nivel o la actividad (es decir, función) de BST1 que está diferencialmente presente en el suero o tejido de sujetos que tienen las enfermedades de la invención en comparación con el suero o tejido de sujetos libres de las enfermedades de la invención. En un ejemplo, las enfermedades de la invención se tratan o se previenen mediante la administración a un sujeto que se sospecha que tiene o se sabe que tiene las enfermedades de la invención o que está en riesgo de desarrollar las enfermedades de la invención un compuesto que sobrerregula (es decir, incrementa) el nivel o la actividad (es decir, función) de BST1 que están disminuidos en el suero o tejido de sujetos que tienen las enfermedades de la invención. Ejemplos de tales compuestos incluyen, pero no se limitan a, oligonucleótidos antisentido de BST1, ribozimas, anticuerpos (u otros reactivos de afinidad) dirigidos contra BST1, y compuestos que inhiben la actividad enzimática de BST1. Otros compuestos útiles, por ejemplo, los antagonistas de BST1 y los antagonistas de BST1 de molécula pequeña, pueden identificarse usando ensayos *in vitro*.

25 El cáncer, por ejemplo, las enfermedades de la invención además, se tratan o se previenen mediante la administración a un sujeto que se sospecha que tiene o que se sabe que tiene tal cáncer, o que está en riesgo de desarrollar dicho cáncer, de un compuesto que regula negativamente el nivel o la actividad (es decir, la función) de BST1 que se incrementan en el suero o tejido de los sujetos que tienen tal cáncer. Ejemplos del compuesto de este tipo incluyen, pero no se limitan a: BST1, fragmentos BST1 y polipéptidos relacionados con BST1; ácidos nucleicos que codifican BST1, un fragmento BST1 y un polipéptido relacionado con BST1 (por ejemplo, para uso en terapia génica); y, para aquellos BST1 o polipéptidos relacionados con BST1 con actividad enzimática, compuestos o moléculas conocidos para modular esa actividad enzimática. Otros compuestos que pueden usarse, por ejemplo, agonistas de BST1, pueden identificarse usando ensayos *in vitro*.

30 En otro ejemplo, la terapia o profilaxis se adapta a las necesidades de un sujeto individual. Por lo tanto, en ejemplos específicos, los compuestos que promueven el nivel o la función de BST1 se administran terapéutica o profilácticamente a un sujeto que se sospecha que tiene o se sabe que tiene cáncer, por ejemplo, las enfermedades de la invención, cuyos niveles o funciones de BST1 están ausentes o disminuidas con relación a un intervalo de referencia normal o de control. En ejemplos adicionales, los compuestos que promueven el nivel o la función de BST1 se administran terapéutica o profilácticamente a un sujeto que se sospecha que tiene o se sabe que tiene cáncer, por ejemplo, las enfermedades de la invención, cuyos niveles o funciones de BST1 se aumentan con relación a un intervalo de referencia normal o de control. En ejemplos adicionales, los compuestos que disminuyen el nivel o la función de BST1 se administran terapéutica o profilácticamente a un sujeto que se sospecha que tiene o se sabe que tiene cáncer, por ejemplo, las enfermedades de la invención, cuyos niveles o funciones de BST1 se aumentan con relación a un intervalo de referencia normal o de control. En ejemplos adicionales, los compuestos que disminuyen el nivel o la función de BST1 se administran terapéutica o profilácticamente a un sujeto que se sospecha que tiene o se sabe que tiene cáncer, por ejemplo, las enfermedades de la invención, cuyos niveles o funciones de BST1 se disminuyen con relación a un control o a un intervalo de referencia. El cambio en la función o el nivel de BST1 debido a la administración de tales compuestos puede detectarse fácilmente, por ejemplo, mediante la obtención de una muestra (por ejemplo, sangre u orina) y el ensayo *in vitro* de los niveles o actividades de BST1, o los niveles de los ARNm que codifican BST1, o cualquier combinación de los anteriores. Tales ensayos pueden realizarse antes y después de la administración del compuesto como se describe en la presente descripción.

40 Los compuestos de la descripción incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, una molécula orgánica pequeña, proteína, péptido, anticuerpo (u otro reactivo de afinidad), ácido nucleico, etc., que restaura el perfil BST1 hacia lo normal. Los compuestos de la descripción pueden administrarse en combinación con cualquier otro de los fármacos quimioterapéuticos.

60 Terapia con vacuna

65 En la presente se describe además, una composición inmunogénica, adecuadamente una composición vacunal, que comprende BST1 o un fragmento que contiene un epítipo de éste, o ácido nucleico que codifica BST1 o su fragmento, opcionalmente junto con un inmunoestimulante.

Además se proporciona un método para aumentar una respuesta inmune que comprende administrar a un sujeto tales composiciones y un método para tratar o prevenir el cáncer, por ejemplo, las enfermedades de la invención que comprenden administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de tales composiciones y para el uso de tales composiciones en la prevención o el tratamiento de las enfermedades de la invención.

Por lo tanto, BST1 puede ser útil como material antigénico, y puede usarse en la producción de vacunas para el tratamiento o la profilaxis del cáncer, por ejemplo, las enfermedades de la invención. Tal material puede ser "antigénico" y/o "inmunogénico". Generalmente, se entiende por "antigénico" que la proteína es capaz de usarse para producir anticuerpos (u otros reactivos de afinidad) o, de hecho, es capaz de inducir una respuesta de anticuerpos en un sujeto o animal experimental. Se entiende por "inmunogénico" que la proteína es capaz de provocar una respuesta inmune tal como una respuesta inmune protectora en un sujeto o animal experimental. Por lo tanto, en este último caso, la proteína no sólo debe ser capaz de generar una respuesta de anticuerpos sino, además, respuestas inmunitarias sin base de anticuerpos. "Inmunogénico" abarca además si la proteína puede inducir una respuesta de tipo inmune en un arreglo in vitro, por ejemplo, un ensayo de proliferación de células T. La generación de una respuesta inmune apropiada puede requerir la presencia de uno o más adyuvantes y/o la presentación apropiada de un antígeno.

El experto en la técnica apreciará que los homólogos o derivados de BST1 encontrarán además uso como material antigénico/inmunogénico. Por lo tanto, por ejemplo, las proteínas que incluyen una o más adiciones, deleciones, sustituciones o similares se abarcan en la presente descripción. Adicionalmente, puede ser posible reemplazar un aminoácido por otro de "tipo" similar, por ejemplo, que reemplaza un aminoácido hidrofóbico por otro. Puede usarse un programa como el programa CLUSTAL para comparar secuencias de aminoácidos. Este programa compara las secuencias de aminoácidos y encuentra el alineamiento óptimo mediante la inserción de espacios en cualquier secuencia según sea apropiado. Es posible calcular la identidad o similitud de aminoácidos (identidad más conservación del tipo de aminoácido) para un alineamiento óptimo. Un programa como el BLASTx alineará el tramo más largo de secuencias similares y asignará un valor al ajuste. Por lo tanto, es posible obtener una comparación donde se encuentran varias regiones de similitud, cada una con una puntuación diferente. Ambos tipos de análisis se contemplan en la presente descripción.

En el caso de homólogos y derivados, el grado de identidad con una proteína como se describe en la presente descripción es menos importante que el homólogo o derivado conserven su antigenicidad y/o inmunogenicidad. Sin embargo, se proporcionan, adecuadamente, homólogos o derivados que tienen al menos 60 % de similitud (como se discutió anteriormente) con las proteínas o polipéptidos descritos en la presente, por ejemplo, se proporcionan homólogos o derivados que tienen al menos 70 % de similitud, tal como al menos 80 % de similitud. Particularmente, se proporcionan homólogos o derivados que tienen al menos 90 % o incluso 95 % de similitud. Convenientemente, los homólogos o derivados tienen al menos un 60 % de identidad de secuencia con las proteínas o polipéptidos descritos en la presente descripción. Preferentemente, los homólogos o derivados tienen al menos 70 % de identidad, con mayor preferencia al menos 80 % de identidad. Con la máxima preferencia, homólogos o derivados que tienen al menos 90 % o incluso 95 % de identidad.

En un enfoque alternativo, los homólogos o derivados podrán ser proteínas de fusión, que incorporan porciones que facilitan la purificación, por ejemplo mediante el etiquetado eficaz de la proteína o el polipéptido deseado. Puede ser necesario eliminar la "etiqueta" o puede ser el caso que la propia proteína de fusión retenga antigenicidad suficiente para ser útil.

Se conoce bien que es posible tamizar una proteína o polipéptido antigénico para identificar regiones epitópicas, es decir, las regiones que son responsables de la antigenicidad o inmunogenicidad del polipéptido o de la proteína. Los métodos que se conocen bien por el experto en la técnica pueden usarse para probar fragmentos y/o homólogos y/o derivados de la antigenicidad. Por lo tanto, los fragmentos de la descripción deben incluir una o más de dichas regiones epitópicas o ser suficientemente similares a dichas regiones para retener sus propiedades antigénicas/inmunogénicas. Por lo tanto, de conformidad con la descripción, el grado de identidad para los fragmentos es tal vez irrelevante, puesto que pueden ser 100 % idénticos a una parte particular de una proteína o polipéptido, homólogo o derivado como se describe en la presente descripción. La cuestión clave, una vez más, es que el fragmento conserva las propiedades antigénicas/inmunogénicas de la proteína de la que se deriva.

Lo que es importante para homólogos, derivados y fragmentos es que poseen al menos un grado de la antigenicidad/inmunogenicidad de la proteína o polipéptido del que se derivan. Por lo tanto, en un aspecto adicional de la descripción, se proporcionan fragmentos antigénicos/o inmunogénicos de BST1, o sus homólogos o derivados.

BST1, o sus fragmentos antigénicos, pueden proporcionarse solos, como una preparación purificada o aislada. Pueden proporcionarse como parte de una mezcla con una o más proteínas de la descripción, o sus fragmentos antigénicos. En una descripción adicional se proporciona una composición de antígeno que comprende BST1 y/o uno o más de sus fragmentos antigénicos. Tal composición puede usarse para la detección y/o el diagnóstico de cáncer, por ejemplo, las enfermedades de la invención.

Las composiciones vacunales de conformidad con la descripción pueden ser una composición de vacuna profiláctica o terapéutica.

- 5 Las composiciones vacunales de la descripción pueden incluir uno o más adyuvantes (inmunoestimulantes). Ejemplos que se conocen bien en la técnica incluyen geles inorgánicos, tales como hidróxido de aluminio, y emulsiones de agua en aceite, tales como el adyuvante incompleto de Freund. Otros adyuvantes útiles se conocerán bien por el experto en la técnica.
- 10 Adyuvantes adecuados para usar en las composiciones vacunales para el tratamiento de cáncer incluyen: el lípido A monofosforil 3De-O-acilado (que se conoce como 3D-MPL o simplemente MPL ver documento de la patente núm. WO92/116556), una saponina, por ejemplo QS21 o QS7, y TLR4, agonistas tales como una molécula que contiene CpG, por ejemplo como se describe en el documento de la patente núm. WO95/26204. Los adyuvantes que se emplean pueden ser una combinación de componentes, por ejemplo MPL y QS21 o MPL, QS21 y una porción que contiene CpG.
- 15 Los adyuvantes pueden formularse como emulsiones de aceite en agua o formulaciones liposómicas. Tales preparados pueden incluir otros vehículos.

En otro ejemplo, se usa una preparación de oligonucleótidos que comprende 10 o más nucleótidos complementarios consecutivos a una secuencia de nucleótidos que codifica BST1 o fragmentos de péptido BST1 como vacunas para el tratamiento del cáncer, por ejemplo, las enfermedades de la invención. Tales preparados pueden incluir adyuvantes u otros vehículos.

Inhibición de BST1 para tratar las enfermedades de la invención

25 En un ejemplo, el cáncer, por ejemplo, las enfermedades de la invención, se tratan o previenen mediante la administración de un compuesto que antagoniza (inhibe) el nivel y/o la función de BST1 que está elevado en el suero o tejido de sujetos que tienen tal cáncer en comparación con el suero o tejido de sujetos libres de dicho cáncer.

30 Los compuestos útiles para este propósito incluyen pero no se limitan a, anticuerpos anti BST1 (u otros reactivos de afinidad, y sus fragmentos y derivados que contienen la región de unión), ácidos nucleicos ribosomales o antisentido de BST1 y ácidos nucleicos que codifican BST1 disfuncional que puede usarse para "suprimir genes" de la función BST1 endógena por recombinación homóloga (ver, por ejemplo, Capecchi, 1989, *Science* 244:1288-1292). Otros compuestos que inhiben la función de BST1 pueden identificarse mediante el uso de ensayos *in vitro* conocidos, por ejemplo, ensayos para la capacidad de un compuesto de prueba para inhibir la unión de BST1 a otra proteína o un par de unión, o para inhibir una función conocida de BST1.

35 Tal inhibición puede, por ejemplo, ensayarse *in vitro* o en cultivo celular, pero pueden emplearse también en ensayos genéticos. Las tecnologías preferidas pueden usarse además para detectar niveles de BST1 antes y después de la administración del compuesto. Ensayos *in vitro* o *in vivo* adecuados pueden usarse para determinar el efecto de un compuesto específico y si su administración se indica para el tratamiento del tejido afectado, como se describe detalladamente más abajo.

40 En un ejemplo específico, se administra terapéutica o profilácticamente un compuesto que inhibe la función (actividad) de BST1 a un sujeto en el que se detecta un aumento del nivel en suero o tejido o de la actividad funcional de BST1 (por ejemplo, mayor que el nivel normal o el nivel deseado) en comparación con el suero o tejido de sujetos con, por ejemplo, las enfermedades de la invención que no reciben tratamiento de conformidad con la descripción o para llevar el nivel o actividad que se encontró en sujetos libres de tal cáncer, o un intervalo de referencia predeterminado. Los métodos estándar en la técnica pueden emplearse para medir el aumento en el nivel o función de BST1, como se indicó anteriormente. Las composiciones inhibidoras de BST1 adecuadas pueden, por ejemplo, incluir moléculas pequeñas, es decir, moléculas de 1000 daltons o menos. Tales moléculas pequeñas pueden identificarse por los métodos de tamizaje descritos en la presente descripción.

Ensayos para compuestos profilácticos o terapéuticos

55 La presente descripción proporciona además ensayos para usar en el descubrimiento de fármacos para identificar o verificar la eficacia de compuestos para el tratamiento o la prevención de cánceres que expresan el dominio extracelular de BST1, por ejemplo, las enfermedades de la invención.

60 Por lo tanto, se describe un método de tamizaje de compuestos que modulan la actividad de BST1, el método que comprende: (a) poner en contacto BST1 o su porción biológicamente activa con un compuesto candidato; y (b) determinar si la actividad de BST1 se modula de ese modo. Tal proceso puede comprender (a) poner en contacto a BST1 o su porción biológicamente activa con un compuesto candidato en una muestra; y (b) comparar la actividad de BST1 o su porción biológicamente activa en dicha muestra después del contacto con dicho compuesto candidato con la actividad de BST1 o su porción biológicamente activa en dicha muestra antes del contacto con dicho compuesto candidato, o con un nivel de referencia de la actividad.

El método de tamizaje puede ser un método de tamizaje para compuestos que inhiben la actividad de BST1.

5 La BST1 o su parte biológicamente activa puede, por ejemplo, expresarse sobre o mediante una célula. La BST1 o su parte biológicamente activa puede, por ejemplo, aislarse a partir de células que la expresan. La BST1 o su porción biológicamente activa puede, por ejemplo, inmovilizarse sobre una fase sólida.

10 Se describe además un método de tamizaje para compuestos que modulan la expresión de BST1 o del ácido nucleico que codifica BST1, el método que comprende: (a) poner en contacto las células que expresan BST1 o el ácido nucleico que codifica BST1 con un compuesto candidato; y (b) determinar si la expresión de BST1 o el ácido nucleico que codifica BST1 se modula de ese modo. Tal procedimiento puede comprender (a) poner en contacto células que expresan BST1 o el ácido nucleico que codifica BST1 con un compuesto candidato en una muestra; y (b) comparar la expresión de BST1 o el ácido nucleico que codifica BST1 en las células en dicha muestra después de poner en contacto dicho compuesto candidato con la expresión de BST1 o el ácido nucleico que codifica BST1 en células en dicha muestra antes del contacto con dicho compuesto candidato, o con un nivel de expresión de referencia.

15 El método puede ser un método de tamizaje para compuestos que inhiben la expresión de BST1 o del ácido nucleico que codifica BST1.

20 En la presente descripción se describe también: un compuesto que se obtiene mediante un método de tamizaje antes mencionado, un compuesto que modula la actividad o la expresión de BST1 o del ácido nucleico que codifica BST1, por ejemplo, un compuesto que inhibe la actividad o la expresión de BST1 o del ácido nucleico que codifica BST1.

25 Dicho compuesto se describe para usarlo en el tratamiento o la prevención del cáncer, por ejemplo, las enfermedades de la invención. Se describe también un método para tratar o prevenir el cáncer, por ejemplo, las enfermedades de la invención, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho compuesto.

30 Los compuestos de prueba pueden ensayarse para determinar su capacidad de restaurar los niveles de BST1 en un sujeto que tiene, por ejemplo, las enfermedades de la invención, hacia niveles encontrados en sujetos libres de dichos cánceres o para producir cambios similares en modelos animales experimentales de dichos cánceres. Los compuestos pueden restaurar los niveles de BST1 en un sujeto que tiene, por ejemplo, las enfermedades de la invención, hacia niveles encontrados en sujetos libres de dichos cánceres o para producir cambios similares en modelos experimentales de animales de dichos cánceres pueden usarse como compuestos líderes para la descubierta de fármacos adicionales, o usarse terapéuticamente. La expresión de BST1 puede ensayarse por las tecnologías preferidas, inmunoensayos, electroforesis en gel seguido por la visualización, detección de la actividad BST1, o cualquier otro método descrito en la presente descripción o conocido por los expertos en la técnica. Tales ensayos pueden usarse para detectar fármacos candidatos, en el control clínico o en el desarrollo de fármacos, donde la abundancia de BST1 puede servir como marcador sustituto para la enfermedad clínica.

40 En varios ejemplos específicos, pueden realizarse ensayos *in vitro* con células representativas de tipos de células implicadas en el trastorno de un sujeto, para determinar si un compuesto tiene un efecto deseado sobre tales tipos de células.

45 Los compuestos para su uso en la terapia pueden probarse en los sistemas de modelos animales adecuados antes de probarlos en humanos, incluyendo, pero sin limitarse a, ratas, ratones, pollos, vacas, monos, conejos, etc. Para probar *in vivo*, antes de administrar a los humanos, puede usarse cualquier sistema de modelo animal conocido en la técnica. Ejemplos de modelos animales de las enfermedades de la invención incluyen, pero no se limitan a, xenoinjertos de líneas celulares de cáncer de mama tales como MCF-7 (Ozzello L, Sordat M., *Eur J Cancer*. 1980;16:553-559) y MCF10AT (Miller y otros, *J Natl Cancer Inst*. 1993;85:1725-1732) en ratones desnudos o SCID; xenoinjertos de líneas celulares de cáncer colorrectal humano tales como MDA-MB-345 en ratones SCID carentes de estrógenos, Eccles y otros 1994 *Cell Biophysics* 24/25, 279; xenoinjertos de líneas celulares de cáncer de riñón tales como CAKI-1 (Matthews PN, Grant AG, Hermon-Taylor J. *Br J Cancer*. 1984 Febrero; 49(2): 193-198), 786-O (G. J. STREWLER y otros *Endocrinology* Vol. 119, No. 1 303-310) y ACHN (Zeng J, Mei W, Huang H, Li X, Kong P.; *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2002;22(4):331-3) en ratones desnudos; xenoinjertos de líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas tales como A549 y H460 y xenoinjertos de líneas celulares de cáncer de pulmón de células pequeñas tales como NCI-H345 o xenoinjertos de líneas celulares de cáncer pancreático tales como MIA PaCa-2 en ratones desnudos, Marincola y otros, *J Surg Res* 1989 Diciembre;47(6):520-9. Estos pueden usarse para probar los compuestos que modulan los niveles de BST1, ya que la patología que se exhibe en estos modelos es similar a la de, por ejemplo, las enfermedades de la invención. Es evidente también para el experto en la técnica que, basándose en la presente descripción, pueden producirse animales transgénicos con mutaciones "knock-out" del gen o genes que codifican BST1. Una mutación "knock-out" de un gen es una mutación que provoca que el gen mutado no se exprese, o se exprese en una forma aberrante o en un nivel bajo, de manera que la actividad asociada con el producto génico está casi o totalmente ausente. Preferentemente, el animal transgénico es un mamífero; con mayor preferencia, el animal transgénico es un ratón.

5 En un ejemplo, se identifican compuestos de prueba que modulan la expresión de BST1 en animales no humanos (por ejemplo, ratones, ratas, monos, conejos y cobayas), preferentemente modelos animales no humanos para las enfermedades de la invención que expresan BST1. De conformidad con este ejemplo, se administra un compuesto de prueba o un compuesto de control a los animales, y se determina el efecto del compuesto de prueba sobre la expresión de BST1. Puede identificarse un compuesto de prueba que altera la expresión de BST1 comparando el nivel de BST1 (o ARNm que codifica el mismo) en un animal o grupo de animales tratados con un compuesto de prueba con el nivel de BST1 o ARNm en un animal o grupo de animales tratados con un compuesto de control. Pueden usarse técnicas conocidas por los expertos en la técnica para determinar los niveles de ARNm y proteína, por ejemplo, hibridación *in situ*. Los animales pueden o no pueden ser sacrificados para ensayar los efectos de un compuesto de prueba.

15 En otro ejemplo, se identifican compuestos de prueba que modulan la actividad de BST1 o una porción biológicamente activa de los mismos en animales no humanos (por ejemplo ratones, ratas, monos, conejos y cobayas), preferentemente modelos animales no humanos para las enfermedades de la invención que expresan BST1. De conformidad con este ejemplo, se administra un compuesto de prueba o un compuesto de control a los animales, y se determina el efecto de un compuesto de prueba en la actividad de BST1. Puede identificarse un compuesto de prueba que altera la actividad de BST1 ensayando animales tratados con un compuesto de control y animales tratados con el compuesto de prueba. La actividad de BST1 puede evaluarse detectando la inducción de un segundo mensajero celular de BST1 (por ejemplo  $Ca^{2+}$ , intracelular, diacilglicerol, IP3, etc.), detectando la actividad catalítica o enzimática de BST1 o su pareja de unión, detectando la inducción de un gen reportero (por ejemplo, un elemento regulador que responde a BST1 operativamente unido a un ácido nucleico que codifica un marcador detectable, tal como luciferasa o proteína fluorescente verde), o detectando una respuesta celular (por ejemplo, diferenciación celular o proliferación celular). Pueden usarse técnicas conocidas por los expertos en la técnica para detectar cambios en la actividad de BST1 (ver, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos núm. 5,401,639).

25 Aún en otro ejemplo, los compuestos de prueba que modulan el nivel o la expresión de BST1 se identifican en los sujetos humanos que tienen por ejemplo las enfermedades de la invención, preferentemente los que tienen por ejemplo las enfermedades graves de la invención. De conformidad con este ejemplo, se administra un compuesto de prueba o un compuesto de control al sujeto humano y el efecto de un compuesto de prueba en la expresión de BST1 se determina analizando la expresión de BST1 o el ARNm que codifica el mismo en una muestra biológica (por ejemplo, suero, plasma u orina). Puede identificarse un compuesto de prueba que altera la expresión de BST1 comparando el nivel de BST1 o ARNm que codifica el mismo en un sujeto o grupo de sujetos tratados con un compuesto de control con el de un sujeto o grupo de sujetos tratados con un compuesto de prueba. Alternativamente, las alteraciones en la expresión de BST1 pueden identificarse comparando el nivel de BST1 o ARNm que codifica el mismo en un sujeto o grupo de sujetos antes y después de la administración de un compuesto de prueba. Pueden usarse técnicas conocidas por los expertos en la técnica para obtener la muestra biológica y analizar la expresión de proteína o ARNm. Por ejemplo, las tecnologías preferidas descritas en la presente descripción pueden usarse para evaluar cambios en el nivel de BST1.

40 En otro ejemplo, se identifican compuestos de prueba que modulan la actividad de BST1 en sujetos humanos que tienen, por ejemplo, las enfermedades de la invención (preferentemente aquellos con, por ejemplo, las enfermedades graves de la invención). En este ejemplo, se administra un compuesto de prueba o un compuesto de control al sujeto humano, y se determina el efecto de un compuesto de prueba sobre la actividad de BST1. Puede identificarse un compuesto de prueba que altera la actividad de BST1 comparando muestras biológicas de sujetos tratados con un compuesto de control con muestras de sujetos tratados con el compuesto de prueba. Alternativamente, las alteraciones en la actividad de BST1 pueden identificarse comparando la actividad de BST1 en un sujeto o grupo de sujetos antes y después de la administración de un compuesto de prueba. La actividad de BST1 puede evaluarse detectando en una muestra biológica (por ejemplo, suero, plasma u orina) la inducción de una ruta de transducción de señales celulares de BST1 (por ejemplo,  $Ca^{2+}$  intracelular, diacilglicerol, IP3, etc.), actividad catalítica o enzimática de BST1 o de una pareja de unión de la misma, o una respuesta celular, por ejemplo, diferenciación celular o proliferación celular. Pueden usarse técnicas conocidas por los expertos en la técnica para detectar los cambios en la inducción de un segundo mensajero de BST1 o cambios en una respuesta celular. Por ejemplo, la RT-PCR puede usarse para detectar cambios en la inducción de un segundo mensajero celular.

55 En otro ejemplo, se selecciona un compuesto de prueba que cambia el nivel o la expresión de BST1 hacia niveles detectados en sujetos control (por ejemplo seres humanos libres de, por ejemplo, las enfermedades de la invención) para prueba adicional o uso terapéutico. En otro ejemplo, se selecciona un compuesto de prueba que cambia la actividad de BST1 hacia la actividad encontrada en sujetos control (por ejemplo, seres humanos libres de, por ejemplo, las enfermedades de la invención) para prueba adicional o uso terapéutico.

60 En otro ejemplo, los compuestos de prueba que reducen la gravedad de uno o más síntomas asociados con, por ejemplo, las enfermedades de la invención se identifican en sujetos humanos que tienen, las enfermedades de la invención, preferentemente sujetos con las enfermedades graves de la invención. De conformidad con este ejemplo, se administra un compuesto de prueba o un compuesto de control a los sujetos, y se determina el efecto de un compuesto de prueba sobre uno o más síntomas de por ejemplo las enfermedades de la invención. Puede identificarse un compuesto de prueba que reduce uno o más síntomas comparando los sujetos tratados con un compuesto de control

con los sujetos tratados con el compuesto de prueba. Técnicas conocidas por médicos familiarizados con por ejemplo, las enfermedades de la invención pueden usarse para determinar si un compuesto de prueba reduce uno o más síntomas asociados con, por ejemplo, las enfermedades de la invención. Por ejemplo, un compuesto de prueba que reduce la carga tumoral en un sujeto que tiene, por ejemplo, las enfermedades de la invención será beneficioso para tal sujeto.

En otro ejemplo, un compuesto de prueba que reduce la gravedad de uno o más síntomas asociados con cáncer, por ejemplo las enfermedades de la invención, en un ser humano que tiene una de las enfermedades de la invención se selecciona para prueba adicional o uso terapéutico.

Composiciones terapéuticas y profilácticas y su uso

La descripción proporciona métodos de tratamiento (y profilaxis) que comprenden administrar a un sujeto una cantidad efectiva de un compuesto de la descripción.

En un ejemplo particular, el compuesto se purifica esencialmente (por ejemplo esencialmente libre de sustancias que limitan su efecto o producen efectos secundarios no deseados). El sujeto es por ejemplo un animal, que incluye pero no se limita a animales tales como vacas, cerdos, caballos, pollos, gatos, perros, etc., y es por ejemplo, un mamífero, tal como un ser humano. En un ejemplo específico, el sujeto es un mamífero no humano.

Las formulaciones y métodos para la administración que pueden emplearse cuando el compuesto comprende un ácido nucleico se describieron anteriormente; se describen más abajo las formulaciones y vías de administración adicionales adecuadas.

Se conocen varios sistemas de entrega y pueden usarse para administrar un compuesto de la descripción, por ejemplo la encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el compuesto, endocitosis mediada por receptores (ver, por ejemplo Wu y Wu, 1987, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral u otro, etc. Los métodos de introducción pueden ser entéricos o parenterales e incluyen, pero no se limitan a, vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. Las composiciones pueden administrarse por cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante infusión o inyección en bolo, mediante absorción a través de recubrimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Adicionalmente, puede ser deseable introducir las composiciones farmacéuticas de la descripción en el sistema nervioso central por cualquier vía adecuada, que incluyen la inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular puede facilitarse por un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un depósito, tal como un depósito de Ommaya. La administración pulmonar puede emplearse además, por ejemplo mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente de atomización.

En un ejemplo, un ácido nucleico empleado en la descripción puede administrarse en la dermis, por ejemplo empleando administración epidérmica mediada por partículas.

En una modalidad específica, puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas de la descripción localmente en la zona que necesita tratamiento; esto puede lograrse mediante, por ejemplo, y no como limitación, mediante infusión local durante la cirugía, aplicación tópica, por ejemplo, mediante inyección o por medio de un catéter o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, que incluyen membranas, tales como membranas silásticas o fibras. En una modalidad, la administración puede ser mediante inyección directa en, por ejemplo, tejido mieloide, mamario, colorrectal, renal, pulmonar o pancreático o en el sitio (o sitio anterior) de un tumor maligno o de un tejido neoplásico o pre-neoplásico.

En otra modalidad, el compuesto activo puede suministrarse en una vesícula, en particular un liposoma (ver Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533; Treat y otros, en *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein y Fidler (eds.), Liss, Nueva York, págs. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, págs. 317-327; ver generalmente *ibid.*)

En aun otra modalidad, el compuesto puede suministrarse en un sistema de liberación controlada. En una modalidad, puede usarse una bomba (ver Langer, *arriba*; Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201; Buchwald y otros, 1980, *Surgery* 88:507; Saudek y otros, 1989, *N. Engl. J. Med.* 321:574). En otra modalidad, pueden usarse materiales poliméricos (ver *Medical Applications of Controlled Release*, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen y Ball (eds.), Wiley, Nueva York (1984); Ranger y Peppas, J., 1983, *Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61; ver además Levy y otros, 1985, *Science* 228:190; During y otros, 1989, *Ann. Neurol.* 25:351; Howard y otros, 1989, *J. Neurosurg.* 71:105). En aun otra modalidad, puede colocarse un sistema de liberación controlada en la proximidad del objetivo terapéutico, por ejemplo la vejiga, mama, colon, cabeza y cuello, riñón, hígado, pulmón, ovario, páncreas, piel o tiroides, requiriéndose así sólo una fracción de la dosis sistémica (ver, por ejemplo Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, *arriba*, vol. 2,

págs. 115-138 (1984)). Otros sistemas de liberación controlada se discuten en la revisión por Langer (1990, Science 249:1527-1533).

5 En un ejemplo específico donde el compuesto es un ácido nucleico que codifica una proteína, el ácido nucleico puede administrarse *in vivo* para promover la expresión de su proteína codificada, construyéndolo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico adecuado y administrándolo de manera que se vuelva intracelular, por ejemplo, mediante el uso de un vector retroviral (ver la patente de los Estados Unidos núm. 4,980,286), o mediante la inyección directa o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, una pistola génica; Biolística, Dupont) o el recubrimiento con lípidos o receptores de superficie celular o agentes de transfección, administrándolo enlazado a un péptido de tipo caja homeótica que se conoce que entra en el núcleo (ver, por ejemplo, Joliot y otros, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868), etc. Alternativamente un ácido nucleico puede introducirse intracelularmente e incorporarse dentro del ADN de la célula huésped para la expresión, mediante la recombinación homóloga.

15 La presente descripción proporciona además composiciones farmacéuticas. Tales composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto, y un portador farmacéuticamente aceptable. En un ejemplo específico, el término "farmacéuticamente aceptable" significa, adecuado para la aprobación por una agencia regulatoria del gobierno Federal o estatal o listado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "portador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo con el cual se administra el agente terapéutico. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, como agua y aceites, incluyendo aquellos de petróleo, de origen animal, vegetal o sintético tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un portador preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Las soluciones salinas y las soluciones de dextrosa y glicerina acuosas pueden emplearse también como portadores líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos aceptables incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerina, talco, cloruro de sodio, leche desnatada seca, glicerina, propileno, glicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, puede contener también cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes amortiguadores de pH. Estas composiciones pueden tomar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, tabletas, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La composición puede formularse como un supositorio, con aglutinantes tradicionales y portadores tales como los triglicéridos. La formulación oral puede incluir portadores estándares tales como grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato magnésico, etc. Los ejemplos de los portadores farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin. Tales composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto, por ejemplo en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de portador para proporcionar la forma de administración adecuada al sujeto. La formulación debe adecuarse al modo de administración.

40 En una modalidad, por ejemplo donde uno o más anticuerpos se emplean, la composición se formula de conformidad con procedimientos de rutina como una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa a seres humanos. Típicamente, las composiciones para la administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición farmacéutica puede incluir además un agente solubilizante y un anestésico local tal como lidocaína para aliviar el dolor en el sitio de la inyección. Generalmente, los ingredientes se proporcionan separadamente, o mezclados conjuntamente, en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente sellado como un ampolleta o bolsita, indicando la cantidad de agente activo. Cuando la composición se administra por infusión, ésta puede dispensarse con una botella de infusión que contiene agua o solución salina de grado farmacéutico estéril. Cuando la composición se administra por inyección, una ampolleta de agua estéril para inyección o solución salina puede proporcionarse de manera que los ingredientes pueden mezclarse antes de la administración.

50 Los compuestos de la descripción pueden formularse como formas salinas o neutras. Las sales farmacéuticamente aceptables, donde es adecuado, incluyen las que se forman con grupos amino libres tales como los derivados de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las que se forman con grupos carboxilos libres tales como los derivados de hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, férrico, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, etc.

55 La cantidad del compuesto de la descripción que será efectiva en el tratamiento del cáncer, por ejemplo, las enfermedades de la invención, puede determinarse mediante técnicas clínicas estándares. Adicionalmente, los ensayos *in vitro* pueden emplearse, opcionalmente, para ayudar a identificar los intervalos óptimos de dosificación. La dosis precisa que se emplea en la formulación dependerá también de la vía de administración, y la seriedad de la enfermedad o trastorno, y debe decidirse de conformidad con el criterio del médico y de las circunstancias de cada individuo. Sin embargo, los intervalos de dosificación adecuados para la administración intravenosa son generalmente de aproximadamente 20-500 microgramos de compuesto activo por kilogramo de peso corporal. Los intervalos de dosificación adecuados para la administración intranasal son generalmente de aproximadamente 0,01 pg/kg de peso corporal a aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal. Dosis efectivas pueden extrapolarse a partir de las curvas de dosis-respuesta derivadas de los sistemas de prueba del modelo animal o *in vitro*.

Los supositorios generalmente contienen ingrediente activo en el intervalo de 0,5 % a 10 % en peso; las formulaciones orales contienen preferentemente de 10 % a 95 % de ingrediente activo.

5 La invención proporciona, además, un paquete o kit del producto farmacéutico que comprende uno o más contenedores llenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la descripción. Opcionalmente, puede haber un aviso asociado con tales contenedores en la forma prescrita por una agencia gubernamental reguladora de la fabricación, uso o venta de los productos farmacéuticos o biológicos, donde el aviso refleja (a) aprobación por la agencia de la fabricación, uso o venta para la administración humana (b) orientaciones para su uso, o ambas.

10 Por lo tanto, en un ejemplo, el kit comprende anticuerpos empleados en la invención, por ejemplo, los anticuerpos pueden liofilizarse para la reconstitución antes de su administración o uso. Cuando el kit es para su uso en terapia/tratamiento tal como cáncer el anticuerpo o anticuerpos pueden reconstituirse con una solución acuosa isotónica, que puede proporcionarse opcionalmente con el kit. En un ejemplo, el kit puede comprender un polipéptido tal como un polipéptido inmunogénico empleado en la descripción, que puede por ejemplo, liofilizarse. Este último kit puede comprender además un adyuvante para reconstituir el polipéptido inmunogénico.

15 La descripción se extiende también a una composición como la descrita en la presente descripción, por ejemplo, una composición farmacéutica y/o composición de vacuna para su uso en la inducción de una respuesta inmune en un sujeto.

Determinación de la abundancia de BST1 por tecnología de imagimática

20 Una ventaja de determinar la abundancia de BST1 mediante la tecnología de imagimática puede ser que un método de ese tipo sea no invasivo (con la salvedad de que pueda necesitar que se administren los reactivos) y no exista necesidad de extraer una muestra del sujeto.

25 Las tecnologías de imagimática adecuadas incluyen la tomografía por emisión de positrones (PET) y la tomografía computarizada de emisión de fotones únicos (SPECT). La visualización de BST1 usando tales técnicas requiere la incorporación o unión de un marcador adecuado, por ejemplo un radiotrazador tal como F<sup>18</sup>, C<sup>11</sup> e I<sup>123</sup> (ver, por ejemplo, NeuroRx - The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics (2005) 2(2), 348-360 e *idem* páginas 361-371 para detalles adicionales de las técnicas). Los radiotrazadores u otros marcadores pueden incorporarse a BST1 mediante administración al sujeto (por ejemplo, por inyección) de un ligando específico marcado adecuadamente. Alternativamente, pueden incorporarse a un reactivo de afinidad de unión (por ejemplo, anticuerpo) específico para BST1 que puede administrarse al sujeto (por ejemplo, mediante inyección). Para la discusión del uso de los Anticuerpos para la imagimática, ver, por ejemplo, Orlova A, Magnusson M, Eriksson TL, Nilsson M, Larsson B, Hoiden-Guthenberg I, Widstrom C, Carlsson J, Tolmachev V, Stahl S, Nilsson FY, Tumor imaging using a picomolar affinity HER2 binding Affibody molecule, Cancer Res. 2006 Abril 15;66(8):4339-48.

30 Diagnóstico y tratamiento del cáncer incluyendo las enfermedades de la invención usando inmunohistoquímica

35 La inmunohistoquímica es una excelente técnica de detección y por lo tanto puede ser muy útil en el diagnóstico y tratamiento del cáncer, que incluyen las enfermedades de la invención. La inmunohistoquímica puede usarse para detectar, diagnosticar o controlar cánceres tales como los mencionados anteriormente, a través de la localización de antígenos BST1 en secciones de tejido mediante el uso de anticuerpos marcados (u otros reactivos de afinidad), derivados y análogos de estos, los cuales se unen específicamente a BST1, como reactivos específicos a través de interacciones antígeno-anticuerpo que se visualizan mediante un marcador tal como tinte fluorescente, enzima, elemento radiactivo u oro coloidal.

40 El avance de la tecnología del anticuerpo monoclonal ha sido de gran importancia para asegurar el lugar de la inmunohistoquímica en el diagnóstico microscópico preciso moderno de las neoplasias humanas. La identificación de las células diseminadas transformadas neoplasticamente mediante la inmunohistoquímica permite una imagen más clara de la invasión y metástasis del cáncer, así como la evolución del inmunofenotipo asociado a células tumorales hacia la malignidad aumentada. Los futuros enfoques terapéuticos antineoplásicos pueden incluir una variedad de inmunoterapias individualizadas, específicas para el patrón inmunofenotípico particular asociado con la enfermedad neoplásica de cada paciente individual. Para mayor discusión, ver por ejemplo Bodey B, The significance of immunohistochemistry in the diagnosis and therapy of neoplasms, Expert Opin Biol Ther. 2002 Abril; 2(4):371-93.

45 Las características preferidas de cada aspecto de la invención son como para cada uno de los otros aspectos *mutatis mutandis*. La invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

50 Ejemplo 1: Identificación de bst1 expresada en tejido de leucemia linfocítica crónica, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer de pulmón y cáncer de páncreas usando cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC/MS){ut}

65

Usando el siguiente Protocolo de Referencia, las proteínas de membrana extraídas de muestras de tejido de cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer de pulmón y cáncer de páncreas se digirieron y los péptidos resultantes se secuenciaron mediante espectrometría de masas en tándem.

## 5 1.1 Materiales y Métodos

### 1.1.1 Fraccionamiento de la membrana plasmática

10 Todos los procedimientos se llevaron a cabo a 4°C. Las células recuperadas de tejido de leucemia linfocítica crónica, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer de pulmón y cáncer de páncreas se homogeneizaron y se sometieron a centrifugación a 1000G. Se recogió el sobrenadante y se centrifugó a 49500G en una ultracentrífuga. El sedimento resultante se recuperó y se puso en un cojín de sacarosa de 1,4 M. La membrana de microsoma/plasmática se recuperó en el borde de fase y recambió en tampón PBS y después se sometió de nuevo a la centrifugación a 49500G. El sedimento (fracción de membrana plasmática) se analizó después mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC/MS) (ver la sección 2.1.2 más abajo).

### 1.1.2 Metodología de la cromatografía líquida-espectrometría de masa(LC/MS)

20 Las fracciones de la membrana plasmática suspendidas en PBS de muestras de tejidos de leucemia linfocítica crónica, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer de pulmón y cáncer de páncreas se centrifugaron a 12-14°C durante 45 min a una velocidad máxima de 21460G en una centrífuga de mesa. Se eliminó el sobrenadante y se añadió de nuevo al sedimento la cantidad requerida de sobrenadante para dar una concentración de 4 mg/ml. Se añadió después la cantidad equivalente de SDS al 1% p/v. Las muestras se agitaron después con vórtice a temperatura ambiente y se centrifugaron después a 21460G durante 30 minutos a 12-15°C. La muestra se recuperó dejando el sedimento atrás. A un volumen de cada solución de proteína equivalente a 50µg, se añadió 150µl de solución 0,5 M de bicarbonato de trietilamonio (TEAB). A cada muestra, se añadió 3 µl de 50 mM de tris-(2-carboxietil)fosfina y la mezcla se incubó a 60°C durante 1 hora. Después se añadió 1 µl de reactivo bloqueador de cisteína, 200 mM de metanotiosulfonato de metilo (MMTS) en isopropanol. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 10 min, se añadió 15µl de 1µg/µl de tripsina a cada muestra, seguido de incubación a 37°C durante toda la noche. Las muestras digeridas se secaron bajo vacío y se añadió 40µl de ácido fórmico acuoso al 0,1% seguido de suficiente ácido trifluoroacético (TFA) para reducir el pH de la solución a <3 antes del fraccionamiento por intercambio iónico.

### 1.1.3 Fraccionamiento y análisis de péptidos marcados

35 La muestra se fraccionó mediante cromatografía de intercambio catiónico fuerte usando un cromatógrafo Agilent 1200 (Agilent, Santa Clara, California, Estados Unidos). Las muestras se eluyeron de una columna Agilent Zorbax Bio-SCXII (3,5µm; 50 x 0,8 mm) usando un gradiente de 20µl/min de 0-100 mM de acetato de sodio durante 20 min, después a 1M durante 10 min y después se mantuvo a 1 M durante 25 min. Se recogieron fracciones de 1 min durante 40 min. A cada fracción se añadió 2µl de solución de TFA al 1%. Las fracciones se almacenaron después a -80°C. Cada fracción se analizó mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas usando un cromatógrafo Ekigent Tempo equipado con una columna PepMap 100 C 18, 3µm, 100A, 150 mm x 75 mm (LC Empaques/Dionex) y un Instrumento Q-Star Elite cuadrúpolo-tiempo de vuelo (Applied Biosystems/MDS Sciex). Se eluyeron los péptidos con un gradiente creciente de 300 nI/min de 5 % a 40 % de acetonitrilo durante 60 min. Los datos se adquirieron en modo automático MS/MS de manera que se seleccionaron hasta 3 iones precursores por encima del umbral de intensidad y se acumularon espectros de iones del producto para facilitar la secuenciación de los péptidos. Se realizaron tres pases, cada uno en modo automático MS/MS, con la segunda y tercera corridas, excluyendo también las masas ya detectadas en una corrida anterior.

### 1.1.4 Análisis de la secuencia de aminoácidos del péptido marcado

50 Los datos sin procesar generados de QSTAR se procesaron a través del programa Piloto de Proteínas (Applied Biosystems/MDS Analytical Technologies) que utiliza el algoritmo Paragon™ para inferir secuencias de aminoácidos de las listas de picos mediante la búsqueda en una base de datos de secuencias que consiste en IPI Versión 3.58 ([www.ebi.ac.uk/IPI/IPIhuman.html](http://www.ebi.ac.uk/IPI/IPIhuman.html)) y secuencias de tripsina contaminantes. Los criterios para la identificación de péptidos incluyeron digestión con tripsina y varias modificaciones biológicas y químicas (metionina oxidada, modificación de cisteína por MMTS o yodoacetamida y fosforilación de serina, treonina y tirosina). Los péptidos con una puntuación de confianza del 60 % o mayor se procesaron en grupos de proteínas con el criterio de que si sólo se identificó un péptido de un grupo de proteínas, el puntaje debe ser 80 % o mayor.

### 60 1.1.5 Discriminación de las proteínas asociadas a la leucemia linfocítica crónica, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer de pulmón, cáncer pancreático

65 El proceso para identificar BST1 usa las secuencias peptídicas obtenidas experimentalmente mediante espectrometría de masas descritas anteriormente de proteínas humanas de origen natural para identificar y organizar los exones codificantes en la secuencia del genoma humano publicada.

Estas secuencias determinadas experimentalmente se compararon con la base de datos OGAP® que se compiló mediante el procesamiento e integración de las masas peptídicas, firmas de péptidos, las EST y datos de secuencias genómicas de dominio público como se describe en la Solicitud de Patente Internacional WO2009/087462. El proceso se usó para generar aproximadamente 1 millón de secuencias peptídicas para identificar los genes codificantes de proteínas y sus exones resultaron en la identificación de secuencias de proteínas para 18083 genes a través de 67 tejidos diferentes y 57 enfermedades que incluyen 506 genes en cáncer de Vejiga, 4.713 genes en cáncer de Mama, 766 genes en el linfoma de Burkitt, 1.371 genes en cáncer de Cuello uterino, 949 genes en cáncer Colorrectal, 1.782 genes en carcinoma Hepatocelular, 2.424 genes en CLL, 978 genes en cáncer de pulmón, 1.764 genes en Melanoma, 1.033 genes en Cáncer de Ovario, 2.961 genes en Cáncer de Páncreas y 3.307 genes en cáncer de Próstata.

1.2 Resultados

Estos experimentos identificaron BST1, como se describió adicionalmente en la presente descripción. El BST1 de longitud completa se detectó en la membrana plasmática de muestras de leucemia linfocítica crónica, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer de pulmón, cáncer de ovario y cáncer de páncreas y no se detectó en el citosol (Figuras 1a y 1g). La comparación de las secuencias determinadas experimentalmente con secuencias en la base de datos OGAP®, indicó que BST1 mostró un alto grado de especificidad para el cáncer de mama (Tabla 1a), cáncer colorrectal (Tabla 1b), cáncer de riñón (Tabla 1c), cáncer de pulmón (Tabla 1d), cáncer de páncreas (Tabla 1e), cáncer de cabeza y cuello (Tabla 1f), cáncer de ovario (Tabla 1g) y leucemia linfocítica crónica (Tabla 1h) indicativo de la naturaleza pronóstica y diagnóstica de esta proteína.

Tabla 1a - Cáncer de mama LC/MS

Núm. de lote de muestra.	Experimento núm.	Tripticos identificados [Sec. con núm. de ident.:]
Muestra 1	Experimento 1	Sec. con núm. de ident.: 5 - FMPLSDVLYGR
Muestra 2	Experimento 1	Sec. con núm. de ident.: 5 - FMPLSDVLYGR
		Sec. con núm. de ident.: 8 - LLQCVDHSTHPDCALK
Muestra 3	Experimento 1	Sec. con núm. de ident.: 4 - DMGFQYSCINDYRPVK
		Sec. con núm. de ident.: 5 - FMPLSDVLYGR
		Sec. con núm. de ident.: 7 - GFFADYEIPNLQK
		Sec. con núm. de ident.: 9 - SLFWENSHLLVNSFADNTR
		Sec. con núm. de ident.: 10 - VADFLSWCR
Muestra 4	Experimento 1	Sec. con núm. de ident.: 5 - FMPLSDVLYGR
		Sec. con núm. de ident.: 7 - GFFADYEIPNLQK

Tabla 1b - Cáncer colorrectal LC/MS

Núm. de lote de muestra.	Experimento núm.	Tripticos identificados [Sec. con núm. de ident.:]
Muestra 1	Experimento 1	Sec. con núm. de ident.: 7 - GFFADYEIPNLQK
		Sec. con núm. de ident.: 8 - LLQCVDHSTHPDCALK
Muestra 2	Experimento 1	Sec. con núm. de ident.: 5 - FMPLSDVLYGR
		Sec. con núm. de ident.: 7 - GFFADYEIPNLQK
		Sec. con núm. de ident.: 10 - VADFLSWCR

ES 2 615 256 T3

Muestra 3	Experimento 1	Sec. con núm. de ident.: 5 - FMPLSDVLYGR
		Sec. con núm. de ident.: 7 - GFFADYEIPNLQK
		Sec. con núm. de ident.: 9 - SLFWENSHLLVNSFADNTR
		Sec. con núm. de ident.: 10 - VADFLSWCR
Muestra 3	Experimento 2	Sec. con núm. de ident.: 7 - GFFADYEIPNLQK
		Sec. con núm. de ident.: 8 - LLQCVDHSTHPDCALK
		Sec. con núm. de ident.: 9 - SLFWENSHLLVNSFADNTR
Muestra 3	Experimento 3	Sec. con núm. de ident.: 2 - ALLSPEQR
		Sec. con núm. de ident.: 5 - FMPLSDVLYGR
		Sec. con núm. de ident.: 7 - GFFADYEIPNLQK
		Sec. con núm. de ident.: 8 - LLQCVDHSTHPDCALK
		Sec. con núm. de ident.: 10 - VADFLSWCR

Tabla 1c - Cáncer de riñón LC/MS

Núm. de lote de muestra.	Experimento núm.	Trípticos identificados [Sec. con núm. de ident.:]
Muestra 1	Experimento 1	Sec. con núm. de ident.: 7 - GFFADYEIPNLQK
		Sec. con núm. de ident.: 8 - LLQCVDHSTHPDCALK
		Sec. con núm. de ident.: 10 - VADFLSWCR
Muestra 1	Experimento 2	Sec. con núm. de ident.: 7 - GFFADYEIPNLQK
		Sec. con núm. de ident.: 10 - VADFLSWCR

Tabla 1d - Cáncer de pulmón LC/MS

Núm. de lote de muestra.	Experimento núm.	Trípticos identificados [Sec. con núm. de ident.:]
Muestra 1	Experimento 1	Sec. con núm. de ident.: 5 - FMPLSDVLYGR
Muestra 1	Experimento 2	Sec. con núm. de ident.: 5 - FMPLSDVLYGR
		Sec. con núm. de ident.: 7 - GFFADYEIPNLQK
		Sec. con núm. de ident.: 10 - VADFLSWCR
		Sec. con núm. de ident.: 11 - SLFWENSHLLVN
Muestra 2	Experimento 1	Sec. con núm. de ident.: 10 - VADFLSWCR
Muestra 2	Experimento 2	Sec. con núm. de ident.: 5 - FMPLSDVLYGR
		Sec. con núm. de ident.: 10 - VADFLSWCR
Muestra 3	Experimento 1	Sec. con núm. de ident.: 5 - FMPLSDVLYGR
		Sec. con núm. de ident.: 7 - GFFADYEIPNLQK
		Sec. con núm. de ident.: 8 - LLQCVDHSTHPDCALK
		Sec. con núm. de ident.: 10 - VADFLSWCR
Muestra 4	Experimento 1	Sec. con núm. de ident.: 7 - GFFADYEIPNLQK
		Sec. con núm. de ident.: 8 - LLQCVDHSTHPDCALK

ES 2 615 256 T3

Muestra 5	Experimento 1	Sec. con núm. de ident.: 7 - GFFADYEIPNLQK
		Sec. con núm. de ident.: 10 - VADFLSWCR
Muestra 6	Experimento 1	Sec. con núm. de ident.: 10 - VADFLSWCR
Muestra 7	Experimento 1	Sec. con núm. de ident.: 7 - GFFADYEIPNLQK
		Sec. con núm. de ident.: 8 - LLQCVDHSTHPDCALK
		Sec. con núm. de ident.: 10 - VADFLSWCR
		Sec. con núm. de ident.: 3 - DIFLGR
		Sec. con núm. de ident.: 4 - DMGFQYSCINDYRPVK
		Sec. con núm. de ident.: 5 - FMPLSDVLYGR
Muestra 8	Experimento 1	Sec. con núm. de ident.: 7 - GFFADYEIPNLQK
		Sec. con núm. de ident.: 8 - LLQCVDHSTHPDCALK
		Sec. con núm. de ident.: 10 - VADFLSWCR
		Sec. con núm. de ident.: 12 - LKDMGFQYSCINDYRPVK
		Sec. con núm. de ident.: 2 - ALLSPEQR
		Sec. con núm. de ident.: 5 - FMPLSDVLYGR
Muestra 9	Experimento 1	Sec. con núm. de ident.: 7 - GFFADYEIPNLQK
		Sec. con núm. de ident.: 8 - LLQCVDHSTHPDCALK
		Sec. con núm. de ident.: 10 - VADFLSWCR
Muestra 10	Experimento 1	Sec. con núm. de ident.: 7 - GFFADYEIPNLQK

Tabla 1e - Cáncer Pancreático LC/MS

Núm. de lote de muestra.	Experimento núm.	Trípticos identificados [Sec. con núm. de ident.:]
		Sec. con núm. de ident.: 2 - ALLSPEQR
		Sec. con núm. de ident.: 3 - DIFLGR
Muestra 1	Experimento 1	Sec. con núm. de ident.: 5 - FMPLSDVLYGR
		Sec. con núm. de ident.: 7 - GFFADYEIPNLQK
		Sec. con núm. de ident.: 10 - VADFLSWCR
Muestra 2	Experimento 1	Sec. con núm. de ident.: 7 - GFFADYEIPNLQK

Tabla 1f - Cáncer de cabeza y cuello LC/MS

Núm. de lote de muestra.	Experimento núm.	Trípticos identificados [Sec. con núm. de ident.:]
Muestra 1	Experimento 1	Sec. con núm. de ident.: 2 - ALLSPEQR
		Sec. con núm. de ident.: 5 - FMPLSDVLYGR
		Sec. con núm. de ident.: 8 - LLQCVDHSTHPDCALK
		Sec. con núm. de ident.: 10 - VADFLSWCR
Muestra 2	Experimento 1	Sec. con núm. de ident.: 8 - LLQCVDHSTHPDCALK
		Sec. con núm. de ident.: 10 - VADFLSWCR

Tabla 1g - Cáncer de Ovario LC/MS

5	Núm. de lote de muestra.	Experimento núm.	Tripticos identificados [Sec. con núm. de ident.:]
	Muestra 1	Experimento 1	Sec. con núm. de ident.: 2 - ALLSPEQR
			Sec. con núm. de ident.: 8 - LLQCVDHSTHPDCALK
10	Muestra 2	Experimento 1	Sec. con núm. de ident.: 2 - ALLSPEQR
			Sec. con núm. de ident.: 5 - FMPLSDVLYGR
15			Sec. con núm. de ident.: 6 - GEGTSAHLR
			Sec. con núm. de ident.: 7 - GFFADYEIPNLQK
			Sec. con núm. de ident.: 8 - LLQCVDHSTHPDCALK
20			Sec. con núm. de ident.: 10 - VADFLSWCR

Tabla 1h - Leucemia linfocítica crónica

25	Muestra núm.	Experimento núm.	Péptidos identificados
	Muestra 1	Experimento 1	Sec. con núm. de ident.: 2 - ALLSPEQR
			Sec. con núm. de ident.: 5 - FMPLSDVLYGR
30			Sec. con núm. de ident.: 8 - LLQCVDHSTHPDCALK

Ejemplo 2: Identificación de proteínas de membrana expresadas en muestras de tejidos de cáncer de pulmón mediante etiquetado isotópico para la cuantificación absoluta y relativa (iTRAQ)

Usando el siguiente Protocolo de Referencia, se digirieron proteínas de membrana extraídas de tejidos de cáncer colorrectal, cáncer de riñón o cáncer de pulmón y muestras de tejido adyacentes normales, marcadas con reactivos del Etiquetado isotópico para la cuantificación absoluta y relativa (iTRAQ, Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos) y los péptidos resultantes se secuenciaron por espectrometría de masas en tándem.

## 2.1 Materiales y métodos

### 2.1.1 Fraccionamiento de la membrana plasmática

Las células recuperadas de un tejido de cáncer de pulmón y adyacente normal de pulmón se lisaron y se sometieron a centrifugación a 1000G. Se tomó el sobrenadante, y posteriormente se centrifugó a 3000G. Una vez más, se tomó el sobrenadante, y después se centrifugó a 100 000G. El sedimento resultante se recuperó y se puso en un gradiente de sacarosa al 15-60 %. Se utilizó una transferencia en membrana de tipo Western para identificar marcadores subcelulares, y se mezclaron las fracciones de la Membrana Plasmática. La solución mezclada se analizó directamente después por iTRAQ (ver la sección 2.1.2 más abajo).

### 2.1.2 Metodología iTRAQ

Se solubilizaron los sedimentos de proteína de membrana de tejidos de cáncer de pulmón y tejidos adyacentes normales de pulmón en tampón de muestra (2-4 µg/µl en SDS al 0,5 %) mediante la adición de tampón y calentando después a 95°C durante 3 min. A un volumen de cada solución de proteína equivalente a 50µg, se añadió 150µl de solución 0,5 M de bicarbonato de trietilamonio (TEAB). A cada muestra, se añadió 3 µl de 50 mM de tris-(2-carboxietil)fosfina y la mezcla se incubó a 60°C durante 1 hora. Se añadió después 1 µl de reactivo bloqueador de cisteína, 200 mM de metanotiosulfonato de metilo (MMTS) en isopropanol. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 10 min, se añadió 15µl de 1µg/µl de tripsina a cada muestra, seguido de incubación a 37°C durante toda la noche. Las muestras digeridas se secaron bajo vacío y se reconstituyeron con 30 µl o 0,5 M de solución TEAB. Se añadió 70µl de etanol a cada uno de los cuatro reactivos iTRAQ (114/115/116/117) y se añadió un reactivo a cada una de las cuatro muestras analizadas (cada muestra que comprende dos muestras de tejido cancerígeno y dos muestras de tejido adyacente normal correspondiente) y se dejó a temperatura ambiente durante 1 h. Se registró el reactivo específico añadido a cada muestra. Se combinaron las cuatro muestras marcadas y se agitaron con vórtice. Las muestras combinadas se redujeron hasta sequedad bajo vacío y se desalinizaron cargando sobre una columna de espín

C18, lavando con disolvente acuoso y después eluyendo con acetonitrilo al 70 %. La fracción de la muestra se redujo de nuevo hasta sequedad y se volvió a disolver después en 40 µl de disolvente A (97,9 de agua, acetonitrilo al 2%, ácido fórmico al 0,1%) antes del fraccionamiento por intercambio iónico.

### 5 2.1.3 Fraccionamiento y análisis de los péptidos marcados

La muestra se fraccionó mediante cromatografía de intercambio catiónico fuerte usando un cromatógrafo Agilent 1200 (Agilent, Santa Clara, California, Estados Unidos). Las muestras se eluyeron de una columna Agilent Zorbax Bio-SCXII (3,5µm, 50 x 0,8 mm) usando un gradiente de 20µl/min de 0-100 mM de acetato de sodio durante 20 min y después a 1 M durante 10 min. Se recogieron fracciones de 1 min durante la corrida de 30 min.

Cada fracción se analizó mediante cromatografía líquida/espectrometría de masas usando un cromatógrafo Agilent 1200 equipado con un instrumento Zorbax 300SB-C18 (150mm x 75µm) y un Agilent 6510 cuádrupolo - tiempo de vuelo (Agilent, Santa Clara, California, Estados Unidos). Los péptidos se eluyeron con un gradiente creciente de 300 nl/min de 15 % a 45 % de acetonitrilo en 60 min. Los datos se adquirieron en modo automático MS/MS de manera que se seleccionaron hasta 3 iones precursores por encima del umbral de intensidad y se acumularon espectros de iones del producto para facilitar la secuenciación de los péptidos marcados. El crudo se procesó para crear listas de picos usando el programa Spectrum Mill (Agilent, Santa Clara, California, Estados Unidos).

### 20 2.1.4 Análisis de la secuencia de aminoácidos de los péptidos marcados

Para la secuenciación parcial de aminoácidos y la identificación de ADP-ribosil ciclasa 2 (BST1; CD157), se investigaron espectros de masa en tándem no interpretados de péptidos trípticos usando el programa de búsqueda SEQUEST (Eng y otros, 1994, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 5:976-989). Los criterios para la identificación de la base de datos incluyeron: la especificidad de la escisión de la tripsina; la detección de una serie de iones a, b, y en péptidos devueltos de la base de datos, y un aumento de la masa para todos los residuos de cisteína para tener en cuenta la modificación con metilmetanotiosulfonato y la adición de etiquetas iTRAQ a aminas libres (N-terminal y lisina). Los datos se buscaron a través de IPI Humano v3.23 ([www.ebi.ac.uk/IPI/IPIhuman.html](http://www.ebi.ac.uk/IPI/IPIhuman.html)).

### 30 2.1.5 Discriminación de las proteínas asociadas a los tejidos del cáncer de pulmón

El proceso para identificar BST1 usó las secuencias peptídicas obtenidas experimentalmente mediante espectrometría de masas, como se describió anteriormente, de proteínas humanas naturales para identificar y organizar los exones codificantes en la secuencia del genoma humano publicada. Estas secuencias determinadas experimentalmente se compararon con la base de datos OGAP® que se compiló mediante el procesamiento e integración de las masas peptídicas, firmas de péptidos, las EST y datos de secuencias genómicas de dominio público como se describe en la Solicitud de Patente Internacional WO2009/087462.

## 40 2.2 Resultados

El experimento se identificó BST1, como se describe adicionalmente en la presente descripción (Tabla 2). BST1 se detectó en la membrana plasmática de muestras de cáncer de pulmón de células no pequeñas (Figura 2]. El análisis de iTRAQ mostró que el nivel de BST1 en las muestras de cáncer fueron mayores que en las muestras de tejido adyacentes normales coincidentes.

Tabla 2 - iTRAQ de Cáncer de pulmón

Muestra núm.	Experimento núm.	Péptidos identificados
Muestra 1	Experimento 1	Sec. con núm. de ident.: 6 - GEGTSAHLR

### Ejemplo 3: Inmunohistoquímica usando anticuerpo contra BST1

55 Usando el siguiente Protocolo de Referencia, se realizó inmunohistoquímica en tumores FFPE y tejidos normales usando un anticuerpo policlonal de carnero contra BST1 (R & D Systems Europe, Abingdon, Reino Unido).

## 3.1 Materiales y Métodos

### 60 3.1.1 Desparafinización y Rehidratación

Los portaobjetos se calentaron durante 2 h a 60°C en los Falcon de 50 ml en un baño de agua sin tampón. Cada Falcon tuvo un portaobjetos o dos portaobjetos consecutivos con una punta larga cargando gel entre ellas para evitar que las diapositivas se pegaran entre sí. Se desparafinizaron los portaobjetos en EZ-DeWax (BioGenex, California, EE.UU.) durante 5 minutos en un gradilla negra de portaobjetos, después se enjuagaron bien con la misma solución DeWax

usando pipeta de 1 ml, después se lavaron con agua. Los portaobjetos se colocaron en un vaso coplin lleno de agua hasta que la olla a presión estuvo lista; el agua se cambió un par de veces.

### 3.1.2 Recuperación del antígeno

5 Se intercambió agua por solución de recuperación de antígeno = tampón 1 x citrato, pH 6 (DAKO). El antígeno se recuperó mediante el método de la olla a presión. Se colocaron los portaobjetos en el vaso coplin plástico en una solución de recuperación de antígeno en una olla a presión que después se calentó hasta la posición 6 (el ajuste más alto). 15-20 minutos en la incubación, la temperatura se redujo a la posición 3 y se dejó en esa (cuando la temperatura dentro de la olla a presión fue 117 °C) durante otros 20-25 min. Después, la hornilla se desconectó y la olla se colocó en la hornilla fría y la presión se liberó moviendo cuidadosamente el mango en la posición entre "abierto" y "cerrado". Todo el sistema se dejó liberar la presión y enfriar durante otros 20 min. Se abrió la tapa y se tomaron muestras para reposar en el banco. Los portaobjetos se lavaron 1x5 min con PBS-3T (0,5 L de PBS + 3 gotas de Tween-20) y los portaobjetos se colocaron en PBS.

### 3.1.3 Tinción

20 Después de la recuperación del antígeno, los portaobjetos se montaron en el sistema de cubreobjeto Shandon. El atrapamiento de las burbujas de aire entre el portaobjeto y el cubreobjeto de plástico se evitó colocando el cubreobjeto en el vaso coplin lleno con PBS y deslizando suavemente el portaobjetos con las secciones de tejido en el cubreobjeto. El portaobjeto se sacó del vaso coplin mientras que se mantenía unida fuertemente junto con el cubreobjeto. El portaobjeto ensamblado se colocó en la gradilla, dejando el PBS atrapado en el embudo para correr todo entre el portaobjeto y el cubreobjeto. Los portaobjetos se lavaron con 2x2 ml (o 4x1 ml) de PBS-3T y 1x2 ml de PBS, esperando hasta que todo el PBS hubiera pasado a través del portaobjeto y prácticamente no quedara PBS en el embudo

25 El bloqueo de peróxido endógeno se realizó usando el reactivo bloqueador de peroxidasa (S2001, DAKO). Se usó 1-4 gotas de solución de peróxido por portaobjetos y se incubó durante 5 minutos. Los portaobjetos se lavaron con agua y después una vez con 2 ml de PBS-3T y una vez con 2 ml de PBS; fue importante esperar hasta que prácticamente no quedara líquido en el embudo antes de añadir una nueva porción de tampón de lavado.

30 El anticuerpo primario se diluyó con un reactivo diluyente de anticuerpo (DAKO). Se determinó que la dilución óptima es 1:100. Se aplicó 50-200 µl de anticuerpo primario diluido a cada sección y/o micromatriz de tejido; teniendo cuidado de cubrir todo el tejido. Se deslizó suavemente el portaobjeto para distribuir el anticuerpo uniformemente sobre la sección o se usó una punta de pipeta sobre la parte superior de la sección. El portaobjeto se incubó durante 45 min en una cámara húmeda a temperatura ambiente. Los portaobjetos se lavaron con 2x2 ml (o 4x1 ml) de PBS-3T y después 1x2 ml de PBS, esperando hasta que todo el PBS hubiera pasado a través del portaobjeto y prácticamente no quedara PBS en el embudo. Se aplicó el correspondiente anti-IgG de carnero en burro:HRP (OBT1500P, 1 mg/ml, Serotec) a 1:1000 y se incubó durante 35 min a temperatura ambiente. Los portaobjetos se lavaron como anteriormente. El sustrato DAB se preparó en tampón de dilución; 2 ml que contienen 2 gotas de sustrato fue suficiente para 10 portaobjetos. Se aplicó el reactivo DAB a los portaobjetos aplicando unas cuantas gotas a la vez. Todo el DAB se distribuyó entre los portaobjetos. Los portaobjetos se incubaron durante 10 min. Los portaobjetos se lavaron 1x2 ml (o 2x1 ml) con PBS-3T y 1x2 ml (o 2x1 ml) con PBS, esperando hasta que todo el PBS hubiera pasado a través del portaobjeto y prácticamente no quedara PBS en el embudo. Se aplicó hematoxilina (DAKO); 1 ml fue suficiente para 10 portaobjetos y los portaobjetos se incubaron durante 1 min a temperatura ambiente. Los embudos del sistema de cubreobjetos Shandon se llenaron con 2 ml de agua y se dejaron correr todo. Cuando los portaobjetos estaban libres del exceso de hematoxilina, se desmontó el sistema, se lavaron las secciones de tejido y/o matrices con agua de la botella de lavado y se colocaron en una gradilla negra de portaobjetos. Los tejidos se rehidrataron incubando en EZ-DeWax durante 5 min y después en etanol al 95 % durante 2-5 min. Los portaobjetos se dejaron secar en el banco y después se montaron en medios de montaje y cubrieron con cubreobjetos.

### 3.2 Resultados

55 El análisis inmunohistoquímico reveló tinción específica de células tumorales en secciones de tejido de cáncer de pulmón. En una matriz de tejido pulmonar que representan 59 pacientes con cáncer de pulmón, se observó una tinción elevada de BST1 en células cancerosas en 28 pacientes (47%). Así los anticuerpos dirigidos a BST1 pueden tener utilidad como terapéutico y diagnóstico en este cáncer y otros tipos de cáncer que muestran expresión de BST1.

#### Ejemplo 4: Perfilamiento de ARN de bst1

### 60 4.1 Materiales y métodos

Varios tejidos normales y cancerosos se tamizaron para la expresión de ARNm de BST1 usando la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa cuantitativa (RT-PCR).

### 65 4.2 Resultados

La Figura 3a muestra los resultados de RT-PCR para BST1 para una variedad de tejidos normales y cancerosos. El eje vertical muestra la copia # /5 ng de ADNc de BST1. El perfil de ARNm reveló un nivel de expresión sorprendentemente alto del objetivo en NPB-monocitos y células CD33+, en contraste con el perfil de expresión muy bajo en la mayoría de los tejidos normales. La expresión de ARNm es indicativa de la expresión de la proteína BST1. La Figura 3b muestra los resultados del análisis adicional de la expresión de ARNm que muestra de nuevo niveles elevados de expresión de BST1 en monocitos y células CD33+. Se observó que los niveles de NPB-monocitos y células CD33 + fueron 20-30 veces más altos que cualquier otro tipo de tejido/célula.

La Figura 3c muestra los resultados del perfil de RT-PCR comparativo que se realizó sobre un conjunto de tejidos normales que muestran expresión de BST1 junto con CD33, un receptor transmembrana expresado en células de linaje mieloide y el objetivo de gemtuzumab ozogamicina (Mylotarg) un tratamiento basado en anticuerpos monoclonales para la leucemia mieloide aguda. Se encontró que BST1 tiene un perfil de expresión normal altamente restringido en comparación con CD33.

Ejemplo 5: construcción de una genoteca de presentación en fagos.

Una proteína recombinante compuesta de los aminoácidos 29-292 de BST1 (sec. con núm. de ident.:13) se sintetizó eucarióticamente por medio de métodos recombinantes estándar y se usó como antígeno para la inmunización.

Inmunización y aislamiento de ARNm

Una genoteca de presentación en fagos para la identificación de las moléculas de unión a BST1 se construyó como sigue. Se inmunizaron intraperitonealmente ratones A/J (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine) con el antígeno BST1 recombinante (el dominio extracelular), usando 100 µg de proteína en adyuvante completo de Freund, el día 0 y con 100 µg de antígeno el día 28. Se obtuvieron sangrados de prueba de ratones a través de la punción del seno retro-orbital. Si, al probar los títulos, se los consideró altos mediante ELISA usando el antígeno BST1 biotinilado inmovilizado mediante placas de poliestireno recubiertas con neutravidina (Reacti-Bind™) NeutrAvidin™, Pierce, Rockford, Ill), se reforzaron los ratones con 100 µg de proteína el día 70, 71 y 72, con posterior sacrificio y esplenectomía el día 77. Si los títulos de anticuerpo no se consideraron satisfactorios, los ratones se reforzaron con 100 µg de antígeno el día 56 y un sangrado de prueba tomado el día 63. Si se obtuvieron títulos satisfactorios, los animales se estimularon con 100 µg de antígeno en los días 98, 99 y 100 y los bazos se cosecharon el día 105.

Se recogieron los bazos en una cabina de flujo laminar y se transfirieron a una placa petri, recortando y descartando grasa y tejido conectivo. Se maceraron rápidamente los bazos con el émbolo de una jeringa estéril de 5 cc en presencia de 1,0 ml de solución D (25,0 g de tiocianato de guanidina (Boehringer Mannheim, Indianápolis, Indiana), 29,3 ml de agua estéril, 1,76 ml de 0,75 M de citrato de sodio pH 7,0, 2,64 ml de sarkosil al 10 % (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pensilvania), 0,36 ml de 2-mercaptoetanol (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pensilvania). Esta suspensión de bazo se extrajo a través de una aguja de calibre 18 hasta que todas las células se lisaron y la solución viscosa se transfirió a un tubo de microcentrífuga. La placa Petri se lavó con 100 µl de solución D para recuperar cualquier bazo restante. Esta suspensión se empujó después a través de una aguja de calibre 22 unas 5-10 veces adicionales.

La muestra se dividió uniformemente entre dos tubos de microcentrífuga y se añadió lo siguiente, para, mezclar por inversión después de cada adición: 50 µl de 2 M de acetato de sodio pH 4,0, 0,5 ml de fenol saturado con agua (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pensilvania), 100 µl de cloroformo/alcohol isoamílico 49:1 (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pensilvania). La solución se agitó con vórtice durante 10 segundos y se incubó en hielo durante 15 min. Después de la centrifugación a 14 krpm durante 20 min a 2-8 °C, la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo. Se añadió un volumen igual de fenol saturado con agua:cloroformo:alcohol isoamílico (50:49:1) y el tubo se agitó con vórtice durante diez segundos. Después de 15 min de incubación en hielo, la muestra se centrifugó durante 20 min a 2-8°C y la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se precipitó con un volumen igual de isopropanol a -20°C durante un mínimo de 30 min. Después de la centrifugación a 14 krpm durante 20 min a 4°C, el sobrenadante se aspiró, los tubos se centrifugaron brevemente y se eliminaron todos los restos de líquido del sedimento de ARN.

Los sedimentos de ARN se disolvieron cada uno en 300 µl de solución D, se combinaron y se precipitaron con un volumen igual de isopropanol a -20°C durante un mínimo de 30 min. La muestra se centrifugó 14 krpm durante 20 min a 4°C, el sobrenadante se aspiró como antes, y la muestra se lavó con 100 µl de etanol al 70 % enfriado con hielo. La muestra se centrifugó de nuevo a 14 krpm durante 20 min a 4°C, se aspiró la solución de etanol al 70 %, y el sedimento de ARN se secó a vacío. El sedimento se resuspendió en 100 µl de agua tratada con pirocarbonato de dietilo estéril. La concentración se determinó mediante A260 usando una absorbancia de 1,0 para una concentración de 40 µg/ml. Los ARN se almacenaron a -80°C.

Preparación de ADN complementario (ADNc)

El ARN total purificado de bazos de ratón como se describió anteriormente se usó directamente como molde para la preparación de ADNc. Se diluyó ARN (50 µg) hasta 100 µL con agua estéril y se añadieron 10 µL de 130 ng/µL de oligo dT12 (sintetizado en el sintetizador de ADN Applied Biosystems Modelo 392). La muestra se calentó durante 10 min a 70°C, después se enfrió en hielo. Se añadió cuarenta µL de 5\* tampón de primera cadena (Gibco/BRL, Gaithersburg,

5 Md.), junto con 20  $\mu$ L de 0,1 M de ditioneitol (Gibco/BRL, Gaithersburg, Maryland), 10  $\mu$ L de 20 mM de desoxinucleósido trifosfatos (dNTP, Boehringer Mannheim, Indianápolis, Indiana), y 10  $\mu$ L de agua sobre hielo. La muestra se incubó después a 37°C durante 2 min. Diez  $\mu$ L de transcriptasa inversa (Superscript™ II, Gibco/BRL, Gaithersburg, Maryland) se añadió y se continuó la incubación a 37°C durante 1 h. Los productos de ADNc se usaron directamente para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

#### Amplificación de genes del anticuerpo por PCR

10 Para amplificar esencialmente todos los genes de cadena H y L usando PCR, se escogieron iniciadores que correspondían a esencialmente todas las secuencias publicadas. Debido a que las secuencias de nucleótidos de los amino terminales de H y L contienen diversidad considerable, se sintetizaron 33 oligonucleótidos para servir como iniciadores 5' para las cadenas H, y se sintetizaron 29 oligonucleótidos para servir como iniciadores 5' para las cadenas L kappa como se describe en el documento de patente de EE.UU. 6,555,310. Las secuencias de nucleótidos de la región constante para cada cadena requirieron solo un iniciador 3' para las cadenas H y un iniciador 3' para las cadenas L kappa.

15 Se realizó una reacción de 50  $\mu$ L para cada par de iniciadores con 50  $\mu$ mol de iniciador 5', 50  $\mu$ mol de iniciador 3', 0,25  $\mu$ L de Taq ADN Polimerasa (5 unidades/ $\mu$ L, Boehringer Mannheim, Indianápolis, Indiana), 3  $\mu$ L de ADNc (preparado como se ha descrito), 5  $\mu$ L de 2 mM de dNTP, 5  $\mu$ L de 10\* tampón de ADN-polimerasa Taq con MgCl<sub>2</sub> (Boehringer Mannheim, Indianápolis, Indiana) y H<sub>2</sub>O hasta 50  $\mu$ L. La amplificación se realizó usando un ciclador térmico GeneAmp (R) 9600 (Perkin Elmer, Foster City, California) con el siguiente programa de termociclo: 94°C durante 1 min; 30 ciclos de 94°C durante 20 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos, 72°C durante 6 min; 4°C.

20 Los productos de ADNbc del proceso de PCR se sometieron después a PCR asimétrica usando sólo un iniciador 3' para generar esencialmente sólo la cadena antisentido de los genes objetivo. Se realizó una reacción de 100  $\mu$ L para cada producto ADNbc con 200  $\mu$ mol de iniciador 3', 2  $\mu$ L de producto ADNbc, 0,5  $\mu$ L de Taq ADN polimerasa, 10  $\mu$ L de 2 mM de dNTP, 10  $\mu$ L de tampón 10\*Taq ADN-polimerasa con MgCl<sub>2</sub> (Boehringer Mannheim, Indianápolis, Indiana), y H<sub>2</sub>O hasta 100  $\mu$ L. Se usó el mismo programa de PCR que el descrito anteriormente para amplificar el ADN monocatenario (mc).

#### 30 Purificación de ADN monocatenario mediante cromatografía líquida de alta eficacia y ADN monocatenario quinasante

35 Los productos de PCR mc de la cadena H y los productos de PCR monocatenarios de la cadena L se precipitaron en etanol añadiendo 2,5 volúmenes de etanol y 0,2 volumen de 7,5 M de acetato de amonio e incubando a -20°C durante al menos 30 min. El ADN se sedimentó por centrifugación en una centrífuga Eppendorf a 14 krpm durante 10 min a 2-8 °C. El sobrenadante se aspiró cuidadosamente, y los tubos se centrifugaron brevemente una segunda vez. La última gota del sobrenadante se eliminó con una pipeta. Se secó el ADN a vacío durante 10 minutos a calor medio. Los productos de la cadena H se mezclaron en 210  $\mu$ L de agua y los productos de la cadena L se mezclaron por separado en 210  $\mu$ L de agua. El ADN monocatenario se purificó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) usando una columna de intercambio de aniones FAX Hewlett Packard 1090 HPLC y Gen-Pak™ (Millipore Corp., Milford, Massachusetts). El gradiente usado para purificar el ADN monocatenario se muestra en la Tabla 3, y la temperatura del horno fue de 60°C. La absorbancia se monitoreó a 260 nm. El ADN monocatenario eluido de la HPLC se recogió en fracciones de 0,5 min. Las fracciones que contienen ADN monocatenario se precipitaron con etanol, sedimentaron y secaron como se describió anteriormente. Los sedimentos de ADN secos se mezclaron en 200  $\mu$ L de agua estéril.

45

Tabla 3 - Gradiente de HPLC para la purificación de ADNmc

	Tiempo (min)	% de A	% de B	% de C	Flujo (ml/min)
5	0	70	30	0	0.75
	2	40	60	0	0.75
10	17	15	85	0	0.75
	18	0	100	0	0.75
	23	0	100	0	0.75
15	24	0	0	100	0.75
	28	0	0	100	0.75
	29	0	100	0	0.75
20	34	0	100	0	0.75
	35	70	30	0	0.75
25	Tampón A es 25 mM de Tris, 1 mM de EDTA, pH 8,0 Tampón B es 25 mM de Tris, 1 mM de EDTA, 1 M NaCl, pH 8,0 Tampón C es 40 mM de ácido fosfórico				

El ADN monocatenario estaba 5'-fosforilado en la preparación para la mutagénesis. Se añadió veinticuatro  $\mu\text{L}$  de tampón 10\*quinasa (United States Biochemical, Cleveland, Ohio), 10,4  $\mu\text{L}$  de 10 mM de adenosina-5'-trifosfato (Boehringer Mannheim, Indianápolis, Indiana) y 2  $\mu\text{L}$  de polinucleótido quinasa (30 unidades/ $\mu\text{L}$ , United States Biochemical, Cleveland, Ohio) a cada muestra, y los tubos se incubaron a 37°C durante 1 h. Las reacciones se detuvieron incubando los tubos a 70°C durante 10 min. El ADN se purificó con una extracción de fenol equilibrado con Tris (pH>8,0, United States Biochemical, Cleveland, Ohio):cloroformo:alcohol isoamílico (50:49:1) y una extracción con cloroformo:alcohol isoamílico (49:1). Después de las extracciones, el ADN se precipitó con etanol y sedimentó como se describió anteriormente. Los sedimentos de ADN se secaron, después se disolvieron en 50  $\mu\text{L}$  de agua estéril. La concentración se determinó midiendo la absorbancia de una alícuota del ADN a 260 nm usando 33  $\mu\text{g}/\text{ml}$  para una absorbancia de 1,0. Las muestras se almacenaron a -20°C.

#### Preparación de moldes de uracilo usados en la Generación de Bibliotecas de Fago con Anticuerpos de Bazo

Un ml de *E. coli* CJ236 (BioRAD, Hercules, California) de cultivo de toda la noche se añadió a 50 ml de 2\*YT en un matraz de agitación de 250 ml. Se creció el cultivo a 37°C hasta OD600 = 0,6, se inoculó con 10  $\mu\text{L}$  de una dilución 1/100 de concentrado del fago vector BS45 (descrito en el documento de patente de EE.UU 6,555,310) y el crecimiento continuó durante 6 hr. Aproximadamente 40 ml del cultivo se centrifugó a 12 krpm durante 15 min a 4°C. El sobrenadante (30 ml) se transfirió a un tubo de centrifugación nuevo y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min después de la adición de 15  $\mu\text{L}$  de 10 mg/ml de ARNasa A (Boehringer Mannheim, Indianápolis, Indiana). Los fagos se precipitaron mediante la adición de 7,5 ml de polietilenglicol 8000 al 20 % (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pensilvania)/3,5M de acetato de amonio (Sigma Chemical Co., St. Louis, Misuri) y la incubación sobre hielo durante 30 min. La muestra se centrifugó a 12 krpm durante 15 minutos a 2-8 °C. El sobrenadante se descartó cuidadosamente y el tubo se centrifugó brevemente para eliminar todos los restos de sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 400  $\mu\text{L}$  de tampón de alto contenido de sal (300 mM de NaCl, 100 mM de Tris, pH 8,0, 1 mM de EDTA) y se transfirió a un tubo de 1,5 ml.

El concentrado de fago se extrajo repetidamente con un volumen igual de fenol equilibrado:cloroformo:alcohol isoamílico (50:49:1) hasta que ningún resto de una interfase blanca fue visible y después se extrajo con un volumen igual de cloroformo:alcohol isoamílico (49:1). El ADN se precipitó con 2,5 volúmenes de etanol y 1/5 de volumen de 7,5 M de acetato de amonio y se incubó durante 30 min a -20°C. El ADN se centrifugó a 14 krpm durante 10 min a 4°C, el sedimento se lavó una vez con etanol frío al 70 % y se secó al vacío. El ADN molde de uracilo se disolvió en 30  $\mu\text{L}$  de agua estéril y la concentración se determinó mediante A260 usando una absorbancia de 1,0 para una concentración de 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . El molde se diluyó hasta 250 ng/ $\mu\text{L}$  con agua estéril, se dividió en alícuotas y se almacenó a -20°C.

Mutagénesis del molde de uracilo con ADNmc y Electroporación en *E. coli* para generar Bibliotecas de Anticuerpos en Fagos

Se generaron genotecas de presentación de anticuerpos en fagos introduciendo de manera simultánea genes de cadenas pesadas y ligeras monocatenarias en un molde de uracilo de vector de presentación en fagos. Se realizó una mutagénesis típica en una escala de 2  $\mu\text{g}$  mezclando lo siguiente en un tubo de reacción de PCR de 0.2 ml: 8  $\mu\text{L}$  de

molde de uracilo (250 ng/ $\mu$ l), 8  $\mu$ l de 10\* tampón de hibridación (200 mM de Tris, pH 7,0, 20 mM de MgCl<sub>2</sub>, 500 mM de NaCl), 3,33  $\mu$ l de inserto de cadena pesada monocatenaria quinasada (100 ng/ $\mu$ l), 3,1  $\mu$ l de inserto de cadena ligera monocatenaria quinasada (100 ng/ $\mu$ l) y agua estéril hasta 80  $\mu$ l. El ADN se hibridó en un ciclador térmico GeneAmp (R) 9600 usando el siguiente perfil térmico: 20 segundos a 94°C, 85°C durante 60 segundos, 85°C a 55°C en rampa durante 5 30 min, manteniendo a 55°C durante 15 min. El ADN se transfirió al hielo después de que el programa terminó. La extensión/ligación se llevó a cabo añadiendo 8  $\mu$ l de 10\* tampón de síntesis (5 mM cada dNTP, 10 mM de ATP, 100 mM de Tris pH 7,4, 50 mM de MgCl<sub>2</sub>, 20 mM de DTT), 8  $\mu$ l de T4 ADN ligasa (1 U/ $\mu$ l, Boehringer Mannheim, Indianápolis, Indiana), 8  $\mu$ l de T7 ADN polimerasa diluida (1 U/ $\mu$ l New England BioLabs, Beverly, Massachusetts) e incubando a 37°C durante 30 min. La reacción se detuvo con 300  $\mu$ l de tampón de parada de mutagénesis (10 mM de Tris, pH 8,0, 10 mM de EDTA). El ADN de la mutagénesis se extrajo una vez con fenol equilibrado (pH > 8):cloroformo:alcohol isoamílico (50:49:1), una vez con cloroformo:alcohol isoamílico (49:1) y el ADN se precipitó con etanol a -20°C durante al menos 30 min. El ADN se sedimentó y el sobrenadante se eliminó cuidadosamente como se describió anteriormente. La muestra se centrifugó brevemente y se eliminaron todos los restos de etanol con un pipeteador. El sedimento se secó al vacío. El ADN se resuspendió en 4  $\mu$ l de agua estéril.

Se transfirió un  $\mu$ l de ADN de mutagénesis (500 ng) a 40  $\mu$ l de *E. coli*/DH12S (Gibco/BRL, Gaithersburg, Maryland) electrocompetente usando electroporación. Las células transformadas se mezclaron con aproximadamente 1,0 ml de células XL-1 durante toda la noche que se diluyeron con caldo 2\*YT hasta un 60 % del volumen original. Esta mezcla se transfirió después a un tubo de cultivo estéril de 15 ml y se añadieron 9 ml de agar superior para recubrir en una placa de agar LB de 150 mm. Las placas se incubaron durante 4 horas a 37°C y después se transfirieron a 20°C durante toda la noche. Los anticuerpos en fagos de la primera ronda se prepararon eluyendo los fagos de estas placas en 10 ml de 2\*YT, centrifugando los restos y tomando el sobrenadante. Estas muestras son las genotecas de presentación de anticuerpos en fagos usadas para seleccionar los anticuerpos contra el BST1. Se midió la eficiencia de las electroporaciones mediante la siembra de 10  $\mu$ l de una dilución de 10<sup>-4</sup> de células suspendidas en placas de agar LB, seguido de incubación durante toda la noche de las placas a 37°C. La eficiencia se calculó multiplicando el número de placas en la placa de la dilución 10<sup>-4</sup> por 10<sup>6</sup>. Las eficiencias de electroporación de la genoteca son típicamente mayores que 1\*10<sup>7</sup> fagos bajo estas condiciones.

#### Transformación de *E. coli* mediante Electroporación

Las células electrocompetentes de *E. coli* se descongelaron en hielo. El ADN se mezcló con 40  $\mu$ l de estas células pipeteando suavemente las células arriba y abajo 2-3 veces, teniendo cuidado de no introducir una burbuja de aire. Las células se transfirieron a una cubeta Gene Pulser (distancia de 0,2 cm, BioRAD, Hercules, California) que se había enfriado sobre hielo, teniendo cuidado de no introducir una burbuja de aire en la transferencia. La cubeta se colocó en el E. coli Pulser (BioRAD, Hercules, California) y se electroporó con el voltaje establecido a 1,88 kV de conformidad con la recomendación del fabricante. La muestra transformada se resuspendió inmediatamente en 1 ml de caldo 2\*YT o 1 ml de una mezcla de 400  $\mu$ l de 2\*YT/600  $\mu$ l de células XL-1 durante toda la noche y se procesó como los procedimientos dictados.

#### Siembra en placas del Fago M13 o células transformadas con Reacción de Mutagénesis del vector de presentación de anticuerpos en Fagos

Se añadieron muestras de fago a 200  $\mu$ l de un cultivo durante toda la noche de *E. coli* XL1-Blue cuando se sembraron las placas de agar LB de 100 mm o a 600  $\mu$ l de células durante toda la noche cuando se sembraron las placas de 150 mm en tubos de cultivo estériles de 15 ml. Después de añadir agar superior LB (3 ml para placas de 100 mm o 9 ml para placas de 150 mm, agar superior almacenado a 55°C (ver Apéndice A1, Sambrook y otros, arriba), la mezcla se distribuyó uniformemente sobre una placa de agar LB que se había precalentado (37°C-55°C) para eliminar cualquier exceso de humedad sobre la superficie de agar. Las placas se enfriaron a temperatura ambiente hasta que el agar superior se solidificó. Se invirtieron las placas y se incubaron a 37°C como se indicó.

#### Preparación del Receptor BST1 de Transmembrana de Tirosina-Proteína Quinasa Biotinilado y Anticuerpos Biotinilados

El antígeno recombinante BST1 recombinante (dominio extracelular de longitud completa) se dializó extensamente en BBS (20 mM de borato, 150 mM de NaCl, NaN<sub>3</sub> al 0,1%, pH 8,0). Después de la diálisis, se hizo reaccionar 1 mg de BST1 (1 mg/ml en BBS) con un exceso molar de 15 veces de éster de biotina-XX-NHS (Molecular Probes, Eugene, Oregon, solución concentrada a 40 mM en DMSO). La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 90 min y después se inactivó con taurina (Sigma Chemical Co., St. Louis, Misuri) a una concentración final de 20 mM. Después se dializó la mezcla de reacción de biotinilación contra BBS a 2-8°C. Después de la diálisis, la BST1 biotinilada se diluyó en tampón de filtración (40 mM de Tris, 150 mM de NaCl, 20 mg/ml de BSA, Tween 20 al 0,1%, pH 7,5), se dividió en alícuotas y se almacenó a -80°C hasta que se necesitaron.

Se hicieron reaccionar los anticuerpos con 3- (N-maleimidilpropionil) biocitina (Molecular Probes, Eugene, Oregon) usando una cisteína libre situada en el extremo carboxi de la cadena pesada. Se redujeron los anticuerpos añadiendo DTT a una concentración final de 1 mM durante 30 min a temperatura ambiente. El anticuerpo reducido se hizo pasar a través de una columna de desalinización Sephadex G50 equilibrada en 50 mM de fosfato de potasio, 10 mM de ácido bórico, 150 mM de NaCl, pH 7,0. Se añadió 3-(N-maleimidilpropionil)-biocitina a una concentración final de 1 mM y la

reacción se dejó proceder a temperatura ambiente durante 60 min. Las muestras se dializaron después extensamente contra BBS y se almacenaron a 2-8°C.

#### Preparación de látex magnético con avidina

5 El látex magnético (Estapor, 10 % de sólidos, Bangs Laboratories, Fishers, Indiana) se resuspendió completamente y se dividió en alícuotas de 2 ml en un tubo cónico de 15 ml. Se suspendió el látex magnético en 12 ml de agua destilada y se separó de la solución durante 10 min usando un imán (PerSeptive Biosystems, Framingham, Massachusetts). Al mantener la separación del látex magnético con el imán, el líquido se eliminó cuidadosamente usando una pipeta estéril de 10 ml. Este proceso de lavado se repitió tres veces más. Después del lavado final, el látex se resuspendió en 2 ml de agua destilada. En un tubo cónico de 50 ml separado, se disolvió 10 mg de avidina-HS (NeutrAvidina, Pierce, Rockford, Illinois) en 18 ml de 40 mM de Tris, 0,15 M de cloruro de sodio, pH 7,5 (TBS). Mientras se agitaban en vórtice, se añadió 2 ml de látex magnético lavado a la avidina-HS diluida y la mezcla se mezcló durante 30 segundos más. Esta mezcla se incubó a 45°C durante 2 h, agitando cada 30 min. El látex magnético con avidina se separó de la solución usando un imán y se lavó tres veces con 20 ml de BBS como se describió anteriormente. Después del lavado final, el látex se resuspendió en 10 ml de BBS y se almacenó a 4°C.

20 Inmediatamente antes del uso, el látex magnético con avidina se equilibró en tampón de filtración (40 mM de Tris, 150 mM de NaCl, 20 mg/ml de BSA, Tween 20 al 0,1%, pH 7,5). Se añadió el látex magnético con avidina necesario para un experimento de pasos de selección (200 µl/muestra) a un tubo de centrifuga estéril de 15 ml y se llevó a 10 ml con tampón para los pasos de selección. El tubo se colocó en el imán durante 10 min para separar el látex. La solución se eliminó cuidadosamente con una pipeta estéril de 10 ml como se describió anteriormente. El látex magnético se resuspendió en 10 ml de tampón para los pasos de selección para iniciar el segundo lavado. El látex magnético se lavó un total de 3 veces con tampón para los pasos de selección. Después del lavado final, el látex se resuspendió en 25 un tubo de 15 ml con tampón para los pasos de selección hasta el volumen de partida.

#### Ejemplo 6: selección de anticuerpos policlonales recombinantes para el antígeno bst1

30 Los reactivos de unión que se unen específicamente al BST1 se seleccionaron de las genotecas de presentación en fagos creadas a partir de ratones hiperinmunizados como se describió en el Ejemplo 5.

#### Pasos de selección.

35 Se prepararon anticuerpos en fagos de la primera ronda como se describe en el Ejemplo 5 usando la plantilla de uracilo BS45. Se realizaron electroporaciones de ADN de mutagénesis produciendo muestras de fagos derivadas de diferentes ratones inmunizados. Para crear más diversidad en la genoteca policlonal recombinante, cada muestra de fago se seleccionó por separado.

40 Antes de la primera ronda de pasos de selección funcional con el antígeno BST1 biotinilado, se seleccionaron las genotecas de anticuerpos en fagos para el fago que muestra tanto cadenas pesadas como ligeras en su superficie mediante los pasos de selección con látex magnético 7F11 (como se describe en los Ejemplos 21 y 22 de US 6,555,310). Los pasos de selección funcional de estas genotecas enriquecidas se llevó a cabo en principio como se describe en el Ejemplo 16 de US 6,555,310. Específicamente, se añadieron 10 µL de antígeno BST1 biotinilado  $1 \times 10^{-6}$  M a las muestras de fagos (aproximadamente  $1 \times 10^{-8}$  M de concentración final de BST1), y se dejó que la mezcla alcanzara el equilibrio durante toda la noche a 2-8°C.

50 Después de alcanzar el equilibrio, las muestras se seleccionaron con látex magnético con avidina para capturar el anticuerpo en fago unido al BST1. El látex magnético con avidina equilibrado (Ejemplo 5), 200 µL de látex por muestra, se incubó con el fago durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de 10 min, se añadió aproximadamente 9 ml de tampón para los pasos de selección a cada muestra de fago y el látex magnético se separó de la solución usando un imán. Después de una separación de diez minutos, el fago no unido se eliminó cuidadosamente usando una pipeta estéril de 10 ml. Después, el látex magnético se resuspendió en 10 ml de tampón para los pasos de selección para comenzar el segundo lavado. El látex se lavó un total de tres veces como se describió anteriormente. Para cada lavado, los tubos estuvieron en contacto con el imán durante 10 min para separar el fago no unido del látex magnético. Después del tercer lavado, el látex magnético se resuspendió en 1 ml de tampón para los pasos de selección y se transfirió a un tubo de 1,5 ml. Después se recogió todo el volumen de látex magnético para cada muestra y se resuspendió en 200 µl de 2\*YT y se sembró en placas LB de 150 mm como se describió en el Ejemplo 1 para amplificar el fago unido. Las placas se incubaron a 37°C durante 4 horas, después durante toda la noche a 20°C.

60 Las placas de 150 mm usadas para amplificar el fago unido se usaron para generar la siguiente ronda de anticuerpos en fagos. Después de la incubación durante toda la noche, el anticuerpo en fago de la segunda ronda se eluyó de las placas de 150 mm pipeteando 10 mL de medio 2\*YT en el césped y agitando suavemente la placa a temperatura ambiente durante 20 min. Después, las muestras de fago se transfirieron a tubos de centrifuga estériles desechables de 15 ml con una tapa sellada con tapón y los restos de la placa de LB se sedimentaron por centrifugación de los tubos durante 15 minutos a 3500 rpm. El sobrenadante que contiene el anticuerpo en fago de la segunda ronda se transfirió entonces a un nuevo tubo.

Se estableció una segunda ronda de pasos de selección funcional diluyendo 100 µL de cada concentrado de fagos en 900 µL de tampón para los pasos de selección en tubos de centrifugación estériles desechables de 15 ml. Después se añadió el antígeno BST1 biotinilado a cada muestra como se describió para la primera ronda de pasos de selección, y las muestras de fagos se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las muestras de fago se seleccionaron después con látex magnético con avidina como se describió anteriormente. El progreso de los pasos de selección se monitorizó en este punto sembrando las alícuotas de cada muestra de látex en placas de agar LB de 100 mm para determinar el porcentaje de positivos a kappa. La mayoría del látex de cada selección (99%) se sembró sobre placas de agar LB de 150 mm para amplificar el fago unido al látex. Las placas de agar LB de 100 mm se incubaron a 37°C durante 6-7 h, después de lo cual las placas se transfirieron a temperatura ambiente y se cubrieron filtros de nitrocelulosa (tamaño de poro 0,45 mm, BA85 Protran, Schleicher y Schuell, Keene, NH) sobre las placas.

Las placas con filtros de nitrocelulosa se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente y después se desarrollaron con un conjugado de carnero anti-kappa de ratón con fosfatasa alcalina para determinar el porcentaje de positivos a kappa como se describe más abajo. Las muestras de fago con porcentajes inferiores (<70 %) de positivos a kappa en la población se sometieron a una ronda de pasos de selección con látex magnético con 7F11 antes de realizar una tercera ronda funcional de pasos de selección durante toda la noche a 2-8°C usando el antígeno BST1 biotinilado a aproximadamente  $2 \times 10^{-9}$  M. Esta ronda de pasos de selección además se monitorizó para los positivos a kappa. Las muestras de fago individuales que tuvieron porcentajes positivos a kappa mayores que 80 % se mezclaron y se sometieron a una ronda final de pasos de selección durante toda la noche a 2-8°C a  $5 \times 10^{-9}$  M. Los genes del anticuerpo BST1 contenidos dentro del fago eluido a partir de esta cuarta ronda de pasos de selección funcional se subclonaron en el vector de expresión, pBRncoH3.

El proceso de subclonación se realizó generalmente como se describe en el Ejemplo 18 de US 6.555.310. Después de subclonar, el vector de expresión se electroporó en células DH10B y la mezcla creció durante toda la noche en 2\*YT que contenía 1% de glicerol y 10 µg/ml de tetraciclina. Después de una segunda ronda de crecimiento y selección en tetraciclina, se congelaron alícuotas de células a -80°C como fuente de la producción de anticuerpos policlonales BST1. Se seleccionaron anticuerpos monoclonales a partir de estas mezclas policlonales colocando una muestra de la mezcla en placas de agar LB que contenían tetraciclina 10 µg/ml y se seleccionaron anticuerpos que reconocían la BST1.

#### Expresión y Purificación de Anticuerpos Recombinantes contra BST1

Se generó un inóculo en matraz de agitación durante toda la noche a partir un banco de células a -70°C en un agitador de incubadora Innova 4330 (New Brunswick Scientific, Edison, Nueva Hampshire) ajustado a 37°C, 300 rpm. Se usó el inóculo para sembrar un fermentador de 20 L (Applikon, Foster City, California) que contenía medio de cultivo definido [Pack y otros. (1993) *BioTechnology* 11: 1271-1277] suplementado con 3 g/L de L-leucina, 3 g/L de isoleucina, 12 g/L de digestión de caseína (Difco, Detroit, Michigan), 12,5 g/L de glicerol y 10 µg/ml de tetraciclina. La temperatura, el pH y el oxígeno disuelto en el fermentador se controlaron a 26°C, 6,0-6,8 y 25 % de saturación, respectivamente. La espuma se controló mediante la adición de polipropilenglicol (Dow, Midland, Michigan). Se añadió glicerol al fermentador en un modo semicontinuo. La expresión de Fab se indujo por adición de L(+)-arabinosa (Sigma, St. Louis, Misuri) a 2 g/L durante la fase de crecimiento logarítmico tardío. La densidad celular se midió por densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro UV-1201 (Shimadzu, Columbia, Maryland.). A continuación de la terminación de la operación y el ajuste del pH a 6,0, el cultivo se pasó dos veces a través de un Microfluidizador M-210B-EH (Microfluidics, Newton, Massachusetts) a 17.000 psi. La homogeneización a alta presión de las células liberó el Fab en el sobrenadante del cultivo.

La primera etapa en la purificación fue la cromatografía de afinidad de metal inmovilizado en cama expandida (EB-IMAC). La resina Streamline™ quelante (Pharmacia, Piscataway, Nueva Hampshire) se cargó con 0,1 M de NiCl<sub>2</sub> y después se expandió y se equilibró en 50 mM de tampón de acetato, 200 mM de NaCl, 10 mM de imidazol, NaN<sub>3</sub>, al 0,01%, pH 6,0 fluyendo hacia arriba. Se usó una solución madre para llevar el homogeneizado de cultivo a 10 mM de imidazol, después de lo cual se diluyó dos veces o más en tampón de equilibrio para reducir el contenido de sólidos húmedos a menos del 5 % en peso. Se cargó después en la columna Streamline que fluye en dirección ascendente a una velocidad superficial de 300 cm/hr. Los restos celulares pasaron sin obstáculos, pero el Fab se capturó por medio de la interacción de alta afinidad entre níquel y la etiqueta de hexahistidina en la cadena pesada Fab. Después de lavar, el lecho expandido se convirtió en un lecho empacado y el Fab se eluyó con un tampón 20 mM de borato, 150 mM de NaCl, 200 mM de imidazol, NaN<sub>3</sub>, al 0,01%, pH 8,0, que fluye hacia abajo.

La segunda etapa en la purificación usó la cromatografía de intercambio iónico (IEC). Se equilibró la resina Q Sepharose FastFlow (Pharmacia, Piscataway, Nueva Hampshire) en 20 mM de borato, 37,5 mM de NaCl, NaN<sub>3</sub> al 0,01%, pH 8,0. La mezcla de elución Fab de la etapa EB-IMAC se diluyó cuatro veces en 20 mM de borato, NaN<sub>3</sub> al 0,01%, pH 8,0 y se cargó en la columna IEC. Después del lavado, el Fab se eluyó con un gradiente de sal 37,5-200 mM de NaCl. Las fracciones de elución se evaluaron en cuanto a pureza usando un sistema SDS-PAGE Xcell II™ (Novex, San Diego, California) antes de mezclar. Finalmente, la mezcla de Fab se concentró y diafiltró en tampón 20 mM de borato, 150 mM de NaCl, NaN<sub>3</sub>, al 0,01%, pH 8,0 de tampón para el almacenamiento. Esto se logró en un sistema Sartocón Slice™ equipado con un casete de 10.000 MWCO (Sartorius, Bohemia, Nueva York). Los rendimientos finales

de purificación fueron típicamente del 50 %. La concentración del Fab purificado se midió por absorbancia de UV a 280 nm, suponiendo una absorbancia de 1,6 para una solución de 1 mg/ml.

Ejemplo 7: especificidad de anticuerpos monoclonales contra bst1 determinada por análisis de citometría de flujo

El análisis de citometría de flujo se realizó en células sanguíneas periféricas CD33+ de pacientes con AML usando anticuerpo policlonal de carnero sc7113 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, California). Además se realizaron estudios FACS comparativos en un subconjunto de leucocitos humanos que comparaban BST1 con CD33.

La especificidad de los anticuerpos contra la BST1 seleccionada en el Ejemplo 6 además se ensayó mediante citometría de flujo. Para ensayar la capacidad de los anticuerpos para unirse a la proteína BST1 de la superficie celular, los anticuerpos se incubaron con las células que expresan BST1, H226 (carcinoma escamoso pulmonar humano) y A549 (adenocarcinoma pulmonar humano). Las células se lavaron en tampón FACS (DPBS, FBS al 2%), se centrifugaron y se resuspendieron en 100 µl del anticuerpo BST1 primario diluido (además diluido en tampón FACS). El complejo de anticuerpo-A549 y el complejo de anticuerpo-H226 se incubaron sobre hielo durante 60 min y después se lavaron dos veces con tampón FACS como se describió anteriormente. El sedimento de anticuerpo celular se resuspendió en 100 µl del anticuerpo secundario diluido (además diluido en tampón FACS) y se incubó sobre hielo durante 60 min en hielo. El sedimento se lavó como antes y se resuspendió en 200 µL de tampón FACS. Las muestras se cargaron en el citómetro de flujo BD FACScanto II y los datos se analizaron usando el programa BD FACSDiva. La unión de BST1\_A1 y BST1\_A2 a BST1 expresada en células A549 y H226 se analizaron usando la citometría de flujo.

Resultados

La Figura 4a muestra el análisis citométrico de flujo de 6 muestras de AML. Muestra las células sanguíneas periféricas CD33+ de pacientes con AML, ya sea teñidas con anticuerpos anti-BST1 (área clara bajo la curva) o sin teñir (área gris). Los resultados muestran tinción positiva con un anticuerpo anti-BST1 en 6 de los 6 pacientes con AML.

La Figura 4b muestra el análisis citométrico de flujo de BST1 y CD33 en un subconjunto de leucocitos humanos. Los resultados revelaron un perfil de unión comparable para los dos objetivos en estas clases de células. Se observó fuerte unión de BST1 en granulocitos y monocitos, ambos de los cuales pueden asociarse y activarse en enfermedades tales como asma, gota, crohns, lupus y diabetes. Los monocitos además se implican en el desarrollo de placas ateroscleróticas.

Los resultados del análisis de citometría de flujo demostraron que 4 anticuerpos monoclonales designados BST1\_A1 y BST1\_A2 se unieron eficazmente a la BST1 humana de la superficie celular. La Figura 4c muestra las especificidades de unión de BST1\_A1 y BST1\_A2 a BST1 en las células A549 y H226, respectivamente. Los resultados indican una unión fuerte de los anticuerpos contra BST1 en A549 y H226.

Ejemplo 8: Caracterización estructural de anticuerpos monoclonales contra el receptor transmembrana tirosina-proteína quinasa bst1

Las secuencias de ADNc que codifican las regiones variables de cadena pesada y ligera de los anticuerpos monoclonales BST1\_A1 y BST1\_A2 se obtuvieron usando técnicas estándar de PCR y se secuenciaron usando técnicas estándar de secuenciación de ADN.

Las secuencias de anticuerpos pueden mutagenizarse para volver a los residuos de la línea germinal en uno o más residuos.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de BST1\_A1 son las sec. con núm. de ident.: 18 y 14, respectivamente

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de BST1\_A1 son las sec. con núm. de ident.: 19 y 15, respectivamente

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de BST1\_A2 son las sec. con núm. de ident.: 20 y 16, respectivamente

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de BST1\_A2 son las sec. con núm. de ident.: 21 y 17, respectivamente

Ejemplo 9: internalización y mabzap de bst1\_a1 y bst1\_a2 en las células a549 y h226.

La internalización de BST1\_A1 y BST1\_A2 por H226 y A549 se investigaron usando un ensayo de MabZap. El ensayo MabZAP mostró la internalización de los anticuerpos monoclonales anti-BST1 mediante la unión de un anticuerpo secundario anti-IgG humano conjugado con la toxina saporina. (Advanced Targeting System, San Diego, California, IT-22-100). En primer lugar, el Fab de BST1 se unió a la superficie de las células. Después, los anticuerpos MabZAP se unieron a los anticuerpos primarios. A continuación, el complejo MabZAP se internalizó por las células. La entrada de Saporina en las células resultó en la inhibición de la síntesis de proteínas y la muerte celular eventual.

El ensayo MabZAP se llevó a cabo como sigue. Cada una de las células se sembró a una densidad de  $5 \times 10^3$  células por

pocillo. El anticuerpo monoclonal anti-BST1 o una IgG humana de control del isotipo se diluyó en serie, después se añadió a las células y se incubó durante 15 min a 25°C. Después se añadió el MabZAP y se incubó durante 72 horas a 37°C. La viabilidad celular en las placas se detectó mediante el kit del Ensayo de Viabilidad Celular Luminescente (Promega, G7571) CellTiter-Glo® y las placas se leyeron y analizaron usando Promega Glomax. La muerte celular fue proporcional a la concentración de anticuerpos monoclonales anti-BST1. Las Figuras 5a y 5b muestran que los anticuerpos monoclonales anti-BST1, BST1\_A1 y BST1\_A2 se interiorizaron eficientemente por las células H226 y A549, en comparación con el anticuerpo control de isotipo anti-IgG humano.

Ejemplo 10: especificidad de los anticuerpos monoclonales contra bst1 determinado por el análisis de citometría de flujo en pacientes aml

La capacidad de BST\_A2 de unirse a linfoblastos de pacientes con AML se probó mediante Análisis de Citometría de Flujo. Se tomó sangre de 20 pacientes con AML. Usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 7, se demostró que BST\_A2 se une a blastos de AML de aproximadamente 80 % de los pacientes con AML.

Ejemplo 11 citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos mediada por mabs anti-bst1

En primer lugar se añadieron 25 µL de anticuerpos anti-BST1 parentales y no fucosilados (BST1\_A2 y BST1\_A2\_NF) a concentraciones en el intervalo de 10nm/L a 0,1nm/L a pocillos separados de una placa de 96 pocillos de *fondo v* junto con 50 µL de células A549 y U937 (células de linfoma histiocítico) que expresan BST1. Después se añadió 25 µL de células efectoras a los pocillos para producir una relación final efector: objetivo (E: T) de 10:1 y 25:1. La placa se centrifugó suavemente después a 1000 rpm durante 2 minutos, después de lo cual se incubó durante 4 horas en incubadora de CO2 al 5 %, 37°C. A las 3 h después de la incubación, se añadió 10 µL de solución de lisis a cada uno de los pocillos que contenían células que expresan BST1 solo para medir la máxima liberación de LDH, y un conjunto de pocillos que contenían solo medio para el control de la corrección volumétrica.

Después de la incubación, las células se centrifugaron suavemente a 1000 rpm durante 2 minutos, después de lo cual se transfirió 50 µL de sobrenadante a una placa de 96 pocillos de *fondo plano*. Usando el Ensayo de Citotoxicidad No Radioactiva CytoTox 96® disponible de Promega (núm. de catálogo: G1780), los componentes del kit se reconstituyeron de conformidad con las especificaciones del fabricante y después se añadió 50 µl de la mezcla de sustrato a cada pocillo. Después se cubrió la placa y se dejó incubar durante 30 minutos a 25°C protegido de la luz. Después de esto, se añadió 50 µL de solución de parada a cada pocillo y se registró la absorbancia a 490 nm usando el lector de placas variokan.

Usando un anticuerpo conocido que incita la muerte celular a través de ADCC como control positivo y un control de isotipo IgG1 humano como control negativo, los resultados muestran que BST1\_A2 y BST1\_A2\_NF fueron capaces de provocar ADCC en células A549 y U937 que expresan BST1. En las células A549 que expresan BST1, BST1\_A2\_NF se mostraron aproximadamente 45 % de destrucción a 10nmol/L (Figura 6). En las células U937 que expresan BST1, BST1\_A2 se mostraron una destrucción de aproximadamente 20 % a 1nmol/L y BST1\_A2\_NF mostraron aproximadamente 45 % de muerte a 1nmol/L (Figura 6b), mostrando por lo tanto que BST1\_A2\_NF puede tener un efecto terapéutico en pacientes con AML y cáncer de pulmón.

# ES 2 615 256 T3

## Listado de Secuencia

Sec. con número de ident.:	DESCRIPCIÓN	Secuencia
1	ADP-ribosil ciclasa 2 (BST1)	MAAQGCAASRLLQLLLQLLLLLLAAGGARARWRGEGTSAHLRDIFLGRCAEYRALL SPEQRNKNCTAIWEAFKVALDKDPCSVLPSDYDLFINLSRHSIPRDKSLFWENSHLLVN SFADNTRRFMPLSDVLYGRVADFLSWCRQKNDSGLDYQSCPTSEDCENNPVDSFWK RASIQYKSDSSGVIHVMLNGSEPTGAYPIKGFFADYEIPNLQKEKITRIEIVWMHEIGGP
		NVESCGEKSMKVLKRLKDMGFQYSCINDYRPVKLLQCVDHSTHPDCALKSAAAATQ RKAPSLYTEQRAGLIPLFLVLASRTQL
2	Péptido 1 de BST1	ALLSPEQR
3	Péptido 2 de BST1	DIFLGR
4	Péptido 3 de BST1	DMGFQYSCINDYRPVK
5	Péptido 4 de BST1	FMPLSDVLYGR
6	Péptido 5 de BST1	GEGTSAHLR
7	Péptido 6 de BST1	GFFADYEIPNLQK
8	Péptido 7 de BST1	LLQCVDHSTHPDCALK
9	Péptido 8 de BST1	SLFWENSHLLVNSFADNTR
10	Péptido 9 de BST1	VADFLSWCR
11	Péptido 10 de BST1	SLFWENSHLLVN
12	Péptido 11 de BST1	LKDMGFQYSCINDYRPVK
13	aa 29 - 292 de ADP-ribosil ciclasa 2 (BST1)	GARARWRGEGTSAHLRDIFLGRCAEYRALLSPEQRNKNCTAIWEAFKVALDKDPCSV LPSDYDLFINLSRHSIPRDKSLFWENSHLLVNSFADNTRRFMPLSDVLYGRVADFLSW CRQKNDSGLDYQSCPTSEDCENNPVDSFWKRASIQYKSDSSGVIHVMLNGSEPTGA YPIKGFFADYEIPNLQKEKITRIEIVWMHEIGGPNVESCGEKSMKVLKRLKDMGFQYS CINDYRPVKLLQCVDHSTHPDCALKSAAAATQQRK
14	aminoácido de VH_A1	MKQSTIALALLPLLFTPVAKAQVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFNSWINWV KQRPGQGLEWIGQIYPGDYDTNNGKFKGKATLTADYSSSTAYMQLNSLTSEDSAVY FCARGGSIYGNLGFDDVWGAGTTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNMVTGLCL VKGYFFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWVPSSTVTCNVA HPASSTKVDKKIVPRDCHHHHHH
15	aminoácido de VK_A1	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAEMVLTQSPAIMSTSLGERVTMTCTASSRVSSYLHW YQQKPGSSPKLWIYSTNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEADAATYCHQYH RSPYTFGGGKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNFFPKDINVKWKID GSERQNGVLNSWTDQDSKDSYMSSTLTLTKDEYERHNSYTCETHKTSTSPIVKS FNRNES
16	aminoácido de VH_A2	MKQSTIALALLPLLFTPVAKAQAYLQQSGPELVKAGASVKMCSKASGYFIEYTINWVK QSHGKSLEWIGNIDPYGTYYNQMTGKATLTVDQSSNTAYMQLKSLTSEDSAVYF CARGSAWFPYWGQGLVTVSAAKTPPSVYPLAPGSAAQTNMVTGLCLVKGYFPE PVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWVPSSTVTCNVAHPASSTK VDKKIVPRDCHHHHHH
17	aminoácido de VK_A2	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMADIVMSQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVTYMYWY QQKPGSSPRLIYDTSNLASGVVRFSGSGSGTSYSLTISRMEADTATYCCQWNSN YPLTFGAGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNFFPKDINVKWKIDG SERQNGVLNSWTDQDSKDSYMSSTLTLTKDEYERHNSYTCETHKTSTSPIVKSF NRNES

ES 2 615 256 T3

18	nt VH_A1	<p>ACGCTTTGTACATGGAGAAAATAAAGTGAACAAAGCACTATTGCACTGGCACTCT  TACCGCTCTTATTACCCCTGTGGCAAAGCCCAGGTGAAGCTTCAGCAGTCCGG  GGCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGTCCTCAGTGAAGATTTCCTGCAAGGCTTCTGGC  TACGCATTAGTAACCTCTGGATAAACTGGGTGAAGCAGAGGCTGGACAGGGTC  TTGAGTGGATTGGACAGATTATCCTGGAGATTATGATACTAACTACAATGGAAAAAT  TCAAGGGTAAAGCCACTGACTGCAGACTACTCCTCCAGCACAGCCTACATGCA  GCTCAACAGCCTAACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTCTGTGCAAGGGGGGGA  TCGATCTACTATGGTAACCTCGGGTTCTTCGATGCTGGGGCCGAGGGACCCAGG  TCACCGTCTCCTCAGCAAACGACACCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCTGG  ATCTGCTGCCCAAACCTAACATCCATGGTGACCTGGGATGCCTGGTCAAGGGCTAT  TTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTGGATCCCTGCCAGCGGTGTGC  ACACCTTCCCAGCTGTCTGCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACT  GTCCCCCTCCAGCAGCTGGCCAGCGAGACCGCTCACCTGCAACGTTGCCACCCG  GCCAGCAGCACCAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCAGGGATTGTCATCATCACC  ATCACCATCACTAATTGACAGCTTATCATCGATANGCT</p>
19	nt VK_A1	<p>GTTTTTTGGATGGAGTGAACGATGAAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGA  TTGTTATTACTCGCTGCCAACCAGCCATGGCCGAAATGGTCTCACCCAGTCTCC  AGCAATCATGTCTACATCTTAGGGGAACGGGTCACCATGACCTGCACTGCCAGC  TCACCTGTAAGTTCCAGTTACTTGCCTGTTACCCAGCAGAAAGCAGGATCCTCCC  CCAAACTCTGGATTATAGTACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCAGCTCGCTTC  AGTGGCAGTGGGCTGGGACCTCTTACTCTCACAATCAGCAGCATGGAGGCTG  AAGATGCTGCCACTTATTACTGCCACCAGTATCATCGTTCCCCGTCACAGTTCCGA  GGGGGGACCAAGCTGGAATAAAACGGGCTGATGCTGCACCACTGTATCCATCT  TCCCACCTCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTG  AACAACTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAAAGATTGATGGCAGTGAACG  ACAAATGGCGTCTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACCTAC  AGCATGAGCAGCACCCCTCACGTTGACCAAGGACAGATGAAACGACATAACAGCT  ATACCTGTGAGGCCACTCACAAAGACATCAACTTACCCATTGTCAAGAGCTTCAAC  AGGAATGAGTCTTAAGTATTAGCTAATTCTAGAACG</p>
20	nt VH_A2	<p>AAAACCTGGCGTTACCCACGCTTTGTACATGGAGAAAATAAAGTGAACAAAGCA  CTATTGCACTGGCACTCTTACCGCTCTTATTACCCCTGTGGCAAAGCCCAGGCT  TATCTACAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGGCTGGCGCTTCAAGTGAAGATGT  CTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTCAATTGAGTACACCATAAACTGGGTGAACAG  AGCCATGGAAGAGCCTTGAAGTGGATTGGAATATTGATCCTTATTATGGAACCAC  TTATTACAATCAGATGTTACGGGCAAGGCCACATGACTGTAGACCAATCTTCCA  ACACTGCCTACATGCAGCTCAAGAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCACTTATTTC  TGTGCAAGAGGCTCCGCTGGTTTCTTACTGGGGCCAGGGGACTCTAGTCACTG  TCTCTGCAGCCAAAACGACACCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCTGGATCTGCT  GCCAAACTAACTCCATGGTGACCCCTGGGATGCTGGTCAAGGGCTTATTCCCTG  AGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTT  CCCAGCTGTCTGCACTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCC  TCCAGCACCTGGCCAGCGAGACCGTCCCTGCAACGTTGCCACCCGCGCCAGC  AGCACCAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCAGGGATTGTCATCATCACCATCACC  ATCACTAATTGACAGCTTATCATCGAT</p>
21	nt VK_A2	<p>ACTCTACTGTTTCTCCATACCCGTTTTTTTTGGATGGAGTGAACGATGAAATACC  TATTGCCTACGGCAGCCGCTGGATTGTTATTACTCGCTGCCAACCAGCCATGGC  CGACATCGTTATGTCTCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAG  GTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAACTTACATGACTGTTGTTACCAGCA  GAAGCCAGGATCCTCCCCAGACTCCTGATTATGACACATCCAACCTGGCTTCTG  GAGTCCCTGTTGCTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAAATC  AGCCGAATGGAGGCTGAAGATACTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAATTA  CCCCTCACGTTCCGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGGGCTGATGCTGC  ACCAACTGTATCCATCTTCCACCATCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCT</p>
		<p>CAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGGAA  ATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTTGAACAGTTGGACTGATCAGGACA  GCAAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCACGTTGACCAAGGACGAGTA  TGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAAGACATCAACTTACCCCA  TTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTCTTAAGTATTAGCTAATTCTGAACAGCG  TCACTTGGCACTGGCCGTCGTTTTA</p>

Reivindicaciones

- 5 1. Un anticuerpo, su fragmento funcional o un mimético de anticuerpo que se une a BST1 para su uso en el tratamiento o profilaxis de una enfermedad seleccionada de la lista que consiste en leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica crónica de células B, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón o cáncer pancreático.
- 10 2. El anticuerpo, su fragmento funcional o mimético del anticuerpo para su uso de conformidad con la reivindicación 1, en donde dicha enfermedad es la leucemia mieloide aguda (AML).
- 15 3. El anticuerpo para su uso de conformidad con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 20 4. El anticuerpo, su fragmento funcional o mimético de anticuerpo para su uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el anticuerpo, su fragmento funcional o mimético de anticuerpo es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo de cadena sencilla, un anticuerpo defucosilado o un anticuerpo biespecífico.
- 25 5. El anticuerpo, su fragmento funcional o mimético de anticuerpo para su uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el anticuerpo, su fragmento funcional o mimético de anticuerpo contiene o se conjuga con una porción terapéutica; preferentemente, en donde la porción terapéutica es una porción citotóxica o un isótopo radiactivo; opcionalmente en donde el anticuerpo, su fragmento funcional o mimético de anticuerpo es un conjugado del fármaco anticuerpo.
- 30 6. El anticuerpo, su fragmento funcional o mimético de anticuerpo para su uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el reactivo de afinidad provoca uno o más de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y/o citotoxicidad de células T.
- 35 7. El anticuerpo, su fragmento funcional o mimético de anticuerpo para su uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el anticuerpo, su fragmento funcional o mimético de anticuerpo induce la apoptosis de células cancerosas, destruye o reduce el número de células madre cancerosas y/o destruye o reduce el número de células cancerosas circulantes.
- 40 8. El anticuerpo, su fragmento funcional o mimético de anticuerpo para su uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el anticuerpo, su fragmento funcional o mimético de anticuerpo modula una función fisiológica de BST1, inhibe la unión del ligando a BST1 y/o inhibe una vía de transducción de señal mediada por BST1.
- 45 9. Un método para detectar, diagnosticar y/o tamizar una enfermedad en donde BST1 se expresa en dicha enfermedad, o para controlar el efecto de un fármaco o terapia en donde BST1 se expresa en dicha enfermedad, en una muestra obtenida de un sujeto que comprende; detectar la presencia o el nivel de BST1, o uno o más de sus fragmentos, que comprende detectar un cambio en el nivel de este en dicho sujeto; en donde dicha enfermedad se selecciona del grupo que consiste en leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica crónica de células B, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón y cáncer de pancreático.
- 50 10. El método de conformidad con la reivindicación 9, que comprende detectar la presencia de BST1, o uno o más de sus fragmentos, en el que ya sea (a) la presencia de un nivel elevado de BST1 o uno o más de sus dichos fragmentos en el sujeto en comparación con el nivel en un sujeto sano, o (b) la presencia de un nivel detectable de BST1 o uno o más de sus dichos fragmentos en el sujeto en comparación con un nivel indetectable correspondiente en un sujeto sano es indicativo de la presencia de cáncer en donde se expresa BST1 en dicho cáncer, en dicho sujeto.
- 55 11. El método de conformidad con la reivindicación 9 ó 10, en donde la presencia de BST1, o uno o más de sus fragmentos, se detecta usando un anticuerpo, su fragmento funcional o mimético de anticuerpo que se une a BST1; preferentemente el anticuerpo, su fragmento funcional o mimético de anticuerpo es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4.
- 60 12. El método de conformidad con la reivindicación 11, en donde el anticuerpo, su fragmento funcional o mimético de anticuerpo contiene o se conjuga con un marcador detectable.
13. El uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o el método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en donde el sujeto es un ser humano.

### Figura 1A

Fuente de Péptido: LC/MS de Cáncer de Mama

**BST1 (sec. con núm. de ident.:1)**

MAAQGCAASRLLQLLLQLLLLLLLLAAGGARARWRGEGTSAHLRDI FLGRCAEYRALLSP  
EQRNKNCTAIWEAFKVALDKDPCSVLPSDYDLFYNLSRHSI PRDKSLFWENSHLLVNSFA  
DNTRREMPPLSDVLYGRVADFLSWCRQKNDSGLDYQSCPTSEDCENNPVDSFWKRASIQYS  
KDSSGVIHVMLNGSEPTGAYPIKGFADYEIIPNLQKEKITRIEIVVMHEIGGPNVESCGE  
GSMKVLEKRLKDMGFQYSCINDYRPVKLLQCVDHSTHPDCALKSAAAATQRKAPSLYTEQ  
RAGLIIPFLVLASRTQL

**Péptidos en Tándem (subrayado):**

sec.con núm. de ident.: 4- DMGFQYSCINDYRPVK  
sec.con núm. de ident.: 5- FMPLSDVLYGR  
sec.con núm. de ident.: 7- GFFADYEIPNLQK  
sec.con núm. de ident.: 8- LLQCVDHSTHPDCALK  
sec.con núm. de ident.: 9- SLFWENSHLLVNSFADNTR  
sec.con núm. de ident.: 10- VADFLSWCR

### Figura 1B

Fuente de Péptido: LC/MS de Cáncer Colorectal

**BST1 (sec.con núm. de ident.:1)**

MAAQGCAASRLLQLLLQLLLLLLLLAAGGARARWRGEGTSAHLRDI FLGRCAEYRALLSP  
EQRNKNCTAIWEAFKVALDKDPCSVLPSDYDLFYNLSRHSI PRDKSLFWENSHLLVNSFA  
DNTRREMPPLSDVLYGRVADFLSWCRQKNDSGLDYQSCPTSEDCENNPVDSFWKRASIQYS  
KDSSGVIHVMLNGSEPTGAYPIKGFADYEIIPNLQKEKITRIEIVVMHEIGGPNVESCGE  
GSMKVLEKRLKDMGFQYSCINDYRPVKLLQCVDHSTHPDCALKSAAAATQRKAPSLYTEQ  
RAGLIIPFLVLASRTQL

**Péptidos en Tándem (subrayado):**

sec.con núm. de ident.: 2- ALLSPEQR  
sec.con núm. de ident.: 5- FMPLSDVLYGR  
sec.con núm. de ident.: 7- GFFADYEIPNLQK  
sec.con núm. de ident.: 8- LLQCVDHSTHPDCALK  
sec.con núm. de ident.: 9- SLFWENSHLLVNSFADNTR  
sec.con núm. de ident.: 10- VADFLSWCR

### Figura 1C

Fuente de Péptido: LC/MS de Cáncer de Riñón

**BST1 (sec. con núm. de ident.:1)**

MAAQGCAASRLLQLLLQLLLLLLLLAAGGARARWRGEGTSAHLRDI FLGRCAEYRALLSP  
EQRNKNCTAIWEAFKVALDKDPCSVLPSDYDLFYNLSRHSI PRDKSLFWENSHLLVNSFA  
DNTRREMPPLSDVLYGRVADFLSWCRQKNDSGLDYQSCPTSEDCENNPVDSFWKRASIQYS  
KDSSGVIHVMLNGSEPTGAYPIKGFADYEIIPNLQKEKITRIEIVVMHEIGGPNVESCGE  
GSMKVLEKRLKDMGFQYSCINDYRPVKLLQCVDHSTHPDCALKSAAAATQRKAPSLYTEQ  
RAGLIIPFLVLASRTQL

**Péptidos en Tándem (subrayado):**

sec.con núm. de ident.: 7- GFFADYEIPNLQK  
sec.con núm. de ident.: 8- LLQCVDHSTHPDCALK  
sec.con núm. de ident.: 10- VADFLSWCR

### Figura 1D

Fuente de Péptido: LC/MS de Cáncer de Pulmón

**BST1 (sec. con núm. de ident.:1)**

MAAQGCAASRLQLLLQLLLLLLLLAAGGARARWRGEGTSAHLRDIFLGRCAEYRALLSP  
EQRNKNCTAIWEAFKVALDKDPCSVLPDYLFINLSRHSIPROKSLFWENSHLLVNSFA  
DNTRRFMPLSDVLYGRVADFLSWCRQKNDGSLDYQSCPTSEDCENNPVDSFWKRASIQYS  
KDSGVIHVMLNGSEPTGAYPIKGFFADYEIPNLQKEKITRIEIVVMHEIGGNVESCGE  
GSMKVLEKRLKDMGFQYSCINDYRPVKLLQCVDHSTHPDCALKSAAAATQRKAFSLYTEQ  
RAGLIYPLFLVLASRTQL

**Péptidos en Tándem (subrayado):**

sec.con núm. de ident.: 2- ALLSPEQR  
sec.con núm. de ident.: 3- DIFLGR  
sec.con núm. de ident.: 5- FMPLSDVLYGR  
sec.con núm. de ident.: 7- GFFADYEIPNLQK  
sec.con núm. de ident.: 8- LLQCVDHSTHPDCALK  
sec.con núm. de ident.: 10- VADFLSWCR  
sec.con núm. de ident.: 11- SLFWENSHLLVN  
sec.con núm. de ident.: 12- LKCMGFQYSCINDYRPVK

### Figura 1E

Fuente de Péptido: LC/MS de Cáncer Pancreático

**BST1 (sec. con núm. de ident.:1)**

MAAQGCAASRLQLLLQLLLLLLLLAAGGARARWRGEGTSAHLRDIFLGRCAEYRALLSP  
EQRNKNCTAIWEAFKVALDKDPCSVLPDYLFINLSRHSIPROKSLFWENSHLLVNSFA  
DNTRRFMPLSDVLYGRVADFLSWCRQKNDGSLDYQSCPTSEDCENNPVDSFWKRASIQYS  
KDSGVIHVMLNGSEPTGAYPIKGFFADYEIPNLQKEKITRIEIVVMHEIGGNVESCGE  
GSMKVLEKRLKDMGFQYSCINDYRPVKLLQCVDHSTHPDCALKSAAAATQRKAPSLYTEQ  
RAGLIYPLFLVLASRTQL

**Péptidos en Tándem (subrayado):**

sec.con núm. de ident.: 2- ALLSPEQR  
sec.con núm. de ident.: 3- DIFLGR  
sec.con núm. de ident.: 5- FMPLSDVLYGR  
sec.con núm. de ident.: 7- GFFADYEIPNLQK  
sec.con núm. de ident.: 10- VADFLSWCR

### Figura 1F

Fuente de Péptido: LC/MS de Cáncer de Cabeza y Cuello.

**BST1 (sec. con núm. de ident.:1)**

MAAQGCAASRLQLLLQLLLLLLLLAAGGARARWRGEGTSAHLRDIFLGRCAEYRALLSP  
EQRNKNCTAIWEAFKVALDKDPCSVLPDYLFINLSRHSIPROKSLFWENSHLLVNSFA  
DNTRRFMPLSDVLYGRVADFLSWCRQKNDGSLDYQSCPTSEDCENNPVDSFWKRASIQYS  
KDSGVIHVMLNGSEPTGAYPIKGFFADYEIPNLQKEKITRIEIVVMHEIGGNVESCGE  
GSMKVLEKRLKDMGFQYSCINDYRPVKLLQCVDHSTHPDCALKSAAAATQRKAPSLYTEQ  
RAGLIYPLFLVLASRTQL

**Péptidos en Tándem (subrayado):**

sec. con núm. de ident.: 2- ALLSPEQR  
sec. con núm. de ident.: 5- FMPLSDVLYGR  
sec. con núm. de ident.: 8- LLQCVDHSTHPDCALK  
sec.con núm. de ident.: 10- VADFLSWCR

## Figura 1G

Fuente de Péptido: LC/MS de Cáncer de Ovario

**BST1 (sec. con núm. de ident.:1)**

MAAQGCAASRLQLQLLQLLLLLLLAAGGARARWRGEGTSAHLRDI FLGRCAEYRALLSP  
EQRNKNCTAIWEAFKVALDKDPCSVLPSDYDLFINLSRHSIPROKSLFWENSHLLVNSFA  
DNTRRFMPLSDVLYGRVADFLSWCRQKND SGLDYQSCPTSEDCENNPVDSFWKRASIQYS  
KDSSGVIHVMLNGSEPTGAYPIKGFADYEIPNLQKEKITRIEIVVMHEIGGPNVESCGE  
GSMKVLEKRLKDMGFQYSCINDYRPVKLLQCVDHSTHPDCALKSAAAATQRKAFSLYTEQ  
RAGLI I PLFLVLASRTQL

**Péptidos en Tándem (subrayado):**

sec.con núm. de ident.: 2- ALLSPEQR  
sec.con núm. de ident.: 5- FMPLSDVLYGR  
sec.con núm. de ident.: 6- GEGTSAHLR  
sec.con núm. de ident.: 7- GFFADYEIPNLQK  
sec.con núm. de ident.: 8- LLQCVDHSTHPDCALK  
sec.con núm. de ident.: 10- VADFLSWCR

## Figura 2

Fuente de Péptido: iTRAQ de Cáncer de Pulmón

**BST1 (sec. con núm. de ident.:1)**

MAAQGCAASRLQLQLLQLLLLLLLAAGGARARWRGEGTSAHLRDI FLGRCAEYRALLSP  
EQRNKNCTAIWEAFKVALDKDPCSVLPSDYDLFINLSRHSIPROKSLFWENSHLLVNSFA  
DNTRRFMPLSDVLYGRVADFLSWCRQKND SGLDYQSCPTSEDCENNPVDSFWKRASIQYS  
KDSSGVIHVMLNGSEPTGAYPIKGFADYEIPNLQKEKITRIEIVVMHEIGGPNVESCGE  
GSMKVLEKRLKDMGFQYSCINDYRPVKLLQCVDHSTHPDCALKSAAAATQRKAFSLYTEQ  
RAGLI I PLFLVLASRTQL

**Péptidos en Tándem (subrayado):**

sec. con núm. de ident.: 6- GEGTSAHLR



Figura 3B

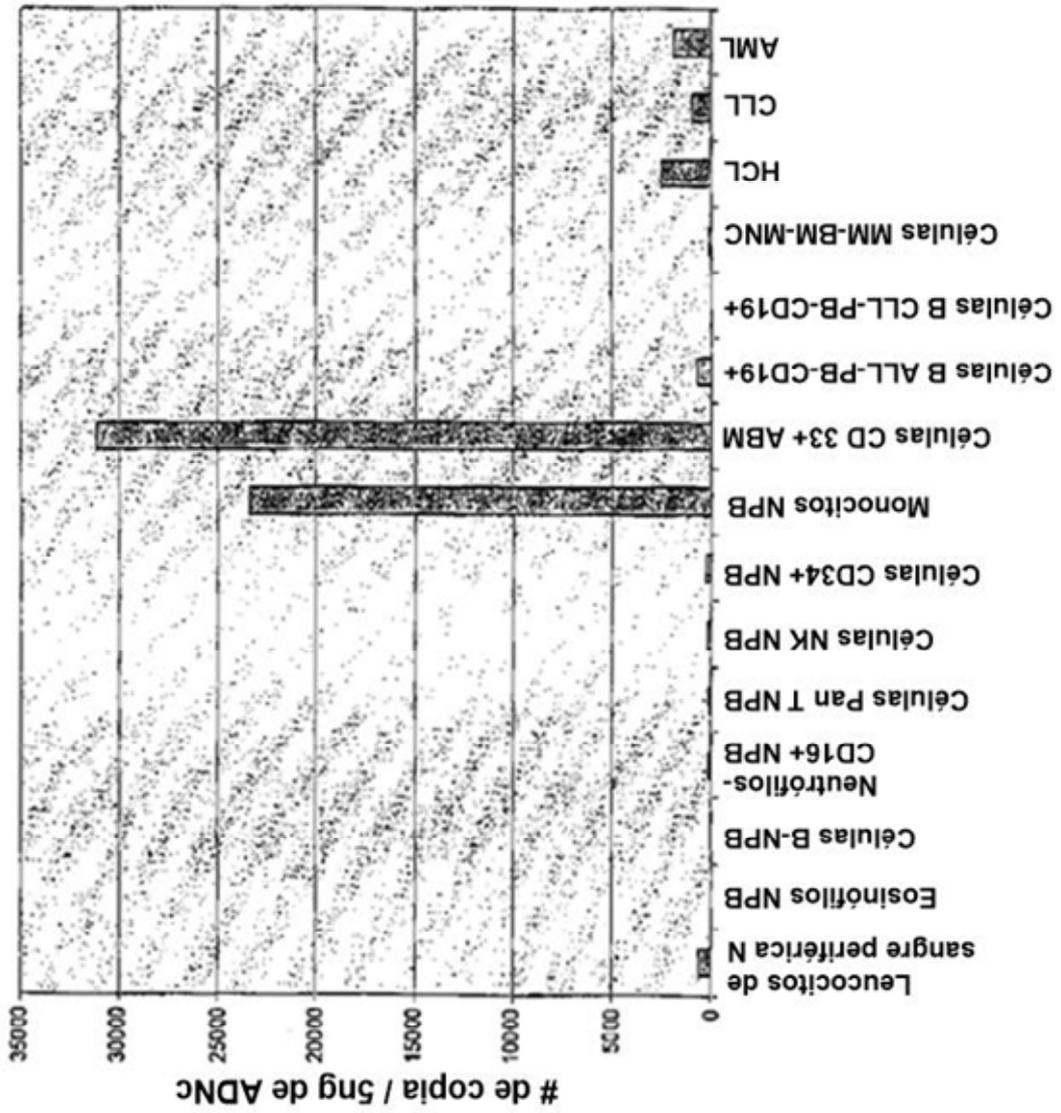


Figura 3C

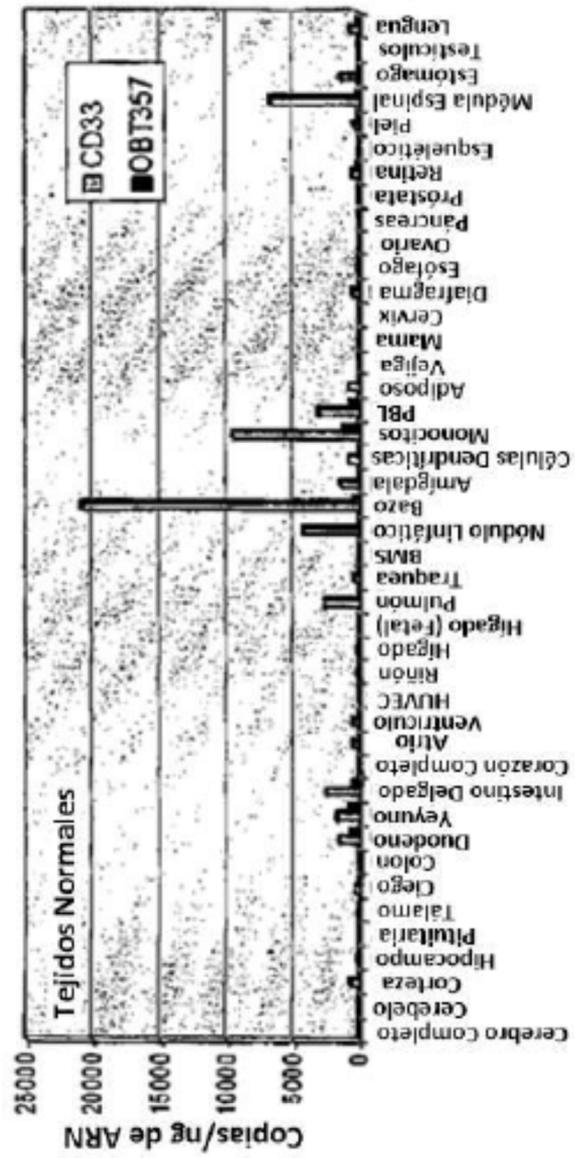


Figura 4A

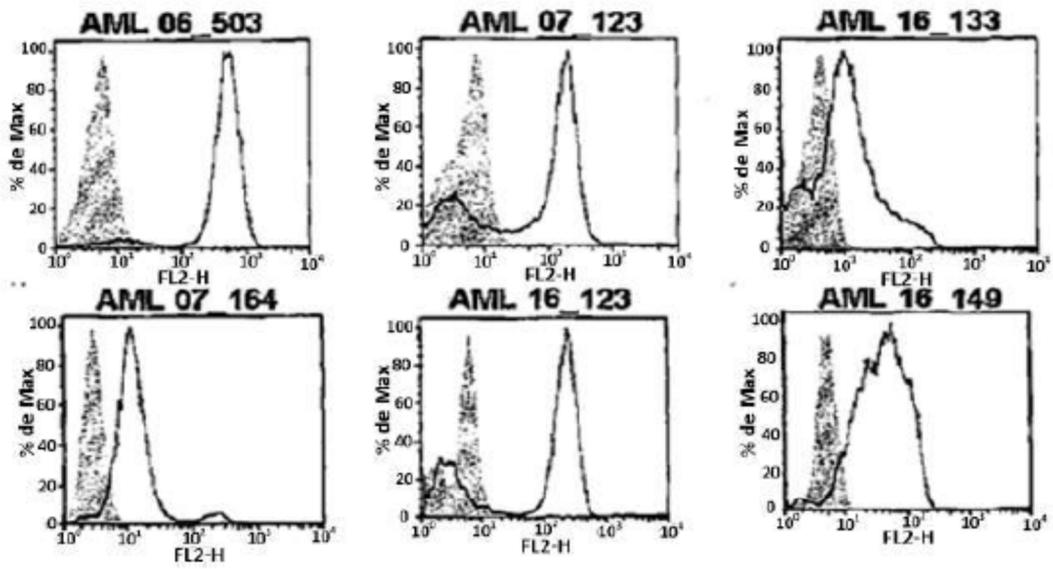
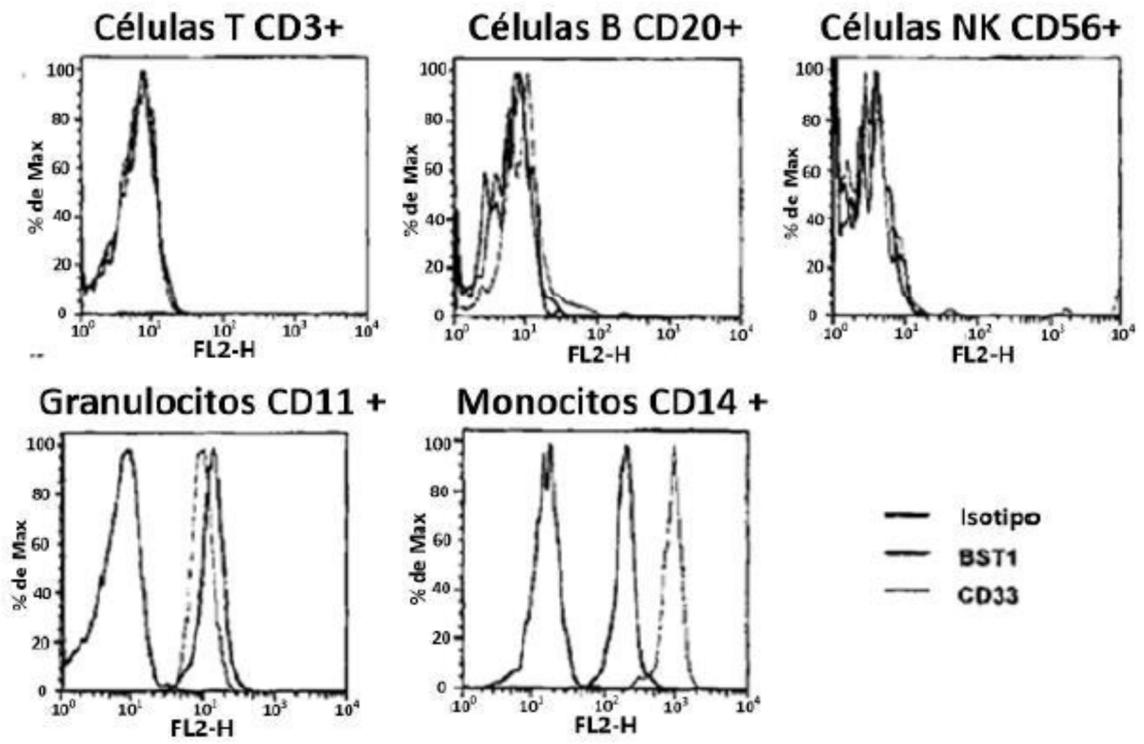
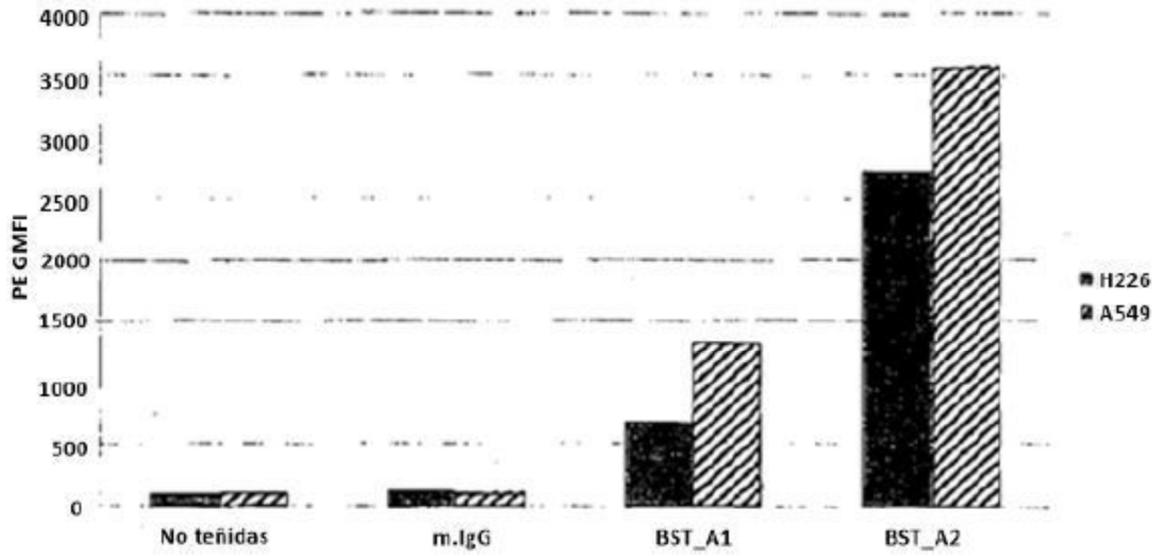


Figura 4B

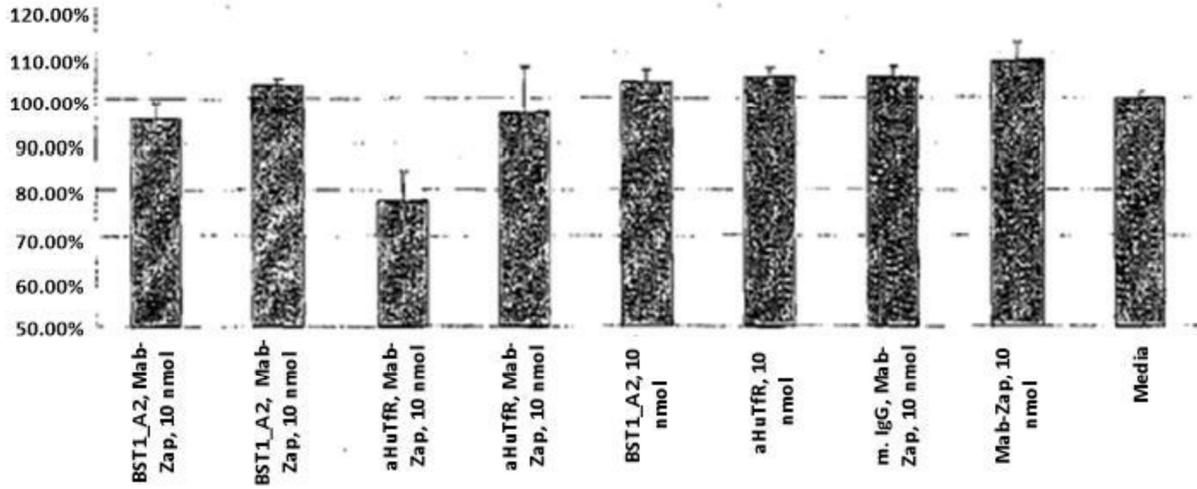


**Figura 4C**  
**FACS: Fabs de BSt1 vs H226, A549**



**Figura 5A**

Internalización: BST1\_A2 vs H226



**Figura 5B**

Internalización:BST\_A2 vs A549

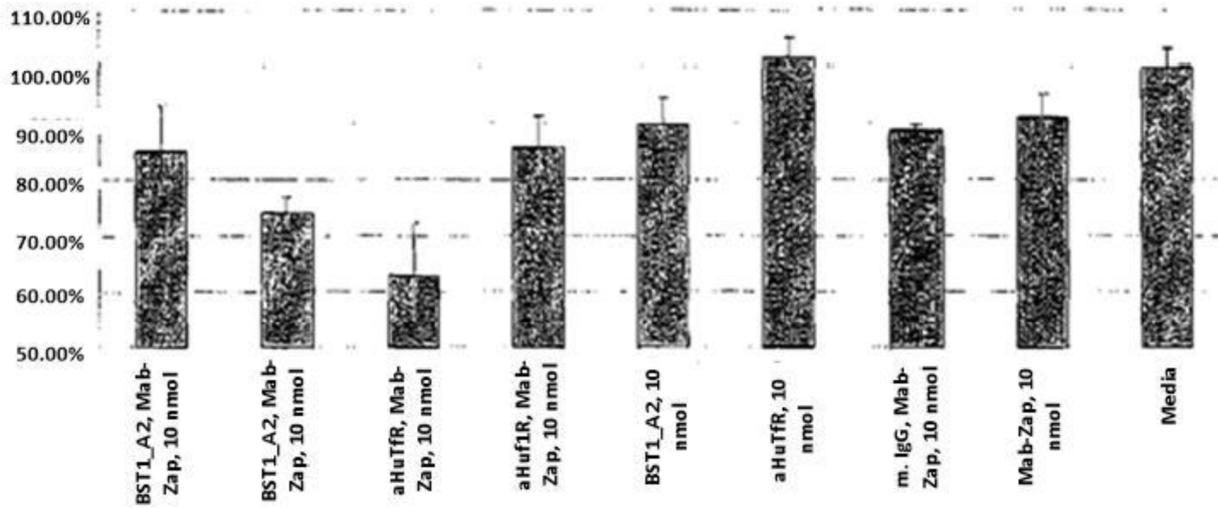


Figura 6A

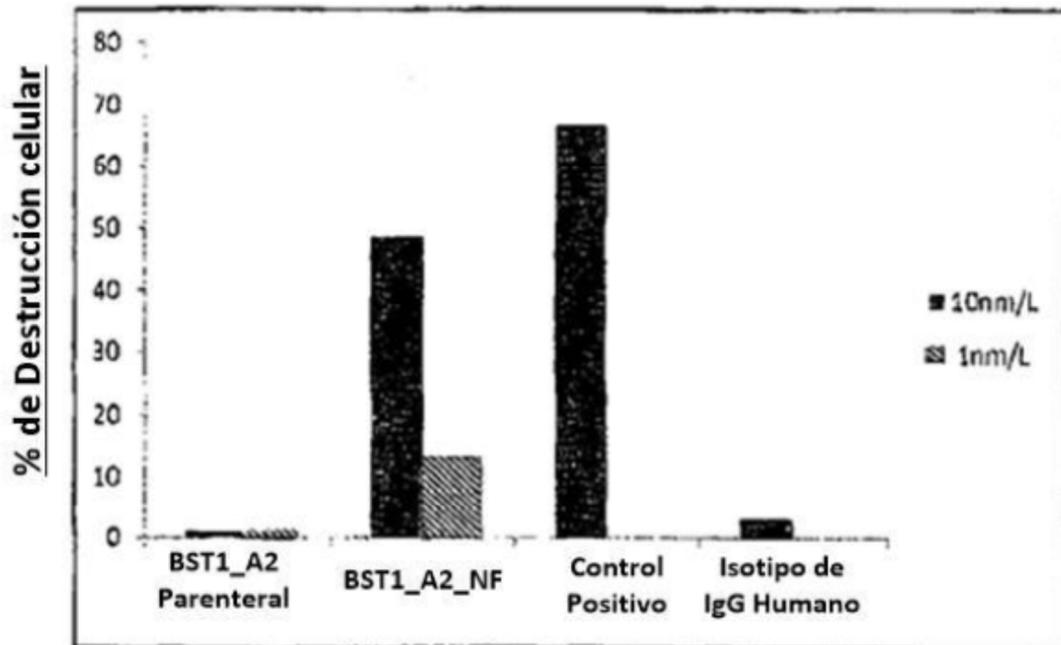


Figura 6B

