

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 457**

51 Int. Cl.:

C07K 16/40 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.10.2011 PCT/IL2011/000835**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.05.2012 WO12056455**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2011 E 11793503 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.06.2018 EP 2632956**

54 Título: **Métodos de generación de anticuerpos contra metaloenzimas**

30 Prioridad:

28.10.2010 US 407501 P

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

02.11.2018

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.
(100.0%)
At the Weizmann Institute of Science, P.O. Box 95
7610002 Rehovot, IL**

72 Inventor/es:

**SAGI, IRIT;
SELA-PASWELL, NETTA y
GROSSMAN, MORAN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 688 457 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos de generación de anticuerpos contra metaloenzimas

La presente invención, en algunas de sus realizaciones, se refiere a métodos de generación de anticuerpos contra MMP-7.

5 Las metaloproteínas de la matriz (MMP) son enzimas clave que participan en la remodelación de la matriz extracelular (ECM). Estas enzimas son capaces de destruir una serie de componentes del tejido conectivo del cartílago articular o de las membranas basales.

La familia de los genes MMP humanos consiste en al menos 28 proteínas estructuralmente relacionadas, que comparten una topología esférica global similar. Cada MMP es segregada como proenzima latente inactiva. El dominio catalítico del zinc está compuesto por aproximadamente 180 aminoácidos, donde la secuencia altamente conservada HE-GH-LGL-H proporciona los tres residuos de histidina (es decir, H) que se unen al ion metálico Zn(2+). El sitio de unión hacia delante del ion zinc catalítico en la proenzima se une a un residuo de cisteína (Morgunova *et al.*, 1999), el cual, tras activación enzimática, se disocia del sitio activo (Van Wart y Birkedal-Hansen, 1990). Como resultado, el sitio de unión hacia delante de las MMP activadas es captado por una molécula de agua, que también se une por uniones de hidrógeno a un residuo glutámico conservado. Este proceso facilita la hidrólisis de un enlace peptídico del sustrato diana con la molécula de agua activada.

MMP-7 (a la que también se hace referencia en la bibliografía como "matrilisina") se expresa en las células epiteliales de tejidos normales y enfermos, y es capaz de digerir una gran serie de proteínas localizadas en la matriz extracelular. Éstas incluyen colágeno IV y X, gelatina, caseína, laminina, agregano, entactina, elastina y versicano. MMP-7 parece desempeñar un papel en la activación de otras proteinasas, tales como el plasminógeno, MMP-1, MMP-2 y MMP-9. Además de su papel en la remodelación del tejido conectivo, se ha visto que MMP-7 se expresa en algunos tumores malignos y puede tener un papel importante en la invasión y la metástasis tumoral. Estructuralmente, MMP-7 es la más pequeña de las MMP y consiste en dos dominios: un prodominio que se escinde tras activación y un dominio catalítico que contiene el sitio de unión del zinc. Varias publicaciones han mostrado que las proteínas MMP, y en particular la MMP-7, se hallan implicadas en cánceres ováricos y otros cánceres, tales como el carcinoma de células renales. También se ha sugerido que es un biomarcador candidato para el cáncer de ovario - véase, por ejemplo, Wang *et al.* (2005), *Int. J. Cancer* 114(1): 19-31; Wang *et al.* (2006), *Int. J. Cancer* 118(4): 879-88; Maurel *et al.* (2007), *Int. J. Cancer* 121(5): 1066-1071, y Sarkissian *et al.* (2008), *Clin. Chem.* 54(3): 574-581.

El ántrax es una enfermedad infecciosa muy letal causada por la bacteria formadora de esporas *Bacillus anthracis*. La distribución deliberada de esporas de ántrax a través del sistema postal de los EE.UU. en 2001 dio lugar a 5 muertes entre los 11 individuos que contrajeron ántrax por inhalación, lo que resalta la gran amenaza impuesta por el uso potencial del ántrax en el terrorismo y la guerra. La letalidad del ántrax inhalatorio se debe principalmente a la acción de las toxinas antrácicas. La bacteria produce tres componentes de toxina; éstos son el antígeno protector (PA), el factor letal (LF) y el factor de edema (EF). El PA junto con el LF forma la toxina letal (LT), y el PA junto con el EF forma la toxina de edema (ET). El PA funciona como un vehículo para mediar en la captación celular del LF y el EF. El LF es una metaloenzima que escinde las quinasas de proteína quinasa activadas por mitógeno (MEK) y puede replicar síntomas de la enfermedad del ántrax cuando se inyecta a animales con el PA. El EF es una adenilato ciclasa dependiente de calcio y calmodulina con un espectro de efectos tóxicos en el huésped. Estas toxinas son los factores de virulencia dominantes para la enfermedad del ántrax.

Actualmente, no existen terapias aprobadas para la enfermedad del ántrax a excepción de antibióticos. El tratamiento con antibióticos, sin embargo, tiene considerables limitaciones. La exposición a la bacteria, seguida de división bacteriana, da lugar a la producción de grandes cantidades de las toxinas antrácicas. Por lo tanto, a menos que se diagnostique la exposición lo suficientemente pronto para un tratamiento antibiótico enérgico, los pacientes sucumbirán a la enfermedad incluso después de matar a todas las bacterias. La vacuna actual aprobada por la Food and Drug Administration de los EE.UU. tampoco es efectiva para proteger a individuos recién infectados, ya que requiere una administración repetida y al menos 4 semanas para el desarrollo de títulos protectores.

Las Solicitudes de Patente Internacional WO2004/087042 y WO2008/102359 enseñan la generación de anticuerpos dirigidos al ion zinc catalítico y a la superficie enzimática de las MMP que se expresan de manera natural en animales.

La Solicitud de Patente Estadounidense N° 20100119520 enseña anticuerpos monoclonales dirigidos contra el factor letal del ántrax.

La Solicitud de Patente Estadounidense N° 20100227335 enseña anticuerpos monoclonales dirigidos contra MMP-7.

WO 2008/103845 se refiere a anticuerpos monoclonales que se unen al factor letal (LF), al factor de edema (EF) y/o al antígeno protector (PA) del ántrax o los neutralizan. Proporciona dichos anticuerpos, fragmentos de dichos anticuerpos que conservan la capacidad de unión a las toxinas del ántrax, anticuerpos totalmente humanos o humanizados que conservan la capacidad de unión a las toxinas del ántrax y composiciones farmacéuticas que incluyen dichos anticuerpos. Proporciona además ácidos nucleicos aislados codificantes de los anticuerpos y células huésped transformadas con ellos. Además, proporciona métodos profilácticos, terapéuticos y diagnósticos que

emplean los anticuerpos y los ácidos nucleicos.

WO 2010/102167 se refiere a composiciones y se proporcionan métodos de diagnóstico del cáncer de ovario en un paciente y de identificación de pacientes con una mayor probabilidad de tener cáncer de ovario. Las composiciones incluyen nuevos anticuerpos monoclonales y variantes y fragmentos de los mismos, que se unen específicamente a MMP-7. También se proporcionan anticuerpos monoclonales que tienen las características de unión de un anticuerpo para MMP-7 y anticuerpos monoclonales que se unen a un epítipo MMP-7 de un anticuerpo descrito. También se describen en la presente memoria líneas celulares de hibridoma que producen un anticuerpo monoclonal MMP-7. Las composiciones encuentran un uso en métodos de diagnóstico, así como en métodos de cribado para la identificación de pacientes que tienen una mayor probabilidad de tener cáncer de ovario. También se proporcionan kits que incluyen uno o más de los anticuerpos monoclonales MMP-7 descritos y para poner en práctica los métodos. También se incluyen polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos para un epítipo MMP-7 de un anticuerpo monoclonal MMP-7 descrito y métodos de utilización de estos polipéptidos en la producción de anticuerpos MMP-7.

WO 2008/102359 se refiere a anticuerpos y composiciones farmacéuticas que los contienen útiles para inhibir la actividad de las metaloproteinas.

WO 2011/092700 se refiere a anticuerpos que reconocen el [2-(2-aminoetilcarbamoil)etoximetil]tris[2-(N-(3-imidazol-1-ilpropil)etoximetil]metano, una molécula de hapteno que imita de cerca la estructura y conformación local del sitio de zinc reactivo en las metaloproteinasas de la matriz. Se describe un anticuerpo que comprende una región de reconocimiento de antígeno que incluye seis secuencias de aminoácidos CDR seleccionadas entre el grupo consistente en las SEQ. ID. N°: 4-15. También se describen sus usos.

E. Smyth describe "el problema de los inhibidores", 2003-10-01, páginas 1-4, en www.nature.com/horizon/proteases/background/pdf/inhibitors.pdf

Shiomi Takayuki *et al.* describen "MT1-MMP y MMP-7 en la invasión y la metástasis de cánceres humanos", Cancer Metastasis Reviews junio-septiembre de 2003, vol. 22, n° 2-3, junio de 2003, páginas 145-152.

Compendio de la invención

La presente invención se refiere a un método de generación de un anticuerpo que inhibe la MMP-7, comprendiendo el método en inmunizar a un sujeto no humano con:

- (i) [2-(2-aminoetilcarbamoil)etoximetil]tris[2-(N-(3-imidazol-1-ilpropil)etoximetil]metano, y
- (ii) MMP-7,

generando así el anticuerpo que inhibe la MMP-7, donde el método no es un método de tratamiento, donde el anticuerpo comprende una región de reconocimiento de antígeno que se une a un sitio catalítico de MMP-7 y [2-(2-aminoetilcarbamoil)etoximetil]tris[2-(N-(3-imidazol-1-ilpropil)etoximetil]metano.

Preferiblemente, dicha inmunización es efectuada inmunizando inicialmente con (i) e inmunizando después con (ii).

Preferiblemente, dicha inmunización es efectuada coinmunizando con (i) y (ii).

La presente invención se refiere a un anticuerpo que comprende una región de reconocimiento de antígeno que se une a un sitio catalítico de MMP-7 y [2-(2-aminoetilcarbamoil)etoximetil]tris[2-(N-(3-imidazol-1-ilpropil)etoximetil]metano, donde el anticuerpo inhibe la actividad de dicha MMP-7 y en donde el Ki del anticuerpo hacia dicha MMP-7 es al menos 5 veces menor que una Ki del anticuerpo hacia MMP2 o MMP9.

Preferiblemente, el anticuerpo está unido a un resto detectable o un resto terapéutico.

Preferiblemente, el anticuerpo es usado para tratar el cáncer.

La presente invención se refiere a un método de diagnóstico del cáncer en un sujeto, consistiendo el método en poner en contacto una muestra del sujeto con el anticuerpo para analizar la expresión de la MMP-7, en donde una regulación al alza de la expresión de dicha MMP-7 es indicativa del cáncer.

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que incluye un anticuerpo.

Breve descripción de los dibujos

Se describen en la presente memoria algunos aspectos de la descripción, meramente a modo de ejemplo, haciendo referencia a los dibujos adjuntos. Haciendo ahora referencia específica a los dibujos con detalle, se subraya que los particulares mostrados son a modo de ejemplo y con fines de discusión ilustrativa de aspectos de la descripción. En este sentido, la descripción junto con los dibujos hace evidente a los expertos en la técnica cómo se pueden llevar a la práctica los aspectos de la descripción.

En los dibujos:

Las FIG. 1A-D ilustran el aislamiento de mAb con reacción cruzada que reconocen tanto a una molécula mimética sintética como a una metaloenzima dependiente de zinc objetivo. A. Reactividad cruzada de los mAb producidos por inmunización contra antígeno mimético-Zn sintético, seguido de MMP-7 humana. Se determinó la afinidad de los anticuerpos del sobrenadante de hibridomas en diferentes diluciones mediante un ELISA de antígeno directo, sobre el que se absorbieron epítipo mimético-Zn sintético, MMP-7 humana o BSA como antígenos. B. Reactividad cruzada de los mAb producidos por inmunización contra antígeno mimético-Zn sintético, seguido de Factor Letal del Ántrax. Se determinó la afinidad de los anticuerpos del sobrenadante de hibridomas en diferentes diluciones mediante un ELISA de antígeno directo, sobre el que se absorbieron epítipo-Zn mimético sintético, Factor Letal del Ántrax o BSA como antígenos. C. Dominio catalítico de la MMP-7 humana mostrado en representación de la estructura secundaria con superficie semitransparente, ion zinc (esfera naranja) y las histidinas del sitio catalítico mostradas como barras (PDB:1MMQ). D. Dominio catalítico del Factor Letal del Ántrax mostrado en representación de la estructura secundaria con superficie semitransparente, ion zinc (esfera naranja) y las histidinas del sitio catalítico y el ácido glutámico mostrados como barras (PDB: 1J7N).

15 Descripción de realizaciones específicas de la invención

La presente descripción, en algunos de sus aspectos, se refiere a métodos de generación de anticuerpos contra metaloenzimas, más concretamente, aunque no exclusivamente, contra MMP-7 y factor letal del ántrax (ALF).

Las metaloproteasas de la matriz participan en muchos procesos biológicos, que van desde la proliferación celular, la diferenciación y la remodelación de la matriz extracelular (ECM) hasta la vascularización y la migración celular. Estos procesos requieren un delicado equilibrio entre las funciones de las metaloproteasas de la matriz (MMP) y sus inhibidores tisulares naturales (TIMP). La pérdida de este equilibrio es la marca distintiva de numerosas afecciones patológicas, incluyendo tumores metastáticos, enfermedades neurodegenerativas y osteoartritis. Se conocen en la técnica numerosos inhibidores MMP, incluyendo inhibidores peptídicos de pequeño tamaño, tales como hidroxomato, tetraciclinas no microbianas y anticuerpos monoclonales.

Los presentes inventores han descubierto previamente que se pueden usar anticuerpos que reconocen determinantes tanto electrónicos como estructurales del sitio catalítico de las metaloenzimas como potentes inhibidores de las mismas. El uso de haptenos que imitan el sitio catalítico unido a metal de las metaloenzimas como inmunógenos permitía generar anticuerpos terapéuticos altamente eficaces que se vio que eran capaces de tratar afecciones clínicas caracterizadas por una elevada actividad de las metaloproteínas (véase WO2004/087042 y WO2008/102359).

Los presentes inventores han mostrado ahora que la inmunización tanto con los haptenos miméticos descritos anteriormente en la presente memoria como con la propia metaloenzima permite la generación de anticuerpos altamente selectivos (metalocuerpos).

Los presentes inventores demostraron que es factible este enfoque de inmunización inmunizando con a) Imisdp como hapteno mimético y MMP-7 como metaloenzima y b) Imisdp como hapteno mimético y factor letal del ántrax como metaloenzima. Se produjeron anticuerpos dirigidos hacia MMP-7 o hacia el factor letal del ántrax (ALF) - véanse las Figuras 1A-D.

Estos resultados demuestran la generalidad del presente enfoque de inmunización y la factibilidad de producir metalocuerpos dirigidos a una metaloenzima seleccionada.

Por lo tanto, según un aspecto de la presente descripción, se proporciona un método de generación de un anticuerpo (o de un fragmento del mismo) que inhibe a una metaloenzima, comprendiendo el método la inmunización de un sujeto con:

(i) un compuesto mimético de zinc sintético que tiene propiedades estructurales y electrónicas similares a un dominio catalítico de la metaloenzima, y

(ii) la metaloenzima,

generando así el anticuerpo que inhibe a la metaloenzima.

Como ejemplos de metaloenzimas que pueden ser inhibidas usando las enseñanzas de la presente descripción, se incluyen, aunque sin limitación, colagenasa de neutrófilos, colagenasa-3, gelatinasa A, gelatinasa B, estromelisin-2 y 3, matrilisina, elastasa de macrófagos, MMP de tipo membrana, agreganasa, convertasas de citoquinas, "enzimas diseminadoras" de moléculas de adhesión, enzima convertora de endotelina, enzima convertora de angiotensina, endopeptidasa neutra, FTSH - metaloproteasa bacteriana, metalolactamasa (carbapenasas), toxinas bacterianas, por ej., factor letal del ántrax, toxinas del tétanos o del botulismo, ras farnesil proteína transferasa, anhidrasa carbónica y similares. Se describen otros ejemplos de metaloenzimas en Hodgson, *Bio/Technology*, 13: 554 (1995); Gordon *et al.*, *Clin. Exper. Rheum.*, 11(8): S91-S94 (1993); Ray *et al.*, *Eur. Respir. J.*, 7: 2062-2072 (1994); O'Connor *et al.*, *Thorax*, 49: 602-609 (1994); Docherty *et al.*, *Tibtech*, Vol. 10 (1992); Newby *et al.*, *Basic Res. Cardiol.*, 89 (Supl.): 59-70; Freije *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269(24): 16766-16773 (1994); Shapiro *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 268(32): 23824-23829 (1993);

Belaaouaj *et al.*, J. Biol. Chem., 27(24): 14568-14575 (1995); Gearing *et al.*, Letters to Nature, Nature, 370: 555-557 (1994); McGeehan *et al.*, Letters to Nature, Nature, 370: 558-561 (1994); Mohler *et al.*, Letters to Nature, Nature, 370: 218-220 (1994); Sato *et al.*, Letters to Nature, Nature, 370: 61-65 (1994); Crowe *et al.*, J. Exp. Med., 181: 1205-1210 (1995); Payne, J. Med. Microbiol., 32: 93-99 (1993); Deshpande *et al.*, Toxicol., 33(4): 551-557 (1995); DePhillips *et al.*, Eur. J. Biochem., 229: 61-69 (1995).

Según un aspecto, la metaloenzima no es expresada de manera natural por el sujeto (o se expresa a bajos niveles). Dichas metaloenzimas incluyen MMP-7 y toxinas bacterianas (por ej., factor letal del ántrax).

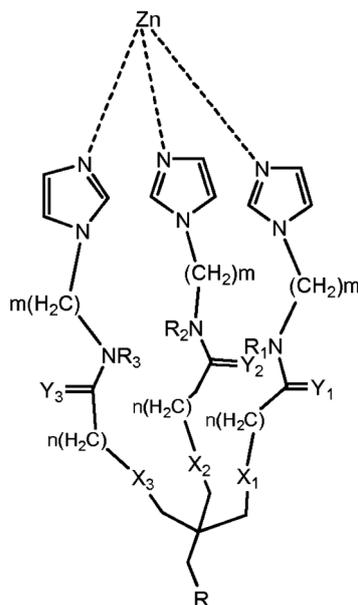
Los compuestos miméticos de zinc sintéticos que tienen propiedades estructurales y electrónicas similares a un dominio catalítico de la metaloenzima son típicamente compuestos que tienen iones metálicos quelados. El ion metálico es típicamente zinc o sus iones análogos cobalto o cadmio.

Según un aspecto, el quelante es porfirina.

El compuesto mimético de zinc puede ser seleccionado en base a las propiedades estructurales y electrónicas del dominio catalítico real en el polipéptido diana. Típicamente, el polipéptido diana incluye 3 aminoácidos que proporcionan tres puntos de contacto necesarios para la coordinación de metales de transición. Las geometrías de los complejos de coordinación representativos pueden ser tetraédricas, planas cuadradas o trigonales dependiendo del ion metálico de transición. En general, las composiciones miméticas de la presente descripción son seleccionadas en base a la estructura de la cadena lateral de aminoácidos y a la geometría de la coordinación. Típicamente, los aminoácidos que pueden coordinar la unión de metales de transición son histidina, arginina, glutamato, cisteína, metionina, triptófano, serina, treonina y tirosina, siendo preferibles los dos primeros.

Se describen ejemplos de compuestos miméticos de zinc sintéticos en WO2004/087042 y WO2008/102359.

Según una realización, el compuesto mimético de zinc sintético tiene la fórmula general (I):



donde:

m y n son cada uno independientemente un número entero de 1 a 6;

X_1 - X_3 e Y_1 - Y_3 son cada uno independientemente O o S;

R_1 - R_3 son cada uno independientemente seleccionados entre el grupo consistente en hidrógeno, alquilo y cicloalquilo, y

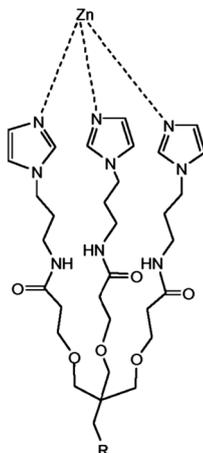
R es $(\text{CH}_2)_x\text{-C(=O)NR}'\text{-(CH}_2)_y\text{-NR}''$,

mientras que:

x e y son cada uno independientemente un número entero de 1 a 6 y

R' y R'' son cada uno independientemente seleccionados entre el grupo consistente en hidrógeno, alquilo y cicloalquilo.

Según un aspecto preferido de este aspecto de la presente descripción, el compuesto es [2-(2-aminoetilcarbamoyl)etoximetil]tris[2-(N-(3-imidazol-1-ilpropil))etoximetil]metano, denominado Imisdp, que tiene la fórmula general (II):



5 donde R = $-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$.

Como se ha mencionado, el método de la presente descripción es llevado a cabo inmunizando tanto con el compuesto mimético de zinc antes descrito en la presente memoria como con la propia metaloenzima.

La presente descripción contempla la inmunización con la metaloenzima de longitud total o porciones de la misma. Típicamente, la porción debe contener un determinante antigénico (es decir, epítopo) que sea específico para esa metaloenzima en particular.

Según un aspecto, el determinante antigénico está sobre la superficie de la metaloenzima.

La metaloenzima usada para la inmunización puede ser purificada a partir de su ambiente *in vivo* o, de manera alternativa, puede ser generada por medios recombinantes.

Según un aspecto, el procedimiento de inmunización comprende la inmunización inicial con el compuesto mimético de zinc y la inmunización posterior (por ej., de tres a doce semanas después) con la metaloenzima. Se puede determinar el momento exacto de la inmunización comprobando para ver si hay presencia de una respuesta inmune en el animal inmunizado (por ej., ratón). Por ejemplo, se puede analizar el título de anticuerpos en el suero.

Según otro aspecto, el procedimiento de inmunización comprende la inmunización inicial con la metaloenzima y la inmunización posterior (por ej., de tres a doce semanas después) con el compuesto mimético de zinc.

Según aún otro aspecto, el procedimiento de inmunización comprende la coinmunización tanto con la metaloenzima como con el compuesto mimético de zinc.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo" se refiere a una molécula de anticuerpo intacta, y la frase "fragmento de anticuerpo" se refiere a un fragmento funcional de la misma, tal como Fab, $\text{F}(\text{ab}')_2$ y Fv, que son capaces de unirse a macrófagos. Estos fragmentos funcionales de anticuerpos se definen como sigue: (i) Fab, el fragmento que contiene un fragmento de unión a antígeno monovalente de una molécula de anticuerpo, puede ser producido por digestión de un anticuerpo completo con la enzima papaína para producir una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada; (ii) Fab', el fragmento de una molécula de anticuerpo que puede ser obtenido tratando un anticuerpo completo con pepsina, seguido de reducción, para obtener una cadena ligera intacta y una porción de la cadena pesada; se obtienen dos fragmentos Fab' por molécula de anticuerpo; (iii) $(\text{Fab}')_2$, el fragmento del anticuerpo que puede ser obtenido tratando el anticuerpo completo con la enzima pepsina sin posterior reducción; $\text{F}(\text{ab}')_2$ es un dímero de dos fragmentos Fab' que se mantienen juntos por dos enlaces disulfuro; (iv) Fv, definido como un fragmento obtenido por ingeniería genética que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada expresadas como dos cadenas; (v) anticuerpo de una sola cadena ("SCA"), una molécula obtenida por ingeniería genética que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada, unidas por un conector polipeptídico adecuado como una molécula de una sola cadena genéticamente fusionada; y (vi) péptidos codificantes de una única región determinante de complementariedad (CDR).

Se conocen bien en la técnica los métodos de generación de anticuerpos (es decir, monoclonales y policlonales). Se pueden generar anticuerpos mediante cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica, pudiendo estos métodos emplear la inducción de la producción *in vivo* de moléculas de anticuerpos, el cribado de bibliotecas de inmunoglobulinas o paneles de reactivos de unión altamente específica como se describe [Orlandi D.R. *et al.* (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 3833-3837; Winter G. *et al.* (1991), Nature 349: 293-299] o la generación de moléculas de

anticuerpos monoclonales por líneas celulares continuas en cultivo. Éstos incluyen, aunque sin limitación, la técnica de los hibridomas, la técnica de los hibridomas de células B humanas y la técnica de los hibridomas de Virus Epstein-Barr (EBV) [Kohler G. *et al.* (1975), *Nature* 256: 495-497; Kozbor D. *et al.* (1985), *J. Immunol. Methods* 81: 31-42; Cote R.J. *et al.* (1983), *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 2026-2030; Cole S.P. *et al.* (1984), *Mol. Cell. Biol.* 62: 109-120].

5 En casos en los que los compuestos de la descripción son demasiado pequeños como para provocar una fuerte respuesta inmunogénica, dichos antígenos (haptenos) pueden ser copulados a vehículos antigénicamente neutros, tales como vehículos de hemocianina de lapa californiana (KLH) o de seroalbúmina [por ej., seroalbúmina bovina (BSA)] (véanse las Pat. Estadounidenses N° 5.189.178 y N° 5.239.078 y los Ejemplos 2 de la sección de Ejemplos).
 10 Se puede efectuar la copulación a un vehículo usando métodos bien conocidos en la técnica; por ejemplo, se puede efectuar la copulación directa a grupos amino y seguir eventualmente con reducción de la unión imino formada. De manera alternativa, se puede copular el vehículo usando agentes condensantes, tales como diciclohexilcarbodiimida u otros agentes deshidratantes de carbodiimida. También se pueden usar compuestos conectores para efectuar la copulación; se dispone de conectores tanto homobifuncionales como heterobifuncionales de Pierce Chemical Company, Rockford, Ill. Se puede inyectar entonces el complejo inmunogénico resultante en sujetos mamíferos
 15 adecuados, tales como ratones, conejos y similares. Los protocolos adecuados conllevan la inyección repetida del inmunógeno en presencia de adyuvantes según un esquema que refuerza la producción de anticuerpos en el suero. Los títulos del suero inmune pueden ser fácilmente medidos usando procedimientos de inmunoensayo, que son bien conocidos en la técnica.

Los antisueros obtenidos pueden ser directamente usados, o se pueden obtener anticuerpos monoclonales como se ha descrito anteriormente en la presente memoria.

Se pueden obtener fragmentos de anticuerpos usando métodos bien conocidos en la técnica. (Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988). Por ejemplo, se pueden preparar fragmentos de anticuerpos según la presente descripción por hidrólisis proteolítica del anticuerpo o por expresión en *E. coli* o en células de mamíferos (por ej., cultivo de células de ovario de hámster chino u otros
 25 sistemas de expresión de proteínas) de ADN codificante del fragmento.

De manera alternativa, se pueden obtener fragmentos de anticuerpos por digestión con pepsina o papaína de anticuerpos enteros por métodos convencionales. Por ejemplo, se pueden producir fragmentos de anticuerpos por escisión enzimática de anticuerpos con pepsina, para obtener un fragmento 5S denominado F(ab')₂. Este fragmento puede ser luego escindido usando un agente reductor de tiol, y eventualmente un grupo bloqueante para los grupos
 30 sulfhidrilo resultantes de la escisión de uniones disulfuro, para producir fragmentos monovalentes Fab' 3,5S. De manera alternativa, una escisión enzimática usando pepsina produce dos fragmentos Fab' monovalentes y un fragmento Fc directamente. Estos métodos son descritos, por ejemplo, por Goldenberg, Pat. Estadounidenses N° 4.036.945 y N° 4.331.647, y las referencias en ellas contenidas. Véase también Porter, R.R., *Biochem. J.*, 73: 119-126, 1959. También se pueden usar otros métodos de escisión de anticuerpos, tales como la separación de las
 35 cadenas pesadas para formar fragmentos de cadenas ligeras-pesadas monovalentes, una mayor escisión de fragmentos u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas, siempre que los fragmentos se unan al antígeno reconocido por el anticuerpo intacto.

Los fragmentos Fv comprenden una asociación de cadenas V_H y V_L. Esta asociación puede ser monovalente, como describen Inbar *et al.*, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 69: 2659-62, 1972. De manera alternativa, las cadenas variables pueden unirse por un enlace disulfuro intermolecular o entrecruzarse por agentes químicos, tales como el
 40 glutaraldehído. Preferiblemente, los fragmentos Fv comprenden cadenas V_H y V_L conectadas por un conector peptídico. Estas proteínas de unión a antígeno de cadena sencilla (sFv) son preparadas construyendo un gen estructural que comprende secuencias de ADN codificantes de los dominios V_H y V_L conectados por un oligonucleótido. Se inserta el gen estructural en un vector de expresión, que se introduce a continuación en una célula huésped, tal como *E. coli*. Las células huésped recombinantes sintetizan una única cadena polipeptídica con un péptido conector que une los dos dominios V. Se describen métodos para producir sFv, por ejemplo, en Whitlow y Filpula, *Methods*, 2:
 45 97-105, 1991; Bird *et al.*, *Science* 242: 423-426, 1988; Pack *et al.*, *Bio/Technology* 11: 1271-77, 1993; y Ladner *et al.*, Pat. Estadounidense N° 4.946.778.

Se pueden obtener péptidos CDR ("unidades de reconocimiento mínimas") construyendo genes codificantes de la CDR de un anticuerpo de interés. Dichos genes son preparados, por ejemplo, usando la reacción en cadena de polimerasa para sintetizar la región variable a partir de ARN de células productoras de anticuerpos. Véase, por ejemplo, Larrick y Fry, *Methods*, 2: 106-10, 1991.

Se apreciará que, para terapia o diagnóstico en humanos, se usan preferiblemente anticuerpos humanizados. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ej., murinos) son moléculas quiméricas de inmunoglobulinas, cadenas de inmunoglobulinas o sus fragmentos (tales como Fv, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de anticuerpos de
 55 unión a antígeno) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que se substituyen residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata o conejo, que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, se substituyen residuos del marco Fv de la inmunoglobulina humana por residuos no humanos
 60

correspondientes. Los anticuerpos humanizados pueden comprender también residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en la CDR importada o las secuencias de marco. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en donde todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también incluirá de manera óptima al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana [Jones *et al.*, *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332: 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992)].

Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la técnica. En general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él a partir de una fuente no humana. Con frecuencia, se hace referencia a estos residuos de aminoácidos no humanos como residuos importados, los cuales son típicamente tomados de un dominio variable de importación. La humanización puede ser esencialmente realizada siguiendo el método de Winter y colaboradores [Jones *et al.*, *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239: 1534-1536 (1988)], substituyendo con CDR o secuencias de CDR de roedores las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos (Pat. Estadounidense N° 4.816.567), donde se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto por la correspondiente secuencia de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que se han sustituido algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

También se pueden producir anticuerpos humanos usando diversas técnicas conocidas en este campo, incluyendo bibliotecas de presentación en fagos [Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581 (1991)]. También se dispone de las técnicas de Cole *et al.* y Boerner *et al.* para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos (Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985), y Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147(1): 86-95 (1991)]. De forma similar, se pueden producir anticuerpos humanos introduciendo loci de inmunoglobulinas humanas en animales transgénicos, por ej., ratones, en los que se han inactivado parcial o completamente los genes de inmunoglobulinas endógenos. Tras inoculación, se observa producción de anticuerpos humanos, la cual se parece mucho a la observada en humanos en todos los sentidos, incluyendo la redistribución de genes, el montaje y el repertorio de anticuerpos. Se describe este enfoque, por ejemplo, en las Pat. Estadounidenses N° 5.545.807, N° 5.545.806, N° 5.569.825, N° 5.625.126, N° 5.633.425 y N° 5.661.016 y en las siguientes publicaciones científicas: Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10, 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368 (812-13 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnology* 14, 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996); Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

Una vez obtenidos los anticuerpos, se pueden estudiar en cuanto a actividad inhibitoria de metaloenzimas y afinidad. Se describen las condiciones de ensayo apropiadas para la actividad de inhibición de metaloproteínas en Knight *et al.*, *FEBS Letters* 296(3): 263-266 (1992); Cawston *et al.*, *Anal. Biochem.*, 99: 340-345 (1979); Cawston *et al.*, *Methods in Enzymology* 80: 771 y sig. (1981); Cawston *et al.*, *Biochem. J.*, 195: 159-165 (1981); Weingarten *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 139: 1184-1187 (1984), y Pat. Estadounidenses N° 4.743.587 y N° 5.240.958.

Como se ha mencionado, usando la metodología anterior, los presentes inventores pudieron producir un anticuerpo que reconocía el factor letal del ántrax (ALF) y un anticuerpo adicional que reconocía MMP-7.

Por lo tanto, según otro aspecto de la presente descripción, se proporciona un anticuerpo que comprende una región de reconocimiento de antígeno que se une a un sitio catalítico del factor letal del ántrax (ALF), donde el anticuerpo inhibe la actividad del ALF.

Según aún otro aspecto de la presente descripción, se proporciona un anticuerpo que comprende una región de reconocimiento de antígeno que se une a un sitio catalítico de MMP-7, donde el anticuerpo inhibe la actividad de la MMP-7.

Los anticuerpos de este aspecto de la presente descripción tienen típicamente una afinidad de unión y una especificidad muy altas hacia MMP-7, con una CE₅₀ de aproximadamente 1-500 nM, más típicamente de aproximadamente 1-250 nM, más típicamente de aproximadamente 1-100 nM e incluso más típicamente de aproximadamente 1-50 nM. Los anticuerpos de este aspecto de la presente descripción exhiben típicamente un patrón de inhibición de una unión estrecha hacia MMP-7 (K_i = 1-500 nM y más preferiblemente 50-200 nM), siendo la K_i al menos 2 veces, al menos 5 veces o incluso al menos 10 veces inferior a la K_i del anticuerpo hacia otras MMP, tales como MMP2, MMP9 o MMP14.

El anticuerpo puede unirse a los iones de coordinación de metales del sitio catalítico y no al propio ion metálico, o, de manera alternativa, el anticuerpo puede unirse tanto al ion metálico como a sus iones de coordinación presentes en el bolsillo del sitio activo.

Según otro aspecto de la presente descripción, se proporciona un anticuerpo monoclonal producido a partir de las líneas celulares de hibridomas ejemplificadas en el Ejemplo 1 que se mostrará a continuación en la presente memoria.

La presente descripción también proporciona cualquier secuencia (poli)peptídica que comprenda al menos una de las

secuencias CDR de estos anticuerpos, así como sus homólogos y fragmentos, siempre que se conserve su actividad inhibitoria de metaloenzimas (inhibición específica de la actividad catalítica de la metaloproteína). Un ejemplo de tal polipéptido es un anticuerpo (véase lo que antecede).

5 El término "polipéptido", tal como se usa en la presente memoria, abarca péptidos nativos (ya sean productos de degradación, péptidos sintéticamente sintetizados o péptidos recombinantes) y peptidomiméticos (típicamente, péptidos sintéticamente sintetizados), así como peptoides y semipeptoides, que son análogos peptídicos y que pueden tener, por ejemplo, modificaciones que hagan que los péptidos sean más estables mientras se encuentran en un organismo o más capaces de penetrar en las células. Dichas modificaciones incluyen, aunque sin limitación, modificación del extremo N, modificación del extremo C, modificación del enlace peptídico, incluyendo, aunque sin limitación, CH₂-NH, CH₂-S, CH₂-S=O, O=C-NH, CH₂-O, CH₂-CH₂, S=C-NH, CH=CH o CF=CH, modificaciones del esqueleto y modificación de residuos. Los métodos para preparar compuestos peptidomiméticos son bien conocidos en la técnica y se especifican, por ejemplo, en Quantitative Drug Design, C.A. Ramsden Gd., Capítulo 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992). A continuación, se dan más detalles a este respecto en la presente memoria.

15 Los enlaces peptídicos (-CO-NH-) en el péptido pueden ser sustituidos, por ejemplo, por enlaces N-metilados (-N(CH₃)-CO-), enlaces éster (-C(R)H-C-O-O-C(R)-N-), enlaces cetometileno (-CO-CH₂-), enlaces α -aza (-NH-N(R)-CO-), donde R es cualquier alquilo, por ej., metilo, enlaces carba (-CH₂-NH-), enlaces hidroxietileno (-CH(OH)-CH₂-), enlaces tioamida (-CS-NH-), dobles enlaces olefínicos (-CH=CH-), enlaces retroamida (-NH-CO-), derivados peptídicos (-N(R)-CH₂-CO-), donde R es la cadena lateral "normal", que se presenta de forma natural sobre el átomo de carbono.

20 Estas modificaciones pueden producirse en cualquiera de los enlaces a lo largo de la cadena peptídica e incluso en varios (2-3) al mismo tiempo.

Los aminoácidos aromáticos naturales, Trp, Tyr y Phe, pueden sustituirse por ácidos no naturales sintéticos, tales como fenilglicina, Tic, naftilalanina (Nal), fenilisoserina, treoninol, derivados metilados en el anillo de Phe, derivados halogenados de Phe u o-metil-Tyr.

25 Además de lo anterior, los péptidos de la presente descripción pueden también incluir uno o más aminoácidos modificados o uno o más monómeros no aminoácidos (por ej., ácidos grasos, carbohidratos complejos, etc.).

30 Tal como se usa aquí en la memoria y en la sección de reivindicaciones más adelante, se entiende que el término "aminoácido" o "aminoácidos" incluye los 20 aminoácidos naturales; los aminoácidos frecuentemente modificados después de la traducción *in vivo*, incluyendo, por ejemplo, hidroxiprolina, fosfoserina y fosfotreonina; y otros aminoácidos no habituales, incluyendo, aunque sin limitación, ácido 2-aminoadípico, hidroxilisina, isodesmosina, norvalina, norleucina y ornitina. Además, el término "aminoácido" incluye tanto D- como L-aminoácidos.

Las Tablas 1 y 2 siguientes enumeran los aminoácidos naturales (Tabla 1) y aminoácidos no convencionales o modificados (por ej., sintéticos, Tabla 2) que pueden ser usados en la presente descripción.

Tabla 1

Aminoácido	Abreviatura de tres letras	Símbolo de una letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparaguina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutámico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V
Cualquier aminoácido como los anteriores	Xaa	X

Tabla 2

Aminoácido no convencional	Código	Aminoácido no convencional	Código
Ácido α -aminobutírico	Abu	L-N-metilalanina	Nmala
α -Amino- α -metilbutirato	Mgab	L-N-metilarginina	Nmarg
Aminociclopropano- Carboxilato	Cpro	L-N-metilasparraguina	Nmasn
Ácido aminoisobutírico	Aib	Ácido L-N-metilaspártico	Nmasp
Aminonorbornil- Carboxilato	Norb	L-N-metilcisteína	Nmcys
Ciclohexilalanina	Chexa	L-N-metilglutamina	Nmgin
Ciclopentilalanina	Cpen	Ácido L-N-metilglutámico	Nmglu
D-alanina	Dal	L-N-metilhistidina	Nmhis
D-arginina	Darg	L-N-metilisoleucina	Nmile
Ácido D-aspártico	Dasp	L-N-metilleucina	Nmleu
D-cisteína	Dcys	L-N-metilisina	Nmlys
D-glutamina	Dgln	L-N-metilmetionina	Nmmet
Ácido D-glutámico	Dglu	L-N-metilnorleucina	Nmnle
D-histidina	Dhis	L-N-metilnorvalina	Nmnva
D-isoleucina	Dile	L-N-metilornitina	Nmorn
D-leucina	Dleu	L-N-metilfenilalanina	Nmphe
D-lisina	Dlys	L-N-metilprolina	Nmpro
D-metionina	Dmet	L-N-metilserina	Nmser
D-ornitina	Dorn	L-N-metiltreonina	Nmthr
D-fenilalanina	Dphe	L-N-metiltryptófano	Nmtrp
D-prolina	Dpro	L-N-metil tirosina	Nmtyr
D-serina	Dser	L-N-metilvalina	Nmval
D-treonina	Dthr	L-N-metiletilglicina	Nmetg
D-tryptófano	Dtrp	L-N-metil-t-butilglicina	Nmtbug
D-tirosina	Dtyr	L-norleucina	Nle
D-valina	Dval	L-norvalina	Nva
D- α -metilalanina	Dmala	α -metilaminoisobutirato	Maib
D- α -metilarginina	Dmarg	α -metil- γ -aminobutirato	Mgab
D- α -metilasparaguina	Dmasn	α -metilciclohexilalanina	Mchexa
D- α -metilaspartato	Dmasp	α -metilciclopentilalanina	Mcpen
D- α -metilcisteína	Cmcys	α -metil- α -naftilalanina	Manap
D- α -metilglutamina	Dmgln	α -metilpenicilamina	Mpen
D- α -metilhistidina	Dmhis	N-(4-aminobutil)glicina	Nglu
D- α -metilisoleucina	Dmile	N-(2-aminoetil)glicina	Naeg
D- α -metilleucina	Dmleu	N-(3-aminopropil)glicina	Norn
D- α -metilisina	Dmlys	N-amino- α -metilbutirato	Mmaabu
D- α -metilmetionina	Dmmet	α -naftilalanina	Anap
D- α -metilornitina	Dmorn	N-bencilglicina	Nphe
D- α -metilfenilalanina	Dmphe	N-(2-carbamiletil)glicina	Ngln
D- α -metilprolina	Dmpro	N-(carbamilmetil)glicina	Nasn
D- α -metilserina	Dmser	N-(2-carboxietil)glicina	Nglu
D- α -metiltreonina	Dmthr	N-(carboximetil)glicina	Nasp
D- α -metiltryptófano	Dmtrp	N-ciclobutilglicina	Ncbut
D- α -metiltirosina	Dmtyr	N-cicloheptilglicina	Nchep
D- α -metilvalina	Dmval	N-ciclohexilglicina	Nchex
D- α -metilalanina	Dnmala	N-ciclododecilglicina	Ncdec
D- α -metilarginina	Dnmarg	N-ciclododecilglicina	Ncdod
D- α -metilasparaguina	Dnmasn	N-ciclooctilglicina	Ncoct
D- α -metilaspartato	Dnmasp	N-ciclopropilglicina	Ncpro
D- α -metilcisteína	Dnmcys	N-cicoundecilglicina	Ncund
D-N-metilleucina	Dnmleu	N-(2,2-difeniletil)glicina	Nbhm
D-N-metilisina	Dnmlys	N-(3,3-difenilpropil)glicina	Nbhe
N-metilciclohexilalanina	Nmchexa	N-(3-indoliletal)glicina	Nhtrp
D-N-metilornitina	Dnmorn	N-metil- γ -aminobutirato	Nmgabu
N-metilglicina	Nala	D-N-metilmetionina	Dnmmet
N-metilaminoisobutirato	Nmaib	N-metilciclopentilalanina	Nmcpen
		D-N-metilfenilalanina	Dnmphe
		D-N-metilprolina	Dnmpro

N-(1-metilpropil)glicina	Nile	D-N-metilserina	Dnmser
N-(2-metilpropil)glicina	Nile	D-N-metilserina	Dnmser
N-(2-metilpropil)glicina	Nleu	D-N-metiltreonina	Dnmthr
D-N-metilriptófano	Dnmtrp	N-(1-metiletil)glicina	Nva
D-N-metilrosina	Dnmtyr	N-metil- α -naftilalanina	Nmanap
D-N-metilvalina	Dnmval	N-metilpenicilamina	Nmpen
Ácido γ -aminobutírico	Gabu	N-(p -hidroxifenil)glicina	Nhtyr
L- <i>t</i> -butilglicina	Tbug	N-(tiometil)glicina	Ncys
L-etilglicina	Etg	Penicilamina	Pen
L-homofenilalanina	Hphe	L- α -metilalanina	Mala
L- α -metilarginina	Marg	L- α -metilasparraguina	Masn
L- α -metilaspártato	Masp	L- α -metil- <i>t</i> -butilglicina	Mtbug
L- α -metilcisteína	Mcys	L-metiletilglicina	Metg
L- α -metilglutamina	Mgln	L- α -metilglutamato	Mglu
L- α -metilhistidina	Mhis	L- α -metilhomofenilalanina	Mhphe
L- α -metilsoleucina	Mile	N-(2-metiltoetil)glicina	Nmet
D-N-metilglutamina	Dnmgln	N-(3-guanidinopropil)glicina	Narg
D-N-metilglutamato	Dnmglu	N-(1-hidroxietil)glicina	Nthr
D-N-metilhistidina	Dnmhis	N-(hidroxietil)glicina	Nser
D-N-metilsoleucina	Dnmile	N-(imidazoliletal)glicina	Nhis
D-N-metilleucina	Dnmleu	N-(3-indoliletal)glicina	Nhtrp
D-N-metilisina	Dnmlys	N-metil- γ -aminobutirato	Nmgabu
N-metilciclohexilalanina	Nmchexa	D-N-metilmetionina	Dnmmt
D-N-metilornitina	Dnmorn	N-metilciclopentilalanina	Nmcpen
N-metilglicina	Nala	D-N-metilfenilalanina	Dnmphe
N-metilaminoisobutirato	Nmaib	D-N-metilprolina	Dnmpro
N-(1-metilpropil)glicina	Nile	D-N-metilserina	Dnmser
N-(2-metilpropil)glicina	Nleu	D-N-metiltreonina	Dnmthr
D-N-metilriptófano	Dnmtrp	N-(1-metiletil)glicina	Nval
D-N-metilrosina	Dnmtyr	N-metil- α -naftilalanina	Nmanap
D-N-metilvalina	Dnmval	N-metilpenicilamina	Nmpen
Ácido γ -aminobutírico	Gabu	N-(p -hidroxifenil)glicina	Nhtyr
L- <i>t</i> -butilglicina	Tbug	N-(tiometil)glicina	Ncys
L-etilglicina	Etg	Penicilamina	Pen
L-homofenilalanina	Hphe	L- α -metilalanina	Mala
L- α -metilarginina	Marg	L- α -metilasparraguina	Masn
L- α -metilaspártato	Masp	L- α -metil- <i>t</i> -butilglicina	Mtbug
L- α -metilcisteína	Mcys	L-metiletilglicina	Metg
L- α -metilglutamina	Mgln	L- α -metilglutamato	Mglu
L- α -metilhistidina	Mhis	L- α -metilhomofenilalanina	Mhphe
L- α -metilsoleucina	Mile	N-(2-metiltoetil)glicina	Nmet
L- α -metilleucina	Mleu	L- α -metilisina	Mlys
L- α -metilmetionina	Nmet	L- α -metilnorleucina	Mnle
L- α -metilnorvalina	Mnva	L- α -metilornitina	Morn
L- α -metilfenilalanina	Mphe	L- α -metilprolina	Mpro
L- α -metilserina	Mser	L- α -metiltreonina	Mthr
L- α -metilvalina	Mtrp	L- α -metilrosina	Mtyr
L- α -metilleucina	Mval Nnbhm	L-N-metilhomofenilalanina	Nmhphe
N-(N-(2,2-difeniletal)carbamilmetilglicina	Nnbhm	N-(N-(3,3-difenilpropil)carbamilmetil(1)glicina	Nnbhe
1-Carboxi-1-(2,2-difeniletal)amino)ciclopropano	Nmbc		

Se pueden generar péptidos con una mejor afinidad hacia una metaloenzima de interés o una mayor actividad biológica por métodos bien conocidos en la técnica, incluyendo la presentación en fagos y la biología computacional.

- 5 Los péptidos de la presente descripción pueden ser sintetizados por cualquier técnica conocida por los expertos en el campo de la síntesis peptídica. Para la síntesis peptídica en fase sólida, se puede encontrar un resumen de las muchas técnicas en: Stewart, J.M. y Young, J.D. (1963), "Solid Phase Peptide Synthesis", W.H. Freeman Co. (San Francisco), y Meienhofer, J. (1973), "Hormonal Proteins and Peptides", vol. 2, p. 46, Academic Press (New York). Para una revisión

de la síntesis clásica en solución, véase Schroder, G. y Lupke, K. (1965), *The Peptides*, vol. 1, Academic Press (New York). Para técnicas recombinantes, véanse las referencias que se dan más adelante.

Según algunos aspectos de la descripción, se puede conjugar el anticuerpo con un resto funcional (al que también se hace referencia como un "inmunoconjugado"), tal como un resto detectable o terapéutico. La molécula de inmunoconjugado puede ser una molécula aislada, tal como una molécula soluble y/o sintética.

Se pueden conjugar diversos tipos de restos detectables o indicadores con el anticuerpo de la descripción. Éstos incluyen, aunque sin limitación, un isótopo radiactivo (tal como ¹²⁵Iyodo), un agente químico fosforescente, un agente químico quimioluminiscente, un agente químico fluorescente (fluoróforo), una enzima, un polipéptido fluorescente, un marcaje de afinidad y moléculas (agentes de contraste) detectables por Tomografía de Emisión de Positrones (PET) o Imagen de Resonancia Magnética (MRI).

Como ejemplos de fluoróforos adecuados, se incluyen, aunque sin limitación, ficoeritrina (PE), isotiocianato de fluoresceína (FITC), Cy-cromo, rodamina, proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente azul (BFP), rojo Texas, PE-Cy5 y similares. Para directrices adicionales en cuanto a la selección de fluoróforos y métodos de unión de fluoróforos a diversos tipos de moléculas, véanse Richard P. Haugland, "Molecular Probes: Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals 1992-1994", 5ª ed., Molecular Probes, Inc. (1994); Pat. Estadounidense N° 6.037.137 de Oncoimmunin Inc.; Hermanson, "Bioconjugate Techniques", Academic Press New York, N.Y. (1995); Kay M. *et al.*, 1995, *Biochemistry* 34: 293; Stubbs *et al.*, 1996, *Biochemistry* 35: 937; Gakamsky D. *et al.*, "Evaluating Receptor Stoichiometry by Fluorescence Resonance Energy Transfer", en "Receptors: A Practical Approach", 2ª ed., Stanford C. y Horton R. (eds.), Oxford University Press, UK (2001); Pat. Estadounidense N° 6.350.466 de Targesome, Inc.]. Como métodos de detección por fluorescencia que pueden ser usados para detectar el anticuerpo cuando se conjuga con un resto detectable fluorescente, se incluyen, por ejemplo, citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS), microscopía confocal de inmunofluorescencia, hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH) y transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET).

Se pueden unir numerosos tipos de enzimas al anticuerpo de la descripción [por ej., peroxidasa de rábano picante (HPR), beta-galactosidasa y fosfatasa alcalina (AP)] y se puede realizar la detección de anticuerpos conjugados a enzimas usando ELISA (por ej., en solución), ensayo inmunohistoquímico ligado a enzimas (por ej., en un tejido fijado), ensayo quimioluminiscente ligado a enzimas (por ej., en una mezcla de proteínas electroforéticamente separadas) u otros métodos conocidos en la técnica [véanse, por ej., Khatkhatay M. y Desai M., 1999, *J. Immunoassay* 20: 151-83; Wisdom GB., 1994, *Methods Mol. Biol.* 32: 433-40; Ishikawa E. *et al.*, 1983, *J. Immunoassay* 4: 209-327; Oellerich M., 1980, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 18: 197-208; Schuur AH. y van Weemen BK., 1980, *J. Immunoassay* 1: 229-49).

El marcaje de afinidad (o un miembro de un par de unión) puede ser un antígeno identificable por un anticuerpo correspondiente [por ej., digoxigenina (DIG), que es identificada por un anticuerpo anti-DIG] o una molécula con gran afinidad hacia el marcaje [por ej., estreptavidina y biotina]. El anticuerpo o la molécula que se une al marcaje de afinidad pueden ser fluorescentemente marcados o conjugados con una enzima como se ha descrito anteriormente.

Se pueden emplear diversos métodos, ampliamente practicados en la técnica, para unir una molécula de estreptavidina o biotina al anticuerpo de la descripción. Por ejemplo, se puede unir una molécula de biotina al anticuerpo de la descripción gracias a la secuencia de reconocimiento de una biotina proteína ligasa (por ej., BirA) como se describe en la sección de Ejemplos más adelante y en Denkberg, G. *et al.*, 2000, *Eur. J. Immunol.* 30: 3522-3532. De manera alternativa, se puede unir una molécula de estreptavidina a un fragmento de anticuerpo, tal como un Fv de una sola cadena, esencialmente como se describe en Cloutier SM. *et al.*, 2000, *Molecular Immunology* 37: 1067-1077; Dubel S. *et al.*, 1995, *J. Immunol. Methods* 178: 201; Huston JS. *et al.*, 1991, *Methods in Enzymology* 203:46; Kipriyanov SM. *et al.*, 1995, *Hum Antibodies Hybridomas* 6: 93; Kipriyanov SM. *et al.*, 1996, *Protein Engineering* 9: 203; Pearce LA. *et al.*, 1997, *Biochem. Molec. Biol. Intl.* 42: 1179-1188).

Se pueden adquirir comercialmente restos funcionales, tales como fluoróforos, conjugados con estreptavidina, esencialmente de todos los grandes proveedores de reactivos para citometría de flujo de inmunofluorescencia (por ejemplo, Pharmingen o Becton-Dickinson).

Según algunos aspectos de la descripción, se unen anticuerpos conjugados con biotina a una molécula de estreptavidina para formar una composición multivalente (por ej., una forma dimérica o tetramérica del anticuerpo).

La Tabla 3 proporciona ejemplos no limitativos de restos identificables que pueden conjugarse con el anticuerpo de la descripción.

Tabla 3

Resto identificable	Secuencia de aminoácidos (N° de acceso GenBank)	Secuencia de ácido nucleico (N° de acceso GenBank)
Proteína fluorescente verde	AAL33912	AF435427
Fosfatasa alcalina	AAK73766	AY042185
Peroxidasa	CAA00083	A00740
Marcaje de histidina	Aminoácidos 264-269 del N° de	Nucleótidos 790-807 del N° de

	acceso GenBank AAK09208	acceso GenBank AF329457
Marcaje Myc	Aminoácidos 273-283 del N° de acceso GenBank AAK09208	Nucleótidos 817-849 del N° de acceso GenBank AF329457
Marcaje de biotina ligasa	LHHILDAQKMWVWHR	
Proteína fluorescente naranja	AAL33917	AF435432
Beta-galactosidasa	ACH42114	EU626139
Estreptavidina	AAM49066	AF283893

Como se ha mencionado, se puede conjugar el anticuerpo con un resto terapéutico. El resto terapéutico puede ser, por ejemplo, un resto citotóxico, un resto tóxico, un resto de citoquina y un resto de segundo anticuerpo con una especificidad diferente a los anticuerpos de la descripción.

- 5 En la siguiente Tabla 4, se facilitan ejemplos no limitativos de restos terapéuticos que pueden conjugarse con el anticuerpo de la descripción.

Tabla 4

Resto terapéutico	Secuencia de aminoácidos (N° de acceso GenBank)	Secuencia de ácido nucleico (N° de acceso GenBank)
Exotoxina de <i>Pseudomonas</i>	ABU63124	EU090068
Toxina de la difteria	AAV70486	AY820132.1
Interleuquina 2	CAA00227	A02159
CD3	P07766	X03884
CD16	NP_000560.5	NM_000569.6
Interleuquina 4	NP_000580.1	NM_000589.2
HLA-A2	P01892	K02883
Interleuquina 10	P22301	M57627
Toxina ricina	EEF27734	EQ975183

- 10 El resto funcional (el resto detectable o terapéutico de la descripción) puede unirse a o conjugarse con el anticuerpo de la descripción de diversas formas, dependiendo del contexto, de la aplicación y del objetivo.

15 Cuando el resto funcional es un polipéptido, se puede producir el inmunoconjugado por medios recombinantes. Por ejemplo, se puede ligar la secuencia de ácido nucleico codificante de una toxina (por ej., PE38KDEL) o una proteína fluorescente [por ej., proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente roja (RFP) o proteína fluorescente amarilla (YFP)] en marco con la secuencia de ácido nucleico codificante del anticuerpo de la descripción y expresarla en una célula huésped para producir un anticuerpo conjugado recombinante. De manera alternativa, el resto funcional puede ser químicamente sintetizado, por ejemplo, por adición por etapas de uno o más residuos de aminoácidos en un orden definido, tal como las técnicas sintéticas de péptidos en fase sólida.

20 También se puede unir un resto funcional al anticuerpo de la descripción usando técnicas de síntesis química estándar ampliamente empleadas en este campo [véanse, por ej., [hypertexttransferprotocol://worldwideweb \(punto\) chemistry \(punto\) org/portal/Chemistry](http://hypertexttransferprotocol://worldwideweb(punto)chemistry(punto)org/portal/Chemistry)], tales como la utilización de cualquier unión química adecuada, directa o indirecta, como mediante un enlace peptídico (cuando el resto funcional es un polipéptido) o mediante unión covalente a un elemento conector intermedio, tal como un péptido conector u otro resto químico, tal como un polímero orgánico. Se pueden unir péptidos quiméricos mediante unión en los extremos carboxi (C) o amino (N) de los péptidos, o mediante unión a grupos químicos internos, tales como cadenas laterales lineales, ramificadas o cíclicas, átomos de carbono o nitrógeno internos y similares. Se da una descripción de marcaje fluorescente de anticuerpos con detalle en las Pat. Estadounidenses N° 3.940.475, N° 4.289.747 y N° 4.376.110.

25 A continuación, se describen en la presente memoria métodos ejemplares para conjugar restos peptídicos (restos terapéuticos o detectables) con el anticuerpo de la descripción:

30 Conjugación con SPDP - Se describe un ejemplo no limitativo de un método de conjugación con SPDP en Cumber *et al.* (1985, *Methods of Enzymology* 112: 207-224). Para explicarlo brevemente, se mezcla un péptido, tal como un resto detectable o terapéutico (por ej., 1,7 mg/ml) con un exceso 10 veces mayor de SPDP (50 mM en etanol); se mezcla el anticuerpo con un exceso 25 veces mayor de SPDP en fosfato de sodio 20 mM, NaCl 0,10 M, pH 7,2, y se incuba cada una de las reacciones durante aproximadamente 3 horas a temperatura ambiente. Se dializan luego las reacciones frente a PBS. Se reduce el péptido, por ej., con DTT 50 mM durante 1 hora a temperatura ambiente. Se desala el péptido reducido equilibrando en una columna G-25 (hasta un 5% de muestra/volumen de la columna) con KH₂PO₄ 50 mM, pH 6,5. Se combina el péptido reducido con el SPDP-anticuerpo en una proporción molar de anticuerpo:péptido 1:10 y se incuba a 4°C durante la noche, para formar un conjugado péptido-anticuerpo.

35 Conjugación con glutaraldehído - Se describe un ejemplo no limitativo de un método de conjugación con glutaraldehído en G.T. Hermanson (1996, "Antibody Modification and Conjugation", en *Bioconjugate Techniques*, Academic Press,

San Diego). Para explicarlo brevemente, se mezclan el anticuerpo y el péptido (1,1 mg/ml) en un exceso 10 veces mayor con glutaraldehído al 0,05% en fosfato 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 6,8, y se deja que reaccionen durante 2 horas a temperatura ambiente. Se puede añadir lisina 0,01 M para bloquear los sitios de exceso. Tras la reacción, se elimina el exceso de glutaraldehído usando una columna G-25 equilibrada con PBS (10% v/v de muestra/volumen de la columna).

Conjugación con carbodiimida - Se puede llevar a cabo la conjugación de un péptido con un anticuerpo usando un agente deshidratante, tal como una carbodiimida, por ej., en presencia de 4-dimetilaminopiridina. Se puede usar la conjugación con carbodiimida para formar un enlace covalente entre un grupo carboxilo de un péptido y un grupo hidroxilo de un anticuerpo (que da lugar a la formación de un enlace éster), o un grupo amino de un anticuerpo, que da lugar a la formación de un enlace amida) o un grupo sulfhidrilo de un anticuerpo (que da lugar a la formación de un enlace tioéster). De igual modo, se puede usar la copulación de carbodiimida para formar enlaces covalentes análogos entre un grupo carbonado de un anticuerpo y un grupo hidroxilo, amino o sulfhidrilo del péptido [véase J. March, *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanism and Structure*, pp. 349-50 y 372-74 (3ª ed.), 1985]. Por ejemplo, el péptido puede ser conjugado con un anticuerpo mediante un enlace covalente usando una carbodiimida, tal como dicitohexilcarbodiimida [B. Neises *et al.* (1978), *Angew Chem., Int. Ed. Engl.* 17: 522; A. Hassner *et al.* (1978), *Tetrahedron Lett.* 4475; E.P. Boden *et al.* (1986), *J. Org. Chem.* 50: 2394, y L.J. Mathias (1979, *Synthesis* 561)].

Tal como se ha mencionado anteriormente en la presente memoria, un uso específico para un anticuerpo dirigido contra MMP-7 es la prevención o el tratamiento de enfermedades asociadas a una actividad desequilibrada o anormal de la MMP-7.

Como ejemplos de dicha enfermedad, se incluyen, aunque sin limitación, enfermedades artríticas, tales como osteoartritis (OA), artritis reumatoide (AR), artritis séptica, reumatismo de tejidos blandos, policondritis y tendinitis; tumores metastáticos; enfermedades periodontales; ulceración corneal, tal como la inducida por álcalis u otras quemaduras, por radiación, por vitamina E o por deficiencia en retinoides; enfermedades glomerulares, tales como proteinuria, epidermolisis bullosa distrofóbica; enfermedades de la resorción ósea, tales como osteoporosis, enfermedad de Paget, hiperparatiroidismo y colesteatoma; control de la natalidad mediante prevención de la ovulación o de la implantación; angiogénesis relacionada con el crecimiento tumoral o con la neovascularización asociada a retinopatía diabética y degeneración macular; trombosis coronaria asociada a la rotura de placas aterosclerósicas; enfisema pulmonar, curación de heridas e infección por VIH.

Según un aspecto, la enfermedad es el cáncer. Como ejemplos de cánceres, se incluyen cáncer de ovario, carcinoma de células renales, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer rectal y cáncer de próstata.

Según otro aspecto, la enfermedad es una enfermedad inflamatoria del intestino (EII), que es un trastorno gastrointestinal severo caracterizado por inflamación intestinal y remodelación tisular, que aumentan en frecuencia y pueden resultar incapacitantes para los pacientes. Las formas principales de EII, la colitis ulcerativa (CU) y la enfermedad de Crohn, son afecciones crónicas recidivantes que se caracterizan clínicamente por dolor abdominal, diarrea, sangrado rectal y fiebre.

Como sujetos susceptibles de tratamiento, se incluyen sujetos mamíferos, tales como los humanos.

Otro uso para un anticuerpo dirigido contra MMP-7 es el diagnóstico de una enfermedad asociada a una regulación al alza de la expresión de MMP-7.

Por lo tanto, según otro aspecto de la presente descripción, se proporciona un método de diagnóstico de una enfermedad asociada a una actividad desequilibrada o anormal de la MMP-7 en un sujeto, donde el método comprende el contacto de una muestra del sujeto con un anticuerpo descrito en la presente memoria para analizar la expresión de MMP-7, donde una regulación al alza de la expresión de la MMP-7 es indicativa de la enfermedad asociada a una actividad desequilibrada o anormal de la MMP-7.

Como métodos de análisis de la expresión de MMP-7 usando el anticuerpo descrito, se incluyen, aunque sin limitación, el análisis Western, la inmunoprecipitación y la inmunohistoquímica.

Una muestra puede ser un líquido, tal como orina, saliva, líquido cefalorraquídeo, sangre, suero o similares; un sólido o semisólido, tal como tejidos, heces o similares; o, de manera alternativa, un tejido sólido, tal como los habitualmente utilizados en el diagnóstico histológico.

Típicamente, se compara la cantidad de MMP-7 con un control (una muestra correspondiente de un sujeto sano) o con cantidades conocidas de MMP-7 (que corresponden a un sujeto sano).

Después del diagnóstico, el sujeto puede ser informado del resultado. Se pueden realizar más pruebas diagnósticas adicionales en base al resultado de las pruebas usando el anticuerpo para MMP-7 descrito en la presente memoria.

Se apreciará que, además de realizar el diagnóstico *in vitro* (es decir, sobre muestras del sujeto), también se puede efectuar el diagnóstico *in vivo*.

Como enfermedades que pueden ser diagnosticadas, se incluyen las enumeradas anteriormente para enfermedades que pueden ser tratadas.

Se apreciará que un uso específico de un anticuerpo dirigido contra el factor letal del ántrax es el tratamiento o la prevención de la infección del ántrax.

- 5 Tal como se usa en la presente memoria, el término "ántrax" se refiere a una enfermedad causada, directa o indirectamente, por infección con *Bacillus anthracis*. Inhalación: Los síntomas iniciales pueden asemejarse a un resfriado común -- garganta irritada, fiebre leve, dolores musculares y malestar. Después de varios días, los síntomas pueden progresar a problemas severos de respiración y shock. El ántrax por inhalación es normalmente fatal. Cutáneo: Las infecciones por ántrax pueden producirse cuando la bacteria entra a través de un corte o abrasión en la piel, como cuando se manejan lana, pieles, cuero o productos capilares (especialmente pelo de cabra) contaminados de animales infectados. La infección cutánea se inicia como una protuberancia prurítica elevada que parece una picadura de insecto, pero que en 1-2 días evoluciona a una vesícula y luego a una úlcera indolora, normalmente de 1-3 cm de diámetro, con un área necrótica (muerta) negra característica en el centro. Los ganglios linfáticos del área adyacente pueden hincharse. Aproximadamente un 20% de los casos no tratados de ántrax cutáneo acabarán en muerte.
- 10
- 15 Gastrointestinal: La forma de enfermedad intestinal del ántrax puede aparecer tras el consumo de carne contaminada y se caracteriza por una inflamación aguda del tracto intestinal. Los signos iniciales de náusea, pérdida de apetito, vómito y fiebre van seguidos de dolor abdominal, vómito de sangre y diarrea severa. El ántrax intestinal acaba en muerte en un 25% a un 60% de los casos.

20 El tratamiento puede ser efectuado tras la infección por ántrax o puede ser empleado como profiláctico antes de una infección anticipada.

En algunos aspectos, los anticuerpos monoclonales descritos en la presente memoria pueden ser usados individualmente o en combinación con otros anticuerpos en la detección, la profilaxis y/o la terapia para la enfermedad del ántrax en humanos. Por ejemplo, se puede usar un cóctel de anticuerpos neutralizantes contra los tres componentes (PA, LF y EF) de la toxina del ántrax en la detección, la profilaxis y/o la terapia. De manera alternativa, se pueden usar combinaciones por parejas. Por ejemplo, una terapia puede incluir anticuerpos anti-PA y anticuerpos anti-LF, anticuerpos anti-PA y anti-EF o anticuerpos anti-LF y anti-EF. Como anticuerpos anti-PA que pueden ser utilizados en aspectos descritos en la presente memoria, se incluyen, aunque sin limitación, los descritos en la Publicación PCT N° WO2007/084107.

25

30 Se apreciará que los anticuerpos que reconocen al factor letal del ántrax (ALF) pueden ser también utilizados para diagnosticar una infección por ántrax.

Como métodos de análisis de la expresión de ALF usando el anticuerpo descrito, se incluyen, aunque sin limitación, el análisis Western, la inmunoprecipitación y la inmunohistoquímica.

35 Una muestra puede ser un líquido, tal como orina, saliva, líquido cefalorraquídeo, sangre, suero o similar; un sólido o semisólido, tal como tejidos, heces o similar; o, de manera alternativa, un tejido sólido, tal como los comúnmente utilizados en el diagnóstico histológico.

La detección de cualquier cantidad de ALF por encima del nivel de fondo puede indicar una infección por ántrax.

40 Se apreciará que, además de realizar el diagnóstico *in vitro* (es decir, sobre muestras del sujeto), también se puede efectuar el diagnóstico *in vivo*. Tras el diagnóstico, se puede informar al sujeto del resultado. Se pueden realizar más pruebas diagnósticas adicionales en base al resultado de las pruebas usando el anticuerpo para MMP-7 descrito en la presente memoria.

Los anticuerpos de la presente descripción pueden ser administrados al sujeto *per se* o como parte de una composición farmacéutica.

45 Tal como se usa en la presente memoria, una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los principios activos descritos en la presente memoria con otros componentes químicos, tales como vehículos y excipientes fisiológicamente adecuados. El fin de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

En la presente memoria, el término "principio activo" se refiere al anticuerpo responsable del efecto biológico.

50 De aquí en adelante, las frases "vehículo fisiológicamente aceptable" y "vehículo farmacéuticamente aceptable", que pueden ser usadas indistintamente, se refieren a un vehículo o un diluyente que no provoca irritación significativa a un organismo y que no anula la actividad biológica y las propiedades del compuesto administrado. En estas frases se incluye un adyuvante.

En la presente memoria, el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar aún más la administración de un principio activo. Como ejemplos, sin limitación, de excipientes, se incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de

celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

Se pueden encontrar técnicas para la formulación y administración de fármacos en "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición.

5 Como vías adecuadas de administración, se pueden incluir, por ejemplo, la administración oral, rectal, transmucosal, especialmente transnasal, intestinal o parenteral, incluyendo inyecciones intramusculares, subcutáneas e intramedulares, así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intracardiacas, por ej., en la cavidad ventricular derecha o izquierda, en la arteria coronaria común, intravenosas, intraperitoneales, intranasales o intraoculares.

10 Como enfoques convencionales para la administración de fármacos al SNC, se incluyen: estrategias neuroquirúrgicas (por ej., inyección intracerebral o infusión intracerebroventricular); manipulación molecular del agente (por ej., producción de una proteína de fusión quimérica que comprende un péptido de transporte que tiene afinidad por una molécula de la superficie de las células endoteliales en combinación con un agente que es incapaz por sí mismo de atravesar la BHE) en un intento de explotar una de las rutas de transporte endógenas de la BHE; estrategias farmacológicas diseñadas para aumentar la solubilidad en lípidos de un agente (por ej., conjugación de agentes hidrosolubles a vehículos lipídicos o de colesterol), y la alteración transitoria de la integridad de la BHE por alteración hiperosmótica (resultante de la infusión de una solución de manitol en la arteria carótida o del uso de un principio biológicamente activo, tal como un péptido de angiotensina). Sin embargo, cada una de estas estrategias tiene limitaciones, tales como los riesgos inherentes asociados a un procedimiento quirúrgico invasivo, una limitación de tamaño impuesta por una limitación inherente en los sistemas de transporte endógenos, efectos colaterales biológicos potencialmente indeseables asociados a la administración sistémica de una molécula quimérica compuesta por una unidad de vehículo que podría ser activa fuera del SNC, y el posible riesgo de daños cerebrales en regiones del cerebro en donde la BHE está alterada, lo que hace de él un método de administración subóptimo.

De manera alternativa, se puede administrar la composición farmacéutica local más que sistémicamente, por ejemplo, por inyección de la composición farmacéutica directamente en una región tisular de un paciente.

25 El término "tejido" se refiere a parte de un organismo consistente en un agregado de células que tienen una estructura similar y/o una función común. Como ejemplos se incluyen, aunque sin limitación, tejido cerebral, retina, tejido cutáneo, tejido hepático, tejido pancreático, hueso, cartílago, tejido conectivo, tejido sanguíneo, tejido muscular, tejido cardíaco, tejido cerebral, tejido vascular, tejido renal, tejido pulmonar, tejido gonadal y tejido hematopoyético.

30 Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción pueden ser fabricadas por procedimientos bien conocidos en la técnica, por ej., por medio de procedimientos convencionales de mezcla, disolución, granulación, preparación de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

35 Las composiciones farmacéuticas para uso según la presente descripción pueden, por lo tanto, ser formuladas de un modo convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y agentes auxiliares, que facilitan el procesamiento de los principios activos en preparaciones que pueden ser usadas farmacéuticamente. Una formulación apropiada depende de la vía de administración seleccionada.

40 Para inyección, los principios activos de la composición farmacéutica pueden ser formulados en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hank, solución de Ringer o tampón de solución salina fisiológica. Para administración transmucosal, se usan en la formulación agentes penetrantes apropiados para la barrera que se ha de permear. Dichos agentes penetrantes son conocidos, en general, en la técnica.

45 Para administración oral, la composición farmacéutica puede ser formulada fácilmente combinando los compuestos activos con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Dichos vehículos permiten formular la composición farmacéutica como tabletas, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, lechadas, suspensiones y similares, para ingestión oral por un paciente. Se pueden producir preparaciones farmacológicas para uso oral usando un excipiente sólido, triturando eventualmente la mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir agentes auxiliares adecuados si se desea, para obtener tabletas o núcleos de grageas. Son excipientes adecuados, en particular, cargas tales como azúcares, incluyendo lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa, tales como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carbometilcelulosa sódica y/o polímeros fisiológicamente aceptables, tales como polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, se pueden añadir agentes desintegrantes, tales como polivinilpirrolidona entrecruzada, agar o ácido algínico o una sal del mismo, tal como alginato de sodio.

55 Los núcleos de grageas están provistos de revestimientos adecuados. Con este fin, se pueden usar soluciones concentradas de azúcares, que pueden eventualmente contener goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol, dióxido de titanio, soluciones de laca y solventes o mezclas de solventes orgánicos adecuados. Se pueden añadir tintes o pigmentos a las tabletas o revestimientos de grageas para identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuestos activos.

Como composiciones farmacéuticas que pueden ser usadas oralmente, se incluyen cápsulas de ajuste a presión hechas de gelatina, así como cápsulas selladas blandas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas de ajuste a presión pueden contener los principios activos en mezcla con cargas, tales como lactosa, ligantes, tales como almidones, lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio, y, eventualmente, estabilizadores. En las cápsulas blandas, los principios activos pueden estar disueltos o suspendidos en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles líquidos. Además, se pueden añadir estabilizadores. Todas las formulaciones para administración oral deben estar en dosificaciones adecuadas para la vía de administración seleccionada.

Para administración bucal, las composiciones pueden adoptar la forma de tabletas o pastillas para chupar formuladas de un modo convencional.

Para administración por inhalación nasal, los principios activos para uso según la presente descripción son convenientemente administrados en forma de una presentación en espray aerosol de un paquete presurizado o un nebulizador usando un propulsor adecuado, por ej., diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol presurizado, se puede determinar la unidad de dosificación dotando de una válvula para administrar una cantidad medida. Las cápsulas y los cartuchos de, por ej., gelatina para uso en un dispensador pueden ser formuladas con un contenido de mezcla de polvo del compuesto y una base de polvo adecuada, tal como lactosa o almidón.

La composición farmacéutica descrita en la presente memoria puede ser formulada para administración parenteral, por ej., por inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ej., en ampollas o en recipientes multidosis eventualmente con un conservante añadido. Las composiciones pueden ser suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación, tales como agentes suspensores, estabilizantes y/o dispersantes.

Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de la preparación activa en forma hidrosoluble. Además, se pueden preparar suspensiones de los principios activos como suspensiones para inyección oleosas o basadas en agua apropiadas. Como solventes o vehículos lipofílicos adecuados, se incluyen aceites grasos, tales como aceite de sésamo, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo, triglicéridos o liposomas. Las suspensiones para inyección acuosas pueden contener substancias que aumenten la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol o dextrano. Eventualmente, la suspensión puede contener también estabilizadores adecuados o agentes que aumenten la solubilidad de los principios activos para permitir la preparación de soluciones muy concentradas.

De manera alternativa, el principio activo puede estar en forma de polvo para su reconstitución con un vehículo adecuado, por ej., solución basada en agua libre de pirógenos estéril, antes de su uso.

La composición farmacéutica de la presente descripción puede también ser formulada en composiciones rectales, tales como supositorios o enemas de retención, usando, por ej., bases de supositorios convencionales, tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

Como composiciones farmacéuticas adecuadas para uso en el contexto de la presente descripción, se incluyen composiciones en las que los principios activos están contenidos en una cantidad efectiva para conseguir el fin pretendido. Más concretamente, una cantidad terapéuticamente efectiva significa una cantidad de principios activos (anticuerpo) efectiva para prevenir, aliviar o mejorar los síntomas de un trastorno (por ej., cáncer/infección por ántrax) o para prolongar la supervivencia del sujeto en tratamiento.

La determinación de una cantidad terapéuticamente efectiva se encuentra dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, especialmente a la luz de la descripción detallada proporcionada en la presente memoria.

Para cualquier preparación usada en los métodos de la descripción, se puede calcular la cantidad o dosis terapéuticamente efectiva inicialmente a partir de ensayos *in vitro* y de cultivo celular. Por ejemplo, se puede formular una dosis en modelos animales para alcanzar una concentración o título deseado. Dicha información puede ser usada para determinar con más precisión dosis útiles en humanos.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de los principios activos descritos en la presente memoria pueden ser determinadas por procedimientos farmacéuticos estándar *in vitro*, en cultivos celulares o en animales de experimentación. Los datos obtenidos de estos ensayos *in vitro* y en cultivo celular y de estudios en animales pueden ser usados en la formulación de un intervalo de dosificación para uso en humanos. La dosificación puede variar dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. La formulación, vía de administración y dosificación exactas pueden ser seleccionadas por el médico individual considerando el estado del paciente. (Véase, por ej., Finigl *et al.*, 1975, en "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Cap. 1, p. 1).

La cantidad y el intervalo de dosificación pueden ser ajustados individualmente para obtener niveles tisulares o sanguíneos del principio activo que sean suficientes para inducir o suprimir el efecto biológico (concentración mínima efectiva, CME). La CME variará para cada preparación, pero puede ser calculada a partir de datos *in vitro*. Las dosificaciones necesarias para alcanzar la CME dependerán de las características individuales y de la vía de

administración. Se pueden usar ensayos de detección para determinar las concentraciones plasmáticas.

Dependiendo de la severidad y de la respuesta de la afección que ha de ser tratada, la dosificación puede ser de una sola o de una pluralidad de administraciones, durando el curso del tratamiento de varios días a varias semanas o hasta conseguir la curación o conseguir la disminución del estado de la enfermedad.

- 5 La cantidad de una composición que se ha de administrar dependerá, por supuesto, del sujeto que esté siendo tratado, de la severidad de la afección, del modo de administración, del juicio del médico que hace la prescripción, etc.

Las composiciones de la presente descripción pueden presentarse, si se desea, en un envase o dispositivo dispensador, tal como un kit aprobado por la FDA, que puede contener una o más formas de unidad de dosificación que contengan el principio activo. El envase puede incluir, por ejemplo, una lámina metálica o de plástico, tal como un
10 envase blíster. El envase o dispositivo dispensador puede ir acompañado de instrucciones para la administración. El envase o dispensador puede también estar aprobado por un aviso asociado al recipiente en una forma prescrita por una agencia gubernamental reguladora de la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos, reflejando dicho aviso la aprobación por la agencia de la forma de las composiciones o de la administración humana o veterinaria. Dicho aviso, por ejemplo, puede ser de etiquetado aprobado por la Food and Drug Administration de los EE.UU. para
15 fármacos de prescripción o de un prospecto de producto aprobado. Las composiciones que comprenden una preparación de la descripción formulada en un vehículo farmacéutico compatible pueden también ser preparadas, colocadas en un recipiente apropiado y etiquetadas para el tratamiento de una afección indicada, como se ha detallado más ampliamente con anterioridad.

El término "tratamiento" se refiere a la inhibición, prevención o detención del desarrollo de una patología (enfermedad, trastorno o afección) y/o a causar la reducción, remisión o regresión de una patología. Los expertos en la técnica entenderán que se pueden usar diversas metodologías y ensayos para valorar el desarrollo de una patología, y, de forma similar, se pueden usar diversas metodologías y ensayos para valorar la reducción, remisión o regresión de una patología.

20 Tal como se usa en la presente memoria, el término "prevención" se refiere a evitar que una enfermedad, un trastorno o una afección se produzca en un sujeto que puede hallarse en riesgo de la enfermedad, pero que aún no ha sido diagnosticado como padecedor de la enfermedad.

Tal como se usa aquí, el término "sujeto" incluye mamíferos, preferiblemente seres humanos, de cualquier edad que padecen la patología. Preferiblemente, este término incluye a individuos que se encuentran en riesgo de desarrollar la patología.

- 30 Los términos "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "que tiene" y sus conjugados significan "que incluye, aunque sin limitación".

Tal como se usa aquí, el término "método" se refiere a las maneras, medios, técnicas y procedimientos para llevar a cabo una tarea dada, incluyendo, aunque sin limitación, las maneras, medios, técnicas y procedimientos ya sean conocidos para, o fácilmente desarrollados a partir de maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos por, los
35 practicantes de las técnicas químicas, farmacológicas, biológicas, bioquímicas y médicas.

Se aprecia que determinadas características de la descripción, que se describen, por razones de claridad, en el contexto de realizaciones separadas, pueden también ser facilitadas en combinación en una sola realización. Por el contrario, se pueden proporcionar también diversas características de la descripción, que, por razones de brevedad, se describen en el contexto de una sola realización, por separado o en cualquier subcombinación adecuada o como
40 adecuadas en cualquier otra realización descrita de la descripción. Determinadas características descritas en el contexto de diversas realizaciones no han de ser consideradas características esenciales de esas realizaciones, a menos que la realización no sea operativa sin esos elementos.

Diversas realizaciones y aspectos de la presente descripción según se han delineado en lo que antecede y según se reivindica en la sección de reivindicaciones más adelante hallan soporte experimental en los siguientes ejemplos.

45 **Ejemplos**

Se hace ahora referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las anteriores descripciones ilustran algunas realizaciones de la descripción de un modo no limitativo.

En general, la nomenclatura utilizada en la presente memoria y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente descripción incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Dichas técnicas están explicadas a fondo en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Sambrook *et al.* (1989); "Current Protocols in Molecular Biology", Volúmenes I-III, Ausubel, R.M., ed. (1994); Ausubel
50 *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson *et al.*, "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren *et al.* (eds.), "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vol. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); metodologías como las expuestas en las Pat. Estadounidenses N°
55

4.666.828, N° 4.683.202, N° 4.801.531, N° 5.192.659 y N° 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes I-III, Cellis, J.E. ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique", de Freshney, Wiley-Liss, N.Y. (1994), Tercera Edición; "Current Protocols in Immunology", Volúmenes III, Coligan J.E. ed. (1994); Stites *et al.* (eds.), "Basic and Clinical Immunology" (8ª Edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds.), "Selected Methods in Cellular Immunology", W.H. Freeman and Co., New York (1980); se describen ampliamente inmunoensayos disponibles en la literatura de patentes y científica; véanse, por ejemplo, las Pat. Estadounidenses N° 3.791.932, N° 3.839.153, N° 3.850.752, N° 3.850.578, N° 3.853.987, N° 3.867.517, N° 3.879.262, N° 3.901.654, N° 3.935.074, N° 3.984.533, N° 3.996.345, N° 4.034.074, N° 4.098.876, N° 4.879.219, N° 5.011.771 y N° 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis", Gait, M.J. ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization", Hames, B.D. y Higgins, S.J., eds. (1985); "Transcription and Translation", Hames, B.D. y Higgins, S.J., eds. (1984); "Animal Cell Culture", Freshney, R.I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes", IRL Press (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning", Perbal, B. (1984), y "Methods in Enzymology", Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak *et al.*, "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual", CSHL Press (1996). A lo largo de este documento, se proporcionan otras referencias generales. Se piensa que los procedimientos que se encuentran en ellas son bien conocidos en la técnica y se facilitan por razones de conveniencia para el lector.

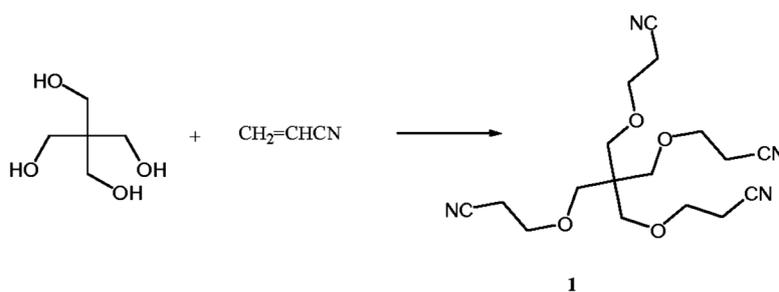
Ejemplo 1

Generación de anticuerpos que reconocen a MMP-7 o al factor letal del ántrax

Materiales y métodos

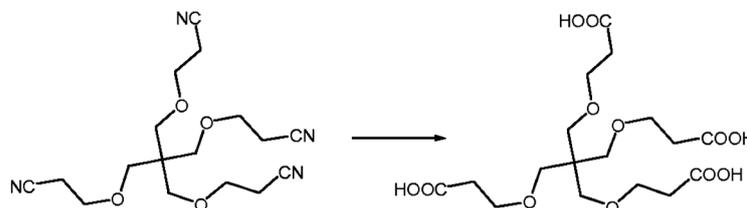
20 Síntesis de Zn-trípode:

A.



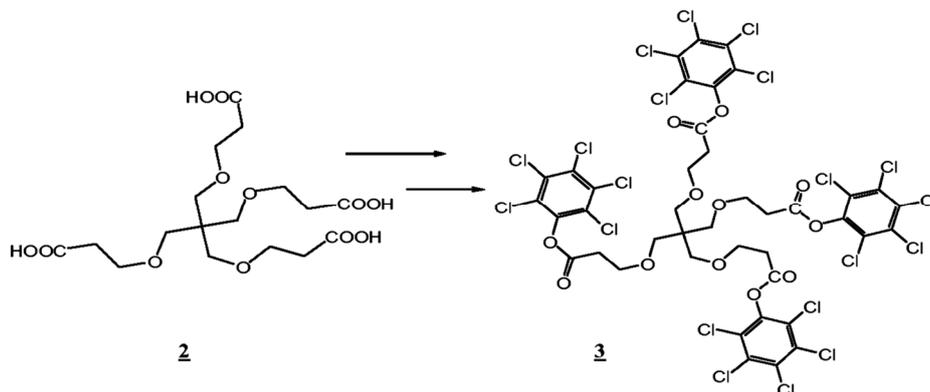
25 Se mezclaron pentaeritritol (9,53 g, 0,07 mol) y NaOH (0,7 ml de 30% p/p) en un matraz y se añadió lentamente acrilonitrilo (20,3 ml, 0,44 mol) de manera que la temperatura no excediera de 30°C. Se agitó la mezcla durante la noche a temperatura ambiente, se neutralizó con HCl 1N, se extrajo en EtOAc (200 ml), se lavó dos veces con agua, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró. Se obtuvieron 22,9 g del derivado tetranitrilo (rendimiento del 94%).

B.



30 Se trató el tetranitrilo 1 (7,22 g, 0,021 mol) con HCl concentrado (10 ml), se sometió a reflujo durante 4 h a 95°C, se extrajo en EtOAc frío (300 ml), se lavó dos veces con agua, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró. Se obtuvo el tetraácido (6,67 g) con un rendimiento del 75%.

C y D.



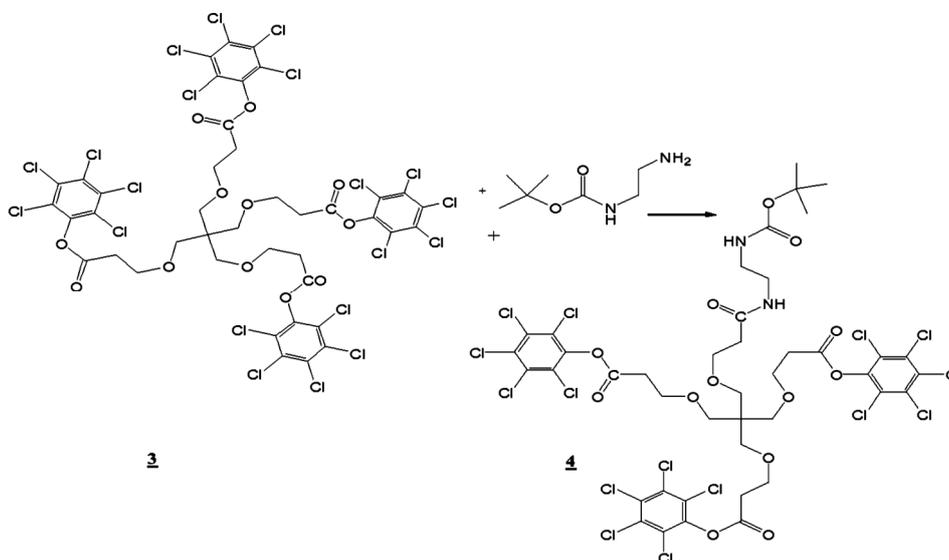
Se añadió SOCl_2 (11,9 ml) al tetraácido **2** (11,5 g) y se calentó la solución hasta 40°C ruante 15 horas (durante la noche). Se destiló el exceso de cloruro de tionilo y se disolvió el residuo, el haluro de tetracilo bruto, en CHCl_3 seco

- 5 Se añadió pentaclorofenol (28,76 g), se enfrió la mezcla hasta 0°C , se añadió Et_3N (15 ml, 0,108 mol) y se agitó la mezcla a temperatura ambiente. La reacción fue seguida de IR para ver que el pico del cloruro desaparecía (aproximadamente 1 día). Se eliminó el solvente y se purificó el residuo por cromatografía instantánea (gel de sílice, eluyente CHCl_3). Se eliminó el pentaclorofenol residual por filtración sobre alúmina neutra desactivada, para obtener 11,94 g (8,42 mmol, 31% de rendimiento) del éster tetraactivo.

- 10 IR (CDCl_3): $\nu = 1783 \text{ cm}^{-1}$ (COOC_6Cl_5).

^1H RMN (CDCl_3) $\delta = 3,81$ (t, J) 6 Hz, 8H, CCH_2OCH_2), 3,46 (s, 8H, CCH_2O), 2,91 (t, J), 6 Hz, 8H, CH_2CN).

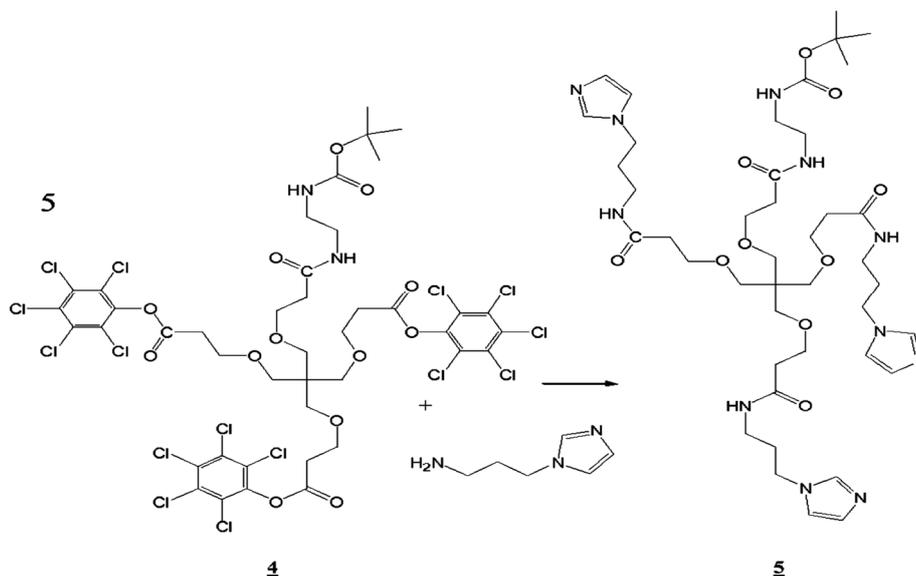
E.



- 15 Se disolvieron el éster tetraactivo **3** (1 g, 0,69 mmol) y mono-BOC-etilendiamina (100 mg, 0,62 mmol) en 20 ml de diclorometano seco. Se agitó la solución durante la noche mientras se mantenía el pH a ~8 con trietilamina. Se eliminó el solvente y se purificó el residuo por cromatografía instantánea con cloroformo:acetato de etilo (90:10), para obtener (152 mg, rendimiento del 15%) de compuesto **4**.

- 20 ^1H RMN 250 MHz (CDCl_3): $\delta = 1,4$ (s, 9H, Boc), 2,4 (t, 2H, J=6 Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CONH}$), 2,9 (t, 6H, J=6 Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOPCP}$), 3,2 (c, 2H, J=6 Hz, $-\text{CONH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NHBoc}$), 3,31 (t, 2H, J=6 Hz, $-\text{CONH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NHBoc}$), 3,38 (s, 2H, $-\text{C}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CONH}-$), 3,42 (s, 6H, $-\text{C}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOPCP}$), 3,61 (t, 2H, J=6 Hz, $-\text{C}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CONH}-$), 3,78 (t, 6H, J=6 Hz, $-\text{C}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CONH}$), 5,03 (t, 1H, NH), 6,7 (t, 1H, NH).

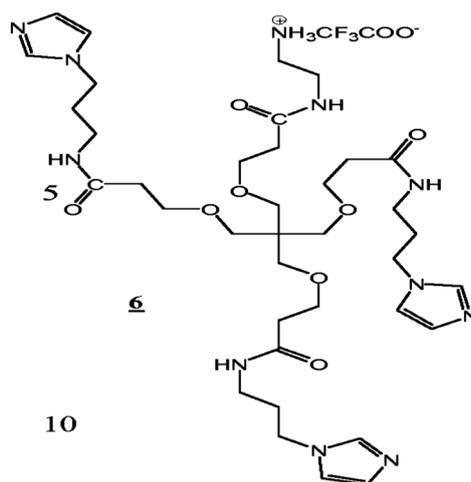
F.



Se disolvieron el compuesto 4 (150 mg, 0,11 mmol) y 1-(3-aminopropil)imidazol (33 μ l, 0,39 mmol) en THF seco (20 ml) y se agitó durante la noche a temperatura ambiente. Se eliminó el solvente y se purificó el residuo por cromatografía en columna con cloroformo:metanol (5:9) como eluyentes. Se obtuvo el producto 5, 45 mg, con un rendimiento del 44%.

^1H RMN 250 MHz ($\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$) δ = 1,45 (s, 9H, Boc), 2,0 (m, 6H, J=6 Hz, $-\text{CONH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{imi}$), 2,4 (t, 6H, J=6 Hz, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CONH}-$), 2,5 (t, 2H, J=6 Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CONH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NHBoc}$), 3,0 (m, 8H, J=6 Hz, $-\text{CONH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{imi}$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CONH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NHBoc}$), 3,1 (t, 2H, J=6 Hz, $-\text{CONH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NHBoc}$), 3,4 (ancho, 8H, $-\text{C}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CONH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NHBoc}$, $-\text{C}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CONH}-$), 3,6 (m, 8H, J=6 Hz, $-\text{C}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CONH}-$, $-\text{C}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CONH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NHBoc}$), 4,0 (t, 6H, J=6 Hz, $-\text{CONH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{imi}$), 5,5 (t, 1H, NH), 6,98 (s, 3H, **Imi**), 7,06 (s, 3H, **Imi**), 7,32 (t, 3H, **NH**), 7,57 (s, 3H, **Imi**). ESI-MS: 910,87 [$\text{M}+\text{Na}$] $^+$, 925,98 [$\text{M}+\text{K}$] $^+$.

G.



Se disolvió el derivado tris(imidazol) 5 (40 mg, 0,045 mmol) en una solución 2:1 de diclorometano y ácido trifluoroacético (6 ml) y se agitó durante una hora. Se eliminó el solvente y se eliminó también el exceso de TFA por coevaporación con tetracloruro de carbono. Se obtuvo el producto 6, 30 mg, con un rendimiento del 85%.

^1H RMN 250 MHz ($\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$) δ = 1,9 (m, 6H, J=6 Hz, $-\text{CONH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{imi}$), 2,3 (m, 8H, J=6 Hz, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CONH}-$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CONH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$), 2,9 (t, 2H, J=6 Hz, $-\text{CONH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{imi}$), 3,0 (t, 2H, J=14 Hz, $-\text{CONH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$), 3,31 (t, 2H, J=6 Hz, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CONH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$), 3,4 (ancho, 8H, $-\text{C}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CONH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$, $-\text{C}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CONH}-$), 3,6 (m, 8H, J=6 Hz, $-\text{C}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CONH}-$, $-\text{C}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CONH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$), 4,0 (t, 6H, J=6 Hz, $-\text{CONH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{imi}$), 7,26 (s, 3H, **Imi**), 7,32 (s, 3H, **Imi**), 8,82 (s, 3H, **Imi**).

H. Complejo de Zn(II) del trípode 6.

Se disolvió el trípode 6 (30 mg) en metanol (1 ml). Se añadió NaOH 1N (1-2 gotas), seguido de una solución de ZnCl₂ (5 mg) en metanol, y se agitó la solución durante media hora. Se obtuvo un precipitado blanco y se filtró. Se obtuvo el complejo (12 mg) con un rendimiento del 37%.

5 ¹H RMN 250 MHz (MeOD/D₂O) δ = 1,8 (m, 6H, J=6 Hz, -CONH-CH₂-**CH**₂-CH₂-imi), 2,4 (m, 8H, J= 6 Hz, -O-CH₂-**CH**₂-CONH-, -CH₂-**CH**₂-CONH-CH₂-CH₂-NH₂), 3,0 (t, 2H, J=6 Hz, -CONH-**CH**₂-CH₂-CH₂-imi), 3,0 (t, 2H, J=6 Hz, -CONH-**CH**₂-CH₂-NH₂), 3,31 (ancho, 2H, -CH₂-CH₂-CONH-CH₂-**CH**₂-NH₂), 3,4 (ancho, 8H, -C-**CH**₂-O-CH₂-CH₂-CONH-CH₂-CH₂-NH₂, -C-**CH**₂-O-CH₂-CH₂-CONH-), 3,6 (m, 8H, -C-CH₂-O-**CH**₂-CH₂-CONH-, -C-CH₂-O-**CH**₂-CH₂-CONH-CH₂-CH₂-NH₂), 4,2 (ancho, 6H, -CONH-CH₂-CH₂-**CH**₂-imi), 7,19 (s, 3H, **Imi**), 7,28 (s, 3H, **Imi**), 8,55 (s, 3H, **Imi**). ESI-MS: 852,09 [M+1]⁺.

Preparación de conjugados Zn-trípode-proteína: Se conjugó Zn-trípode con hemocianina de lapa californiana (KLH) para inmunización y con seroalbúmina bovina (BSA) para captura de anticuerpos específicos. Se disolvió Zn-trípode (4 mg) en una solución saturada de NaHCO₃ (0,5 ml), se añadió 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida (4 mg) a la solución con agitación. De forma similar, se añadieron KLH (a una razón molar 50:1) o BSA (a una razón molar 25:1 ó 10:1), ambas en tampón PBS, a la solución con agitación. Después de 3 h a TA y de una noche a 4°C, se dializaron los conjugados ampliamente (2xPBS) y se diluyeron hasta una concentración final de 1 mg/ml. Se determinó la densidad de hapteno (número de moléculas de hapteno por molécula de BSA o KLH) del Zn-trípode midiendo el contenido en zinc por espectroscopía de emisión atómica de plasma inductivamente acoplado usando el modelo ICP-AES "Spectroflame" de Spectro (Kleve, Alemania). Se digirieron las muestras con ácido nítrico al 5% en agua libre de metales y se ajustó el volumen a 6 ml. Se determinó el contenido en zinc de la muestra en relación a su concentración de proteína equivalente.

Preparación de metalocuerpos anti-MMP usando Zn-trípode-KLH como inmunógeno: Ratones BALB/c hembras fueron inmunizados el día 1 con adyuvante completo de Freund y 30 µg de zinc-trípode-KLH seguidos (después de 3 a 4 refuerzos con zinc-trípode, una vez se pudo detectar una respuesta inmune hacia el zinc-trípode en el suero de los ratones por ELISA) de una segunda inmunización con la metaloenzima diana completa, por ej., MMP-7 humana o fragmento catalítico de la proteasa bacteriana del Factor Letal del Ántrax (LF del ántrax). Se aislaron hibridomas secretores de anticuerpos que tenían reacción cruzada con el Zn-epítipo mimético sintético y la metaloenzima diana.

Se realizaron los refuerzos cada dos a tres semanas primero con adyuvante incompleto de Freund por emulsión e inyección intraperitoneal, seguido de refuerzos en PBS. Se fusionaron las células esplénicas de los ratones inmunizados con células de mieloma murino NSO y se cultivaron en medio de selección HAT (hipoxantina/aminopterin/timidina).

Se rastrearon los sobrenadantes de cultivo del hibridoma usando un ELISA, empleando pares de pocillos en placas de microtitulación sobre las que se absorbieron MMP-7, factor letal del ántrax y zinc-trípode-BSA como antígenos (0,5 µg de MMP-7, factor letal del ántrax o conjugado zinc-trípode-BSA por pocillo). Tras incubación con 100 µl de los sobrenadantes de hibridomas, y con lavados intermedios con Tris-solución salina tamponada, pH 7,5, que contenía un 0,05% de Tween 20 (TBS-Tween), se incubaron los pocillos con una IgG de cabra antirratón conjugada a peroxidasa, seguido de una solución de sustrato que contenía sal diamonio de 2'-azinobis(ácido 3-etilbenziazolino-6-sulfónico).

Resultados

40 Los ratones fueron inmunizados con el zinc-compuesto mimético proteico sintético, seguido de la metaloenzima diana completa. Este procedimiento de inmunización dio hibridomas con reacción cruzada que segregan anticuerpos monoclonales que reconocen tanto a la molécula mimética sintética como a la metaloenzima diana (Figuras 1A-D).

REIVINDICACIONES

1. Un método de generación de un anticuerpo que inhibe MMP-7, donde el método comprende la inmunización de un sujeto no humano con:

(i) [2-(2-aminoetilcarbamoil)etoximetil]tris[2-(N-(3-imidazol-1-ilpropil))etoximetil]metano; y

5 (ii) MMP-7,

generando así el anticuerpo que inhibe la MMP-7, donde el método no es un método de tratamiento, donde el anticuerpo comprende una región de reconocimiento de antígeno que se une a un sitio catalítico de MMP-7 y [2-(2-aminoetilcarbamoil)etoximetil]tris[2-(N-(3-imidazol-1-ilpropil))etoximetil]metano.

10 2. El método de la reivindicación 1, donde dicha inmunización es efectuada inmunizando inicialmente con (i) e inmunizando posteriormente con (ii).

3. El método de la reivindicación 1, donde dicha inmunización es efectuada coinmunizando con (i) y (ii).

15 4. Un anticuerpo que comprende una región de reconocimiento de antígeno que se une a un sitio catalítico de MMP-7 y [2-(2-aminoetilcarbamoil)etoximetil]tris[2-(N-(3-imidazol-1-ilpropil))etoximetil]metano, donde el anticuerpo inhibe la actividad de dicha MMP-7 y donde la Ki del anticuerpo hacia dicha MMP-7 es al menos 5 veces inferior a una Ki del anticuerpo hacia MMP2 o MMP9.

5. El anticuerpo de la reivindicación 4 unido a un resto detectable o un resto terapéutico.

6. El anticuerpo de la reivindicación 4 para uso en el tratamiento del cáncer.

20 7. Un método de diagnóstico del cáncer en un sujeto, donde el método comprende el contacto de una muestra del sujeto con el anticuerpo de la reivindicación 4 para analizar la expresión de MMP-7, donde una regulación al alza de la expresión de dicha MMP-7 es indicativa del cáncer.

8. Una composición farmacéutica que incluye el anticuerpo de la reivindicación 4.

