

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 388 993**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/22 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 14/475 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **06750127 .0**

(96) Fecha de presentación: **13.04.2006**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1869086**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **26.12.2007**

(54)

Título: **Procedimientos y composiciones para modular y detectar actividad de WISP**

(30)

Prioridad:
14.04.2005 US 105876

(73)

Titular/es:
GENENTECH, INC. (100.0%)
1 DNA WAY MS 49
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-, US

(45)

Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.10.2012

(72)

Inventor/es:
DESNOYERS, LUC y
FILVAROFF, ELLEN

(45)

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.10.2012

(74)

Agente/Representante:
PONTI SALES, Adelaida

ES 2 388 993 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

Procedimientos y composiciones para modular y detectar actividad de WISP.

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere generalmente a procedimientos y composiciones para uso en la modulación de la(s) actividad(es) de polipéptidos WISP, particularmente polipéptidos WISP-1. La invención también 10 se refiere a procedimientos y composiciones para diagnóstico *in vitro*, *in situ* y/o *in vivo* y/o tratamiento de células de mamífero o afecciones patológicas asociadas a polipéptidos WISP.

Antecedentes de la invención

[0002] El factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) es un factor de crecimiento inducido en fibroblastos por muchos factores que incluyen TGF- β , y es esencial para la capacidad de TGF- β para inducir crecimiento independiente de anclaje (AIG), una propiedad de células transformadas. El CTGF también es mitogénico y quimiotáctico para células, y de ahí que se crea que los factores de crecimiento en esta familia desempeñan una función en el desarrollo, crecimiento y reparación normales de tejido humano. Se han aislado, 15 clonado, secuenciado y caracterizado como que pertenecen a la familia de genes CCN cinco proteínas relacionadas con CTGF que incluyen Cyr61, Nov, WISP-1, WISP2 y WISP-3. Oemar y Luescher, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 17: 1483-1489 (1997); Brigstock, Endocrine Rev., 20:189-206 (1999). Se ha encontrado que el gen que codifica Cyr61 promueve la angiogénesis, el crecimiento tumoral y la vascularización. Babic y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 6355-6360 (1998). El gen nov se expresa en el riñón, esencialmente en la fase embrionaria, y se han 20 detectado alteraciones de la expresión de nov con respecto al riñón normal tanto en nefroblastomas aviares como en tumores de Wilms humanos. Martinerie y col., Oncogene, 9: 2729-2732 (1994). Wt1 regula por disminución la expresión de nov humana, regulación por disminución que puede representar un elemento clave en la nefrogénesis 25 normal y tumoral. Martinerie y col., Oncogene, 12: 1479-1492 (1996).

[0003] Los diferentes miembros de la familia CCN interactúan con diversas macromoléculas solubles o 30 asociadas a la matriz en glicoconjungados sulfatados particulares (Bork, FEBS Letters, 327:125-130). Esta interacción se usó para purificar Cyr61 y CTGF por cromatografía de afinidad en heparina-agarosa (Frazier y col., J. Invest. Dermatol., 107:404-411 (1996); Kireeva y col., Mol. Cell. Biol., 16:1326-1334 (1996)). Cyr61 es secretado y se asocia a tanto la matriz extracelular como a la superficie celular debido a su afinidad por sulfato de heparano (Yang y col., 35 Cell. Growth Diff., 2: 351-357 (1991)). Recientemente se mostró que WISP-1 interactuaba con decorina y biglicano, dos proteoglicanos de sulfato de dermatano secretados. (Desnoyers, y col., J. Biol. Chem., 276:47599-47607 (2001)).

[0004] La proteína murina ELM1 se identificó recientemente en células de baja metástasis. Hashimoto y col., 40 J. Exp. Med., 187:289-296 (1998). El gen *elm1*, un ortólogo de ratón de WISP-1 desvelado más adelante, es otro miembro de la familia de genes CNN. Suprime el crecimiento y la metástasis de tumores *in vivo* de células de melanoma murino K-1735. Otro artículo reciente sobre rCop-1, el ortólogo de rata de WISP-2 descrito más adelante, describe la pérdida de expresión de este gen después de la transformación de células. Zhang y col., Mol. Cell. Biol., 18:6131-6141 (1998).

[0005] Los Wnt están codificados por una gran familia de genes cuyos miembros han sido encontrados en 45 gusanos redondos, insectos, peces cartilaginosos y vertebrados. Holland y col., Dev. Suppl., 125-133 (1994). Se cree que los Wnt funcionan en una variedad de procesos de desarrollo y fisiológicos ya que muchas especies diversas tienen múltiples genes *Wnt* conservados. McMahon, Trends Genet., 8: 236-242 (1992); Nusse y Varmus, Cell, 69: 1073-1087 (1992). Los genes *Wnt* codifican glicoproteínas secretadas que se cree funcionan como señales paracrinas o autocrinas activas en varios tipos de células primitivas. McMahon, anteriormente (1992); Nusse y 50 Varmus, anteriormente (1992). La familia del factor de crecimiento Wnt incluye más de diez genes identificados en el ratón (*Wnt*-1, -2, -3A, -3B, -4, -5A, -5B, -6, -7A, -7B, -8A, -8B, -10B, -11, -12 y -13) (véanse, por ejemplo, Gavin y col., Genes Dev., 4: 2319-2332 (1990); Lee y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 2268-2272 (1995); Christiansen y col., Mech. Dev., 51: 341-350 (1995)) y al menos nueve genes identificados en el ser humano (*Wnt*-1, -2, -3, -5A, -5B, -6, -7A, -7B, -8B, -10B y -11) por clonación de ADNc. Véase, por ejemplo, Vant Veer y col., Mol. Cell. Biol., 4: 2532-2534 (1984).

[0006] El proto-oncogén *Wnt-1* (*int-1*) se identificó originariamente a partir de tumores mamarios inducidos por 60 el virus del tumor mamario de ratón (MMTV) debido a una inserción de la secuencia de ADN vírico. Nusse y Varmus, Cell, 31: 99-109 (1982). En ratones adultos, el nivel de expresión de ARNm de *Wnt-1* se detecta sólo en los testículos durante etapas tardías del desarrollo de esperma. La proteína Wnt-1 tiene aproximadamente 42 KDa y contiene una región hidrófoba del extremo amino que puede funcionar como una secuencia señal para la secreción (Nusse y Varmus, anteriormente, 1992). La expresión de *Wnt-2* se detecta en tejidos fetales y adultos de ratón y su distribución no se solapa con el patrón de expresión para *Wnt-1*. *Wnt-3* está asociado a tumorigénesis mamaria de

- ratón. La expresión de Wnt-3 en embriones de ratón se detecta en los tubos neurales y en las yemas de las extremidades. Los transcritos de *Wnt-5a* se detectan en las extremidades delanteras y traseras en desarrollo a los 9,5 a 14,5 días y los mayores niveles se concentran en ectodermo apical en la punta distal de las extremidades. Nusse y Varmus, anteriormente (1992). Recientemente se describió un factor de crecimiento de Wnt, llamado Wnt-x, (documento WO95/17416) junto con la detección de la expresión de *Wnt-x* en tejidos óseos y en células derivadas de hueso. Por tanto, se describió la función de Wnt-x en el mantenimiento de osteoblastos maduros y el uso del factor de crecimiento Wnt-x como agente terapéutico o en el desarrollo de otros agentes terapéuticos para tratar enfermedades relacionadas con los huesos.
- 5 [0007] Los Wnt pueden desempeñar una función en la señalización local de células. Peifer y Polakis, *Science*, 287:1606-1609 (2000). Los estudios bioquímicos han mostrado que gran parte de la proteína Wnt secretada puede encontrarse asociada a la superficie celular o matriz extracelular en vez de libremente difusible en el medio. Papkoff y Schryver, *Mol. Cell. Biol.*, 10: 2723-2730 (1990); Bradley y Brown, *EMBO J.*, 9: 1569-1575 (1990).
- 10 [0008] Los estudios de mutaciones en genes *Wnt* han indicado una función para los *Wnt* en el control del crecimiento y el diseño de tejido. En *Drosophila*, *wingless* (*wg*) codifica un gen relacionado con *Wnt* (Rijsewijk y col., *Cell*, 50: 649-657 (1987)) y mutaciones de *wg* alteran el patrón de ectodermo embrionario, neurogénesis y excrecencia de disco imaginal. Morata y Lawrence, *Dev. Biol.*, 56: 227-240 (1977); Baker, *Dev. Biol.*, 125: 96-108 (1988); Klingensmith y Nusse, *Dev. Biol.*, 166: 396-414 (1994). En *Caenorhabditis elegans*, *lin-44* codifica un homólogo de Wnt que se requiere para las divisiones de células asimétricas. Herman y Horvitz, *Development*, 120: 1035-1047 (1994). Las mutaciones de genes inactivados en ratones han mostrado que los Wnt son esenciales para el desarrollo cerebral (McMahon y Bradley, *Cell*, 62: 1073-1085 (1990); Thomas y Cappelli, *Nature*, 346: 847-850 (1990)), y la excrecencia de primordios embrionarios para riñón (Stark y col., *Nature*, 372: 679-683 (1994)), yema de la cola (Takada y col., *Genes Dev.*, 8: 174-189 (1994)) y yema de las extremidades. Parr y McMahon, *Nature*, 374: 350-353 (1995). La expresión en exceso de *Wnt-1* en la glándula mamaria puede producir hiperplasia mamaria (McMahon, anteriormente (1992); Nusse y Varmus, anteriormente (1992)), desarrollo alveolar precoz (Bradbury y col., *Dev. Biol.*, 170: 553-563 (1995)) y adenocarcinomas mamarios (Li y col., *Oncogene*, 19:1002-1009 (2000)).
- 15 [0009] *Wnt-5a* y *Wnt-5b* se expresan en el mesodermo posterior y lateral y el mesodermo extraembrionario del embrión murino de 7-8 días. Gavin y col., anteriormente (1990). Estos dominios embrionarios contribuyen a la región AGM y tejidos de saco vitelino de los que se derivan precursores hematopoyéticos multipotentes y HSC. Dzierzak y Medvinsky, *Trends Genet.*, 11: 359-366 (1995); Zon y col., en Gluckman y Coulombel, ed., *Colloque, INSERM*, 235: 17-22 (1995), presentado en the Joint International Workshop on Foetal and Neonatal Hematopoiesis and Mechanism of Bone Marrow Failure, París, Francia, 3-6 de abril de 1995; Kanatsu y Nishikawa, *Development*, 122: 823-830 (1996). Se han detectado *Wnt-5a*, *Wnt-10b* y otros *Wnt* en yemas de las extremidades que indica posibles funciones en el desarrollo y el diseño del microentorno óseo temprano como se muestra para *Wnt-7b*. Gavin y col., anteriormente (1990); Christiansen y col., *Mech. Devel.*, 51: 341-350 (1995); Parr y McMahon, anteriormente (1995).
- 20 [0010] Para una revisión sobre Wnt véase Cadigan y Nusse, *Genes & Dev.*, 11: 3286-3305 (1997).
- 25 [0011] Pennica y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95:14717-14722 (1998) describen la clonación y caracterización de dos genes, *WISP-1* y *WISP-2*, que están regulados por incremento en la línea celular epitelial mamaria de ratón C57MG transformada por *Wnt-1*, y un tercer gen relacionado, *WISP-3*. (Véanse también el documento WO 99/21998 publicado el 6 de mayo de 1999; el documento WO 99/21999 publicado el 6 de mayo de 1999). Pennica y col. informan que estos genes *WISP* pueden estar aguas debajo de la señalización de *Wnt-1* y que niveles anómalos de la expresión de *WISP* en cáncer de colon pueden desempeñar una función en tumorigénesis de colon. *WISP-1* se ha identificado recientemente como un gen regulado por β -catenina y la caracterización de su actividad oncogénica demostró que *WISP-1* puede contribuir a la tumorigénesis mediada por β -catenina (Xu y col., *Gene & Develop.*, 14:585-595 (2000)). La expresión en exceso de *WISP-1* en células de riñón de rata normal (NRK-49F) indujo transformación morfológica, crecimiento celular acelerado y densidad de saturación potenciada. Además, estas células forman fácilmente tumores cuando se inyectan en ratones desnudos sugiriendo que *WISP-1* puede desempeñar alguna función en la tumorigénesis (Xu y col., anteriormente, 2000). *WISP-1* también está expresada en exceso en líneas celulares de cáncer de mama humano transformadas y en aproximadamente el 47% de cáncer de mama humano primario asociado a ciertas características avanzadas. Xie y col., *Cancer Res.*, 61:8917-8923 (2001); Saxena y col., *Mol. Cell Biochem.*, 228:99-104 (2001); Michaelson y col., *Oncogene*, 20:5093-5099 (2001). También se ha informado que una variante de *WISP-1* se expresa en exceso en aproximadamente el 86% de células de carcinoma gástrico escirroso humano. Tanaka y col., *Oncogene*, 20:5525-5532 (2001).
- 30 [0012] Hurvitz y col., *Nature Genetics*, 23:94-97 (1999) describen un estudio en el que participa *WISP3* en el que se encontró que nueve mutaciones diferentes de *WISP3* en individuos sin parentesco estaban asociadas a trastorno esquelético recesivo autosómico, displasia pseudorreumatoide progresiva (PPD). La expresión de *WISP3* por RT-PCR se observó por Hurvitz y col. en sinoviocitos humanos, condrocitos de cartílago articular y células progenitoras mesenquimatosas derivadas de médula ósea.
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60

[0013] La solicitud PCT WO98/21236 publicada el 22 de mayo de 1998 desvela un gen 3 de factor de crecimiento tejido conjuntivo humano (CTGF-3) que codifica un miembro de 26 kD de la superfamilia del factor de crecimiento. El documento WO98/21236 desvela que la secuencia de aminoácidos de CTGF-3 se dedujo a partir de un clon de ADNc de osteoblasto humano y que CTGF-3 se expresó en múltiples tejidos como ovario, testículo, 5 corazón, pulmón, músculo esquelético, médula adrenal, corteza adrenal, timo, próstata, intestino delgado y colon.

[0014] El ácido hialurónico (también denominado en lo sucesivo HA, hialuronato o hialuronano) es reconocido en la bibliografía como un componente importante de la matriz extracelular (véanse, por ejemplo, Hardingham y col., FASEB J., 6:861-870 (1992); Laurent y col., FASEB J., 6:2397-2404 (1992)). El HA es un componente de la piel y 10 tejidos mesenquimatosos en el que se facilita la migración de células durante la cicatrización, inflamación y morfogénesis embrionaria. (Knudson y col., FASEB J., 7:1233-1241 (1993); Knudson y col., CIBA Found. Symp., 143:150-169 (1989)). También se ha informado que el HA desempeña una función en ciertos tipos de metástasis. 15 (Naor y col., CD44: Structure, Function and Association with the Malignant Process, Advances in Cancer Research, Academic Press (1997), páginas 241-319). Las mayores concentraciones de HA se encuentran en la piel y el sistema musculoesquelético que representan más del 50% del HA total del cuerpo. (Banerji y col., J. Cell Biol., 144:789-801 (1999)).

[0015] Diversos investigadores han informado de receptores que se unen a HA. Uno de los receptores identificados para HA es la proteína CD44. (Véanse, por ejemplo, Culty y col., J. Cell Biology, 111:2765-2774 (1990); 20 Aruffo y col., Cell, 61:1303-1313 (1990); Naor y col., CD44: Structure, Function and Association with the Malignant Process, Advances in Cancer Research, Academic Press (1997), páginas 241-319); Ropponen y col., Cancer Res., 58:342-347 (1998); Masaki y col., Cancer, 92:2539-2546 (2001). CD44 es una familia de glicoproteínas de la superficie de la célula generada a partir de un único gen por corte y empalme alternativo y glicosilación diferencial. 25 (Wielenga y col., Am. J. Pathology, 154:515-523 (1999)). Se cree que CD44 funciona como un receptor de adhesión a células, uniendo las moléculas extracelulares, específicamente hialuronato, a la célula y el citoesqueleto (Wielenga y col., anteriormente). CD44 se expresa en células epiteliales, mesenquimatosas y linfoides. (Lesley y col., Adv. Immunol., 54:271-335 (1994)). Wielenga y col. informan que la expresión de CD44 puede regularse por la ruta de WNT basándose en ciertos experimentos que analizan la expresión de CD44 en la mucosa intestinal de ratones y seres humanos con defectos genéticos tanto en APC como en Tcf-4. (Wielenga y col., anteriormente).

[0016] Otros receptores de HA caracterizados hasta la fecha incluyen RHAMM (también denominado en lo sucesivo receptor para la motilidad mediada por ácido hialurónico), una proteína intracelular de 58 kD expresada transitoriamente sobre la superficie de linfocitos transformados (Hardwick y col., J. Cell Biol., 117:1343-1350 (1992); Turley y col., Exp. Cell Res., 207:277-282 (1993)). Se informó que la expresión de RHAMM en fibroblastos promovía 30 metástasis y desempeñaba una función importante en la transformación de H-Ras (Hall y col., más adelante).

[0017] Otro receptor que se une a HA se describió por Banerji y col. (Banerji y col., anteriormente). Banerji y col. informan de un receptor sobre las paredes de los vasos linfáticos, denominado en lo sucesivo "LYVB-1", que es un polipéptido de la membrana integral de tipo I de 322 residuos que tiene una similitud del 41% con el receptor 40 CD44. A diferencia del receptor CD44 para HA, la proteína LYVE-1 está ausente en vasos sanguíneos. Además, la layilina (Bono y col., Mol. Biol. Cell. 12:891-900 (2001)) y BARB (Zhou y col., J. Biol. Chem., 275:37733-37741 (2000)) también se describieron como receptores de HA.

[0018] El documento WO2004/003158 desvela procedimientos y composiciones para su uso en modular la actividad del polipéptido WISP-1. Se reivindican antagonistas de WISP-1 que incluyen anticuerpos anti-WISP-1, inmunoadhesinas de WISP-1 y variantes de WISP-1; sin embargo, el documento WO2004/003158 no muestra 45 actividad de antagonista de un polipéptido del dominio 1 de WISP-1 o cualquier otra variante o inmunoadhesina de WISP-1 para su uso en un procedimiento para inhibir o neutralizar la inducción de WISP-1.

50 Resumen de la invención

[0019] El solicitante ha encontrado sorprendentemente que WISP-1 puede inducir expresión de ARNm de HAS2 (hialuronano sintasa 2), CD44 y RHAMM, síntesis de proteína CD44 y secreción de HA. La inducción o secreción de tales moléculas pueden promover o aumentar el crecimiento de células cancerosas, la motilidad y/o el 55 potencial metastásico. Por tanto, la presente divulgación proporciona, por ejemplo, antagonistas de WISP-1 y a procedimientos de uso de tales antagonistas. Los antagonistas descritos en el presente documento encuentran utilidad para, entre otras cosas, diagnóstico *in vitro*, *in situ* o *in vivo* o tratamiento de células cancerosas de mamífero u otras afecciones patológicas asociadas a la inducción o secreción de HAS2, HA, CD44 o RHAMM.

[0020] En realizaciones de la invención se proporcionan antagonistas de WISP-1 aislados para su uso como se define en las reivindicaciones. En realizaciones preferidas, los antagonistas pueden bloquear o neutralizar la inducción por WISP-1 o la secreción de HAS2, HA, CD44 o RHAMM.

[0021] Los antagonistas de WISP-1 contemplados para su uso en la invención incluyen inmunoadhesinas de

WISP-1, variantes de WISP-1 como se definen en las reivindicaciones, formas covalentemente modificadas de las mismas, o proteínas de fusión de las mismas. A título de ejemplo, tales antagonistas pueden incluir WISP-1 pegilado o WISP-1 fusionado con secuencias heterólogas tales como marcas de epítopos o cremalleras de leucina. Los procedimientos contemplan el uso de un único tipo de molécula antagonista o una combinación de dos o más tipos de antagonistas.

[0022] La invención incluye antagonistas de KSP-I para su uso en procedimientos para tratar afecciones o enfermedades patológicas en mamíferos asociadas a o resultantes de WISP-1 que incluyen inducción o secreción de HAS2, HA, CD44 o RHAMM por WISP-1 como se define en las reivindicaciones. En los procedimientos de tratamiento, los antagonistas de WISP-1 pueden administrarse al mamífero que padece tal afección o enfermedad patológica. Por ejemplo, la invención proporciona antagonistas de WISP-1 para su uso en un procedimiento que comprende exponer una célula(s) de mamífero, tal como una célula(s) cancerosa(s), a uno o más antagonistas de WISP-1 en una cantidad eficaz para disminuir, neutralizar o bloquear la inducción por WISP-1 o la secreción de HAS2, HA, CD44 o RHAMM. La célula puede estar en cultivo celular o en un mamífero, por ejemplo, un mamífero que padece, por ejemplo, cáncer.

[0023] La invención también proporciona composiciones que comprenden uno o más antagonistas de WISP-1 para su uso como se define en las reivindicaciones. Opcionalmente, las composiciones de la invención incluirán vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Preferentemente, las composiciones incluirán uno o más antagonistas de WISP-1 en una cantidad que es terapéuticamente eficaz para tratar una afección o enfermedad patológica.

[0024] La divulgación también se refiere a artículos de fabricación y kits La divulgación también se refiere a artículos de fabricación y kits que incluyen uno o más antagonistas de WISP-1.

[0025] En el presente documento se describen procedimientos para realizar ensayos de cribado para identificar moléculas candidatas tales como compuestos de moléculas pequeñas, polipéptidos o anticuerpos que actúan de antagonistas con respecto al bloqueo o la neutralización de la inducción por WISP-1 o secreción de HAS2, HA, CD-44 o RHAMM.

[0026] Realizaciones más particulares de la invención incluyen antagonistas de WISP-1 aislados que inhiben o neutralizan la inducción o secreción de HAS2, HA, CD44 o RHAMM por polipéptido WISP-1 nativo en al menos un tipo de célula de mamífero, seleccionándose dicho antagonista del grupo que consiste en una inmunoadhesina de WISP-1, una variante de WISP-1 como se define en las reivindicaciones, y proteínas de fusión de las mismas.

[0027] La invención también proporciona composiciones que comprenden los antagonistas descritos en el presente documento y un vehículo, opcionalmente el vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable para su uso como se define en las reivindicaciones.

[0028] La invención también proporciona antagonistas de WISP-1 para su uso en inhibir o neutralizar la inducción por WISP-1 o secreción de HAS2, HA, CD44 o RHAMM en células de mamífero que comprende exponer dichas células de mamífero a una cantidad eficaz de antagonista de WISP-1, en el que dicho antagonista de WISP-1 está seleccionado del grupo que consiste en

- a) una inmunoadhesina de WISP-1;
- b) un polipéptido WISP-1 ligado a un polímero no proteináceo seleccionado del grupo que consiste en polietilenglicol, polipropilenglicol y polioxialquileno, y
- c) variante de WISP-1 como se define en las reivindicaciones.

[0029] Las inmunoadhesinas de WISP-1 empleadas en los procedimientos pueden comprender una secuencia de WISP-1 fusionada con una región Fc de una inmunoglobulina.

[0030] En los procedimientos, las células de mamífero pueden comprender células cancerosas, y opcionalmente las células comprenden células de cáncer de colon o colorrectal, células de cáncer de mama, células de cáncer de pulmón o células de cáncer de cerebro (tal como glioma o glioblastoma).

[0031] En otras realizaciones se proporcionan antagonistas de WISP-1 para su uso en procedimientos para tratar cáncer en un mamífero que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad eficaz de antagonista de WISP-1 como se define en las reivindicaciones. Opcionalmente, en dichos procedimientos, el antagonista puede inhibir o neutralizar la inducción o secreción de HAS2, HA, CD44 o RHAMM por el polipéptido WISP-1 humano nativo en al menos un tipo de célula de mamífero y dicho antagonista está seleccionado del grupo que consiste en una inmunoadhesina de WISP-1 y una variante de WISP-1 como se definen en las reivindicaciones. Opcionalmente, el antagonista puede actuar para inhibir el crecimiento de células cancerosas o metástasis de células cancerosas. El cáncer en el mamífero puede comprender células de cáncer de colon o colorrectal, células de cáncer de mama,

células de cáncer de pulmón o células de cáncer de cerebro (tal como glioma o glioblastoma). Opcionalmente, el (los) antagonista(s) empleado(s) en los procedimientos inhibe(n) o reduce(n) el crecimiento o la metástasis de células cancerosas. Por tanto, en los procedimientos, la quimioterapia, la radiación, el profármaco, el agente citotóxico, el agente inhibidor del crecimiento o la citocina también pueden administrarse al mamífero.

5 [0032] En el presente documento se describen anticuerpos que se unen específicamente a uno o más dominios de polipéptido WISP-1 (descrito adicionalmente en los ejemplos más adelante) que comprende los aminoácidos codificados por las secuencias de SEQ ID NO:3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; u 11 en el presente documento. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. Opcionalmente, el anticuerpo monoclonal comprende el anticuerpo 3D11, 11C2, 9C10, 5D4 o 9C11 secretado por el hibridoma depositado con el número de acceso de ATCC PTA-4624, PTA-4628, PTA-4626, PTA-4625 o PTA-4627, respectivamente.

10 [0033] También se describen anticuerpos que se unen al mismo epítopo que el epítopo al que se une el anticuerpo monoclonal 3D11, 11C2, 9C10, 5D4 o 9C11 producido por la línea celular de hibridoma depositada con el número de acceso de ATCC PTA-4624, PTA-4628, PTA-4626, PTA-4625, o PTA-4627, respectivamente.

15 [0034] También se describe la línea celular de hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal 3D11, 11C2, 9C10, 5D4 o 9C11 y se deposita con el número de acceso de ATCC PTA-4624, PTA-4628, PTA-4626, PTA-4625 o PTA-4627, respectivamente, y el anticuerpo monoclonal 3D11, 11C2, 9C10, 5D4 o 9C11 secretado por el hibridoma depositado con el número de acceso de ATCC PTA-4624, PTA-4628, PTA-4626, PTA-4625 o PTA-4627, respectivamente.

20 [0035] También se describen anticuerpos monoclonales anti-WISP-1 aislados que comprenden anticuerpos que se unen al polipéptido WISP-1 e inhiben competitivamente la unión del anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma depositado con el nº de acceso de ATCC PTA-4624, PTA-4628, PTA-4626, PTA-4625 o PTA-4627 a dicho polipéptido WISP-1.

25 [0036] También se describen anticuerpos anti-WISP-1 químéricos o humanizados que se unen específicamente al polipéptido WISP-1 y comprenden (a) una secuencia derivada del anticuerpo 3D11, 11C2, 9C10, 5D4 o 9C11 secretado por el hibridoma depositado con el número de acceso de ATCC PTA-4624, PTA-4628, PTA-4626, PTA-4625 o PTA-4627, respectivamente. Opcionalmente, tales anticuerpos pueden comprender una cadena pesada, cadena ligera o regiones variables derivadas del anticuerpo 3D11, 11C2, 9C10, 5D4 o 9C11.

30 [0037] Los anticuerpos anti-WISP-1 pueden ligarse a uno o más polímeros no proteináceos seleccionados del grupo que está constituido por polietilenglicol, polipropilenglicol, y polioxialquíleno, o a un agente citotóxico o enzima, o a un radioisótopo, compuesto fluorescente o compuesto quimioluminiscente.

Breve descripción de los dibujos

[0038]

40 Las Figuras 1A-1F muestran la promoción de WISP-1 de la producción de hialuronano. Ensayo de exclusión de partículas que demuestra un recubrimiento de hialuronano en la superficie de NRK/WISP-1H (A) y NRK/WISP-1L (B), pero ausente de NRK/control (C). NRK/WISP-1H (D) y NRK/control (E) se tiñeron para hialuronano con bHABP. F, Evolución temporal de la acumulación de HA en medio de NRK/WISP-1H y de NRK/control.

45 Las Figuras 2A-2C muestran que WISP-1 aumenta la expresión de ARNm de HAS2, CD44 y RHAMM y la expresión de proteínas CD44. A, Análisis por RT-PCR en tiempo real de la expresión de ARNm de HAS1, HAS2, HAS3, CD44, RHAMM e hialuronidasa (Hial) en células NRK/WISP-1H, NRK/WISP-1L y NRK/control. Los resultados se facilitan como veces de inducción con respecto a la expresión en células NRK/control. B, Análisis de citometría de flujo de la expresión de CD44 en células NRK/WISP-1H y NRK/control. El área sombreada representa la intensidad de fluorescencia del anticuerpo secundario solo. C, Análisis de transferencia Western de la proteína CD44 en células NRK/WISP-1H y NRK/control. Se usó tinción con actina como control de carga.

50 Las Figuras 3A-3G muestran que la expresión de WISP-1 aumenta la motilidad de células y modifica la morfología celular. Las células NRK/control (A) formaron colonias definidas cuando se sembraron en placa a baja densidad, mientras que las células NRK/WISP-1L (B) y NRK/WISP-1H (C) se dispersaron. NRK/WISP-1H (E) mostró una morfología fusiforme desdiferenciada con lamelipodos en comparación con las células NRK/control (D). F, La migración aleatoria de células NRK/WISP-1H y NRK/control se midió durante 15 horas usando microscopía a intervalos de tiempo. Los resultados representan la distancia de migración promedio típica de células en un campo. G, La motilidad de células NRK/WISP-1H y NRK/control se evaluó por un ensayo de cicatrización de células y se midió después de 15 horas usando microscopía a intervalos de tiempo. Los datos representan los resultados de un experimento típico.

55 Las Figuras 4A-4C muestran que la adición de WISP-1 induce la expresión de ARNm de HAS2 y la migración haptotáctica de células NRK. A, Análisis por RT-PCR en tiempo real de HAS2 y expresión de CD44 en

5 células NRK sembradas sobre superficie recubierta. En ciertos casos, los sustratos recubiertos se incubaron adicionalmente con WISP-1 (tratamiento). Los resultados se facilitan en veces de inducción con respecto a la expresión en células NRK sembradas en placa sobre superficie sin tratar sin recubrir. La parte inferior de los filtros de la cámara de Boyden modificada se recubrieron y las células NRK (B) o las células SW480 (C) se añadieron a la cámara superior. En ciertos casos, las adiciones se hicieron directamente a la cámara inferior. La motilidad de células se evaluó contando las células que migraron al lado inferior del inserto.

10 Las Figuras 5A-5E muestran la expresión en exceso de WISP-1, HAS2 y CD44 y el aumento de la motilidad de células en células C57MG/Wnt-1 y tumores mamarios de ratones transgénicos MMTV-Wnt-1. A, Análisis por RT-PCR en tiempo real de WISP-1, HAS2 y expresión de CD44 en células C57MG/Wnt-1 y C57MG/control. Los resultados se facilitan como veces de inducción con respecto a la expresión en células C57MG/control. B, Análisis de transferencia Western de CD44 contenido en células C57MG/Wnt-1 y C57MG/control. Se usó la tinción con actina como control de carga. C, Las células C57MG/control formaron distintas colonias cuando se sembraron en placa a baja densidad, mientras que las células C57MG/Wnt-1 se dispersaron. Análisis por RT-PCR semicuantitativa de HAS2 (D) y CD44 (E) en tumores mamarios de ratones transgénicos MMTV-Wnt-1. Los resultados se expresan como veces de inducción relativas con respecto a la expresión en tejido de glándula mamaria normal.

15 Las Figuras 6A-6H muestran la expresión de WISP-1, HAS2 y CD44 y la acumulación de HA en tumores mamarios transgénicos MMTV-Wnt-1. Hibridación *in situ* de WISP-1 (A, B) HAS2 (C, D) y CD44 (E, F), inmunohistoquímica de CD44 (G) y tinción fluorescente con bHABP de hialuronano (H) en tumores mamarios de ratón transgénico MMTV-Wnt-1. t, tumor; s, estroma.

20 Las Figuras 7A-7L muestran que la expresión de WISP-1 promueve la colonización de pulmón metastásico y el crecimiento de tumores. El efecto de WISP-1 se analizó inyectando células NRK/control, NRK/WISP-1L o NRK/WISP-1H en la vena de la cola de ratones desnudos. Varias veces después de la inyección, los pulmones se sometieron a obtención de imágenes por MRI (A, D, G, J), se extirparon y se registró su aspecto macroscópico (B, E, H, K) y las características histológicas (C, F, I, L). La gravedad de la invasión pulmonar por tumores se clasificó como normal (A, B, C); grado I (D, E, F); grado II (G, H, I) o grado III (J, K, L).

25 Las Figuras 8A-B muestran que el anticuerpo CD44 evita la metástasis de células NRK/WISP-1H. Las células NRK/WISP-1H ($2,5 \times 10^5$ células) se inyectaron en la vena de la cola de ratones desnudos. Los ratones se trajeron dos veces por semana con 10 mg/kg de un anticuerpo CD44, un anticuerpo de control de isotipo o con tampón solo (PBS). Los pulmones se extirparon después de cuatro semanas para el análisis anatómico macroscópico. Se muestra la imagen de un pulmón normal para comparación.

30 Las Figuras 9A-9C muestran la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:2) y de aminoácidos putativos (SEQ ID NO:1) de WISP-1 humana nativa.

35 La Figura 10 muestra los efectos de la expresión de WISP-1 sobre el potencial metastásico de NRK.

Las Figuras 11A-B muestran las propiedades de unión de anticuerpos de WISP-1 a diversas construcciones y preparaciones de WISP-1.

40 Las Figuras 12A-G muestran diagramas de diversos dominios del polipéptido WISP-1 y los resultados de ensayos realizados para identificar los epítopos reconocidos por los anticuerpos de WISP-1 11C2, 5D4, 9C11 y 3D11, respectivamente. La Figura 12C ilustra la secuencia de aminoácidos proporcionada en SEQ ID NO: 20.

La Figura 13 muestra los resultados de un ensayo realizado para identificar el epítopo reconocido por el anticuerpo de WISP-1 9C10.

45 La Figura 14 muestra los resultados de un ELISA que demuestra la detección de WISP-1 por anticuerpos de WISP-1.

La Figura 15 muestra los resultados de un ensayo de unión ELISA que demuestra que los anticuerpos de WISP-1 que reconocen la región variable de WISP-1 pueden inhibir la unión de WISP-1 a heparina.

50 Las Figuras 16A-B muestran los resultados de un ensayo que detecta la inhibición de haptotaxis de células NRK por anticuerpos de WISP-1 (16A) y una tabla que resume las propiedades y características de anticuerpos de WISP-1 (16B).

Las Figuras 17A-E muestran los resultados de un estudio *in vivo* de los efectos de anticuerpos de WISP-1. Después de 3 semanas, la gravedad de las lesiones encontradas en animales tratados con el anticuerpo de WISP-1 se había atenuado enormemente en comparación con el control (Fig. 17 a, b). El número de nódulos y el área promedio de los focos metastásicos encontrados en ratones tratados con anticuerpos de WISP-1 (n=5) se redujeron en comparación con animales tratados con un anticuerpo de control (Fig. 17 c, d). El área pulmonar total cubierta por las lesiones se redujo el 82-97% en comparación con animales tratados con un anticuerpo de control de isotipo (Fig. 17e).

55 La Figura 18 es un diagrama de barras que muestra la expresión de WISP-1 en líneas celulares 4T1/control, 4T1/WISP-1L, 4T1/WISP-1H, NRK/control, NRK/WISP-1L y WISP-1H como se mide por RT-PCR semicuantitativa (Taqman).

60 La Figura 19 muestra los resultados de un ensayo *in vitro* en la formación de colonias de líneas celulares 4T1/control, 4T1/WISP-1L y 4T1/WISP-1H.

La Figura 20 muestra los resultados de un ensayo *in vitro* que mide el índice de invasión usando un sistema de cámara de Boyden modificado con Matrigel y las líneas celulares 4T1/control, 4T1/WISP-1L y 4T1/WISP-1H.

Las Figuras 21A-B muestran los efectos de expresión de WISP-1 sobre la tumorigénesis de células epiteliales mamarias. El efecto de WISP-1 se analizó inyectando células 4T1/control 1, 4T1/control 2, 4T1/WISP-1L o 4T1/WISP-1H en ratones Balb/C. Se informa el volumen tumoral (21A) y el peso tumoral (21B).

5 La Figura 22 es un diagrama de barras que ilustra la expresión relativa de HAS2 y CD44 en tumores formados por las células 4T1/control, 4T1/WISP-1L y 4T1/WISP-1H inoculadas.

10 Las Figuras 23A-F ilustran los efectos de WISP-1 sobre la metástasis de células epiteliales mamarias evaluada *in vivo* inoculando células 4T1 en bolas adiposas mamarias de ratón y examinando el grado de propagación metastásica por tomografía microcomputerizada e histología. Después de 31 días, los ratones inoculados con células 4T1/WISP-1L o 4T1/WISP-1H tenían extensas metástasis de pulmón (Fig. 23b y 23d) en comparación con los ratones inyectados con 4T1/control (Fig. 23a y 23c). Usando inmunohistoquímica también se observó que los focos metastásicos pulmonares de 4T1/WISP-1 expresaron altos niveles de CD44 (Fig. 23e). En estos tumores, CD44 estaba localizado en la membrana plasmática de las células 4T1/WISP-1 (Fig. 23f).

15 La Figura 24A muestra la expresión de WISP-1 en líneas celulares NRK/control, NRK/WISP-1_1234, NRK/WISP-1_134, NRK/WISP-1_234, NRK/WISP-1_123 y NRK/WISP-1_124 como se mide por RT-PCR semi-cuantitativa (Taqman); los resultados se expresan como veces con respecto a la expresión de WISP-1 en NRK/WISP-1_1234. La Figura 24B ilustra los efectos de estas construcciones sobre la tumorigénesis *in vivo*; los resultados se muestran por los efectos sobre el volumen tumoral.

20 La Figura 25 muestra el análisis histológico de los tumores extirpados citados en la Figura 24 y reveló que las células neoplásicas de los tumores NRK/WISP-1_234 fueron fenotípicamente similares a las células neoplásicas de los tumores NRK/WISP-1_1234. En estos tumores, las células parecieron fibroblásticas, diferenciadas y fusiformes. Las células neoplásicas de tumores NRK/WISP-1_134 fueron fenotípicamente diferentes y parecieron menos diferenciadas, frecuentemente multinucleadas, y tuvieron una rápida tasa mitótica como se demuestra por la presencia de múltiples figuras mitóticas (flechas).

25 La Figura 26 muestra el análisis histológico de los tumores extirpados en el xenoinjerto NRK/WISP-1_134 citado en la Figura 24, y revela que las células neoplásicas invadieron varios vasos sanguíneos adyacentes al tumor.

30 La Figura 27 muestra la expresión como la invasión en veces en comparación con un control en el que células HEK 293 transfectadas con un vector vacío se sembraron en el sistema de cámara de Boyden modificado. Las células 4T1 demostraron un aumento de 4 veces en la invasión cuando las células HEK 293 que expresaban construcciones WISP-1_1234, WISP-1_134 o WISP-123 se sembraron en la cámara inferior.

35 Las Figuras 28A-28B ilustran los efectos del dominio 1 de WISP-1 soluble sobre la invasión de células 4T1 promovida por WISP-1, como se evalúa usando un sistema de cámara de Boyden modificado recubierto con Matrigel. Los resultados se expresan como invasión relativa en veces en comparación con células 4T1/control. WISP-1-dominio-1-His y WISP-1-dominio-1-Fc demostraron una dosis dependiente de la actividad antagonista hacia la invasión de 4T1 promovida por WISP-1.

40 La Figura 29 ilustra un análisis de hibridación *in situ* de tejidos del modelo de xenoinjerto de HPAC de adenocarcinomas pancreáticos humanos para evaluar la expresión de WISP-1.

45 La Figura 30 muestra una gráfica que ilustra los efectos de construcciones de WISP-1 sobre el volumen tumoral en un modelo de ratón sin pelo.

La Figura 31 muestra el análisis de hibridación *in situ* que evalúa la expresión de WISP-1 en adenocarcinomas pancreáticos humanos primarios.

La Figura 32 muestra tinción inmunohistoquímica que evalúa la expresión de WISP-1 en adenocarcinomas de colon primarios.

Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

50 **[0039]** El término “polipéptido WISP” se refiere a la familia de proteínas WISP humanas y de ratón de secuencia nativa y a variantes descritas en el presente documento cuyos genes se inducen al menos por wnt-1. Este término incluye WISP-1 y variantes de la misma. Tales proteínas WISP-1 se describen adicionalmente más adelante y en la solicitud PCT WO99/21998 publicada el 6 de mayo de 1999, el documento US 6.387.657 B1 concedido el 14 de mayo de 2002, y en Pennica y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 95:14717-14722 (1998).

55 **[0040]** Los términos “polipéptido WISP-1”, “homólogo de WISP-1” y variantes gramáticas de los mismos como se usan en el presente documento engloban proteína WISP-1 de secuencia nativa y variantes (que se definen adicionalmente en el presente documento). El polipéptido WISP-1 puede aislarse de una variedad de fuentes tales como de tipos de tejido humano o de otra fuente, o prepararse por procedimientos recombinantes o sintéticos, o mediante cualquier combinación de estas técnicas y similares.

60 **[0041]** El término “polipéptido WISP-1 de secuencia nativa” comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido WISP-1 derivado de la naturaleza. Tales polipéptidos WISP-1 de secuencia nativa pueden aislarse de la naturaleza o pueden producirse por medios recombinantes o sintéticos. El

5 término “polipéptido WISP-1 de secuencia nativa” engloba específicamente formas truncadas o secretadas que se producen naturalmente de un polipéptido WISP-1 desvelado en el presente documento, formas variantes que se producen naturalmente (por ejemplo, formas cortadas y empalmadas alternativamente o variantes de corte y empalme) y variantes alélicas que se producen naturalmente de un polipéptido WISP-1. El polipéptido WISP-1 de secuencia nativa puede ser un polipéptido WISP-1 humano de secuencia nativa maduro o de longitud completa que comprende los aminoácidos 23 a 367 de la Figura 9 o los aminoácidos 1 a 367 de la Figura 9, respectivamente, con o sin metionina del extremo N.

10 [0042] El polipéptido WISP-1 de secuencia nativa puede ser el polipéptido WISP-1 humano de secuencia nativa de longitud completa o maduro que comprende los aminoácidos 23 a 367 o 1 a 367 de la Figura 9 en la que el residuo de valina en la posición 184 o el residuo de alanina en la posición 202 ha/han sido cambiado(s) por un residuo de isoleucina o de serina, respectivamente, con o sin metionina del extremo N. El polipéptido WISP-1 de secuencia nativa puede ser el polipéptido WISP-1 humano de secuencia nativa de longitud completa o maduro que comprende los aminoácidos 23 a 367 o 1 a 367 de la Figura 9 en la que el residuo de valina en la posición 184 y el residuo de alanina en la posición 202 ha/han sido cambiado(s) por un residuo de isoleucina o de serina, respectivamente, con o sin metionina del extremo N.

15 [0043] El polipéptido WISP-1 de secuencia nativa puede ser uno que está codificado por una secuencia de nucleótidos que comprende una de las variantes de corte y empalme de WISP-1 humana u otra de secuencia nativa que incluye SEQ ID NOS:23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29 mostradas en el documento WO99/21998, con o sin una metionina del extremo N.

20 [0044] El término “variante de WISP-1” significa un polipéptido WISP-1 activo como se define más adelante que tiene al menos aproximadamente el 80%, preferentemente al menos aproximadamente el 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, más preferentemente al menos aproximadamente el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, lo más preferentemente al menos aproximadamente el 95%, 96%, 97%, 98% o el 99% de identidad de secuencias de aminoácidos con WISP-1 madura humana que tiene la secuencia de aminoácidos deducida mostrada en la Fig. 9, o un fragmento soluble de la misma. Tales variantes incluyen, por ejemplo, polipéptidos WISP-1 en los que uno o más residuos de aminoácidos se añaden al, o se delecionan del, extremo N o C de las secuencias de longitud completa o maduras de la Figura 9, o polipéptidos WISP-1 en los que uno o más residuos de aminoácidos se insertan o se delecionan de la secuencia interna o dominios del polipéptido, incluyendo variantes de otras especies, pero excluye un polipéptido WISP-1 de secuencia nativa. Preferentemente, una variante tal actúa de antagonista, como se define más adelante.

25 [0045] Un “dominio extracelular”, “ECD” o proteína “secretada” se refiere a una forma de un polipéptido que está esencialmente libre de cualquier dominio transmembrana y citoplásmico. Una forma “secretada” de una proteína o polipéptido puede o puede no incluir una secuencia señal.

30 [0046] “Condiciones rigurosas” son aquellas que (1) emplean baja fuerza iónica y alta temperatura para lavar, por ejemplo, cloruro sódico 0,015 M/citrato de sodio 0,0015 M/dodecilsulfato de sodio al 0,1% a 50°C; (2) emplean durante la hibridación un agente desnaturalizante tal como formamida, por ejemplo, 50% (vol/vol) de formamida con albúmina de suero bovino al 0,1%/Ficoll al 0,1%/polivinilpirrolidona al 0,1%/tampón fosfato de sodio 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato de sodio 75 mM a 42°C; (3) emplean formamida al 50%, 5 x SSC (NaCl 0,75 M, citrato de sodio 0,075 M), fosfato de sodio 50 mM (pH 6,8), pirofosfato de sodio al 0,1%, 5 x disolución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonicado (50 µg/ml), SDS al 0,1% y sulfato de dextrano al 10% a 42°C, con lavados a 42°C en 0,2 x SSC y SDS al 0,1%; o (4) emplean un tampón de sulfato de dextrano al 10%, 2 x SSC (cloruro sódico/citrato de sodio) y formamida al 50% a 55°C, seguido por un lavado de alta rigurosidad constituido por 0,1 x SSC que contiene EDTA a 55°C.

35 [0047] “Condiciones moderadamente rigurosas” se describen en Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) e incluyen el uso de una disolución de lavado y condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica y SDS en porcentaje) menos rigurosas que las descritas anteriormente. Un ejemplo de condiciones moderadamente rigurosas es una condición tal como incubación durante la noche a 37°C en una disolución que comprende: formamida al 20%, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato de trisodio 15 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), 5 x disolución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10% y 20 mg/ml de ADN de esperma de salmón cortado desnaturalizado, seguido de lavado de los filtros en 1 x SSC a aproximadamente 37-50°C. El experto reconocerá cómo ajustar la temperatura, fuerza iónica, etc., según sea necesario para adaptar factores tales como la longitud de sonda y similares.

40 [0048] “Aislado” cuando se usa para describir los diversos polipéptidos desvelados en el presente documento significa polipéptido que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que normalmente podrían interferir con los usos diagnósticos o terapéuticos para el polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En realizaciones preferidas, el polipéptido se purificará (1) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos del extremo N o internos usando un secuenciador de taza giratoria, o (2) hasta homogeneidad por SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras o

reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción con plata. El polipéptido aislado incluye polipéptido *in situ* dentro de células recombinantes, ya que al menos un componente del entorno natural de WISP no estará presente. Generalmente, sin embargo, el polipéptido aislado se preparará por al menos una etapa de purificación.

5 [0049] El término "secuencias de control" se refiere a secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante operativamente ligada en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariotas incluyen, por ejemplo, una secuencia promotora, opcionalmente una operadora, y un sitio de unión a ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

10 [0050] El ácido nucleico está "operativamente ligado" cuando está colocado en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o líder secretor está operativamente ligado a ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está operativamente ligado a una secuencia codificante si afecta la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está operativamente ligado a una secuencia codificante si está posicionado de forma que facilite la traducción. Generalmente, "operativamente ligado" significa que las secuencias de ADN que están ligadas son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. La ligación se lleva a cabo por ligación en sitios de restricción convenientes. Si no existen tales sitios, los adaptadores o ligadores de oligonucleótidos sintéticos se usan según la práctica convencional.

15 [0051] Un "liposoma" es una pequeña vesícula compuesta por diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivo que es útil para la administración de un fármaco (tal como la insulina y las variantes de insulina desveladas en el presente documento) a un mamífero. Los componentes del liposoma están comúnmente dispuestos en una formación de bicapa similar a la disposición de lípidos de membranas biológicas.

20 [0052] Los términos "aminoácido" y "aminoácidos" se refieren a todos los L-alfa-aminoácidos que se producen naturalmente. Esta definición pretende incluir norleucina, ornitina y homocisteína. Los aminoácidos se identifican o bien por las designaciones de una sola letra o bien de tres letras:

Asp	D	ácido aspártico	Ile	I	isoleucina
Thr	T	treonina	Leu	L	leucina
Ser	S	serina	Tyr	Y	tirosina
Glu	E	ácido glutámico	Phe	F	fenilalanina
Pro	P	prolina	His	H	histidina
Gly	G	glicina	Lys	K	lisina
Ala	A	alanina	Arg	R	arginina
Cys	C	cisteína	Trp	W	triptófano
Val	V	valina	Gln	Q	glutamina
Met	M	metionina	Asn	N	asparagina

[0053] En la lista de secuencias y figuras pueden emplearse ciertas otras designaciones de una sola letra o de tres letras para referirse a e identificar dos o más aminoácidos o nucleótidos en una posición dada en la secuencia.

35 [0054] "Identidad de secuencias de aminoácidos en porcentaje (%)" con respecto a las secuencias de polipéptidos identificadas en el presente documento se define como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en una secuencia de polipéptidos tal identificada en el presente documento, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para lograr la identidad de secuencias en porcentaje máxima, y sin considerar sustituciones conservativas como parte de la identidad de secuencias. El alineamiento con el fin de determinar la identidad de secuencias de aminoácidos en porcentaje puede lograrse de diversas formas que están dentro de la destreza en la materia, por ejemplo, usando software informático públicamente disponible tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR). Aquellos expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para medir el alineamiento que incluyen cualquier algoritmo necesario para lograr el alineamiento máximo con respecto a la longitud completa de las secuencias que se comparan. Sin embargo, para los fines en el presente documento, los valores de identidad de secuencias de aminoácidos en % se obtienen como se describe más adelante usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2, en el que el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se proporciona en la tabla más adelante. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue escrito por Genentech, Inc. y el código fuente mostrado en la tabla más adelante ha sido presentado con documentación de usuario en la oficina de derechos de autor de EE.UU., Washington D.C., 20559, en la que está registrado bajo el nº de acceso de derechos de autor de EE.UU. TXU510087. El programa ALIGN-2 está públicamente disponible por Genentech, Inc., South San Francisco, California o puede compilarse a partir del código fuente proporcionado en la tabla más adelante. El programa ALIGN-2 debería compilarse para uso en un sistema

operativo UNIX, preferentemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias están fijados por el programa ALIGN-2 y no varían.

[0055] El término “epítopo marcado” cuando se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido químérico que comprende un polipéptido fusionado a un “polipéptido de marca”. El polipéptido de marca tiene suficientes residuos para proporcionar un epítopo contra el que puede prepararse un anticuerpo. El polipéptido de marca también es casi preferentemente único, de manera que el anticuerpo no reacciona sustancialmente de forma cruzada con otros epítopos. Los polipéptidos de marca adecuados tienen generalmente al menos seis residuos de aminoácidos y normalmente entre aproximadamente 8 y 50 residuos de aminoácidos (preferentemente, entre aproximadamente 10 y 20 residuos de aminoácidos).

[0056] Como se usa en el presente documento, el término “inmunoadhesina” designa moléculas similares a anticuerpos que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una “adhesina”) con las funciones efectoras de dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es distinta del sitio de reconocimiento y de unión a antígeno de un anticuerpo (es decir, es “heterólogo”) y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina. La parte de adhesina de una molécula de inmunoadhesina normalmente es una secuencia de aminoácidos contigua que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia de dominio constante de inmunoglobulina en la inmunoadhesina puede obtenerse a partir de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3, o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 y IgA-2), IgE, IgD o IgM.

[0057] El término “antagonista” se usa en el sentido más extenso e incluye cualquier molécula que bloquee, inhiba o neutralice parcialmente o completamente una o más actividades biológicas del polipéptido WISP-1 *in vitro*, *in situ* o *in vivo*. Ejemplos de tales actividades biológicas de polipéptidos WISP-1 incluyen inducción o secreción de HAS2, HA, CD44 o RHAMM en al menos un tipo de célula de mamífero. Un antagonista puede actuar de un modo directo o indirecto. Por ejemplo, el antagonista puede actuar para bloquear, inhibir o neutralizar parcialmente o completamente una o más actividades biológicas del polipéptido WISP-1 *in vitro*, *in situ* o *in vivo*, por ejemplo, como resultado de su unión directa al polipéptido WISP-1. El antagonista también puede actuar indirectamente para bloquear, inhibir o neutralizar parcialmente o completamente una o más actividades biológicas del polipéptido WISP-1 *in vitro*, *in situ* o *in vivo* como resultado de, por ejemplo, bloqueo o inhibición de otra molécula efectora.

[0058] El término “antagonista de WISP-1” se refiere a cualquier molécula que bloquee, inhiba o neutralice parcialmente o completamente una actividad biológica de WISP-1 e incluye, pero no se limita a, anticuerpos, inmunoadhesinas, inmunoadhesinas WISP-1, proteínas de fusión WISP-1, formas covalentemente modificadas de WISP-1, variantes de WISP-1 y proteínas de fusión de las mismas, anticuerpos de WISP-1 y formas de oligómeros superiores de WISP-1 (dímeros, agregados) o formas homo o heteropoliméricas de WISP-1. Para determinar si una molécula antagonista de WISP-1 bloquea, inhibe o neutraliza parcialmente o completamente una actividad biológica de WISP-1 pueden realizarse ensayos para evaluar el (los) efecto(s) de la molécula antagonista sobre, por ejemplo, diversas células (como se describe en los ejemplos) o en un modelo murino *in vivo* de metástasis de cáncer de pulmón. Los diversos ensayos pueden realizarse en formas de ensayo conocidas *in vitro* o *in vivo*. Preferentemente, los antagonistas de WISP-1 empleados en los procedimientos descritos en el presente documento podrán bloquear o neutralizar al menos un tipo de actividad de WISP-1, que puede determinarse opcionalmente en ensayos tal como se describen en el presente documento.

[0059] El término “anticuerpo” se usa en el sentido más extenso y cubre específicamente, por ejemplo, anticuerpos monoclonales individuales, composiciones de anticuerpos con especificidad poliepitópica, anticuerpos monocatenarios y fragmentos de anticuerpos. “Anticuerpo” como se usa en el presente documento incluye moléculas de inmunoglobulinas o de anticuerpos intactas, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (es decir, anticuerpos biespecíficos formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos) y fragmentos de inmunoglobulinas (tales como Fab, F(ab')₂ o Fv), siempre y cuando presenten cualquiera de las propiedades antagonistas deseadas descritas en el presente documento.

[0060] Los anticuerpos son normalmente proteínas o polipéptidos que presentan especificidad de unión a un antígeno específico. Los anticuerpos nativos son normalmente glicoproteínas heterotetrámeras compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Normalmente, cada cadena ligera está ligada a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro regularmente espaciados entre las cadenas. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que los residuos de aminoácidos particulares forman una superficie de contacto entre los dominios variables de cadena ligera y pesada [Chothia y col., J. Mol. Biol., 186:651-663 (1985); Novotny y Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:4592-4596 (1985)]. Las cadenas ligeras de anticuerpos de cualquier especie de

vertebrados pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos llamados kappa y lambda basados en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG y IgM, y varias de éstas puede dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG-1, IgG-2, IgG-3 y IgG-4; IgA-1 y IgA-2. Los dominios constantes de cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman alfa, delta, epsilon, gamma y mu, respectivamente.

[0061] Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una parte de un anticuerpo intacto, generalmente la región de unión a antígeno o región variable del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, diacuerpos, moléculas de anticuerpos monocatenarios y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

[0062] El término "variable" se usa en el presente documento para describir ciertas porciones de los dominios variables que se diferencian en la secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está normalmente uniformemente distribuida por los dominios variables de anticuerpos. Normalmente está concentrada en tres segmentos llamados regiones determinantes de la complementariedad (CDR) o regiones hipervariables tanto en los dominios variables de cadena ligera como de cadena pesada. Las porciones más sumamente conservadas de los dominios variables se llaman la región estructural (FR). Los dominios variables de cadenas pesada y ligera nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, adoptando en buena parte una configuración de hoja β , conectada por tres CDR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de hoja β . Las CDR en cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de anticuerpos [véase Kabat, E.A. y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1987)]. Los dominios constantes no participan directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras tales como participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpo.

[0063] El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones que se producen naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son sumamente específicos estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos (policlonales) convencionales que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante sobre el antígeno.

[0064] Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen anticuerpos químéricos, híbridos y recombinantes producidos por corte y empalme de un dominio variable (incluyendo hipervariante) del anticuerpo de interés con un dominio constante (por ejemplo, anticuerpos "humanizados"), o una cadena ligera con una cadena pesada, o una cadena de una especie con una cadena de otra especie, o fusiones con proteínas heterólogas, independientemente de especies de origen o designación de clases o subclases de inmunoglobulina, además de fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, F(ab')₂ y Fv), siempre y cuando presentan la actividad biológica o propiedades deseadas. Véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 4.816.567 y Mage y col., en Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pág. 79-97 (Marcel Dekker, Inc.: Nueva York, 1987).

[0065] Por tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no debe interpretarse que requiere la producción del anticuerpo por cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que van a usarse pueden prepararse por el procedimiento de hibridoma descrito por primera vez por Kohler y Milstein, Nature, 256:495 (1975), o pueden prepararse mediante procedimientos de ADN recombinante tales como se describen en la patente de EE.UU. nº 4.816.567. Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislar de bibliotecas de fagos generadas usando las técnicas descritas, por ejemplo, en McCafferty y col., Nature, 348:552-554 (1990).

[0066] Formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas químicas específicas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos) que contienen la secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En general, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen 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, los residuos de la región estructural Fv (FR) de la inmunoglobulina humana están sustituidas por residuos no humanos correspondientes. Además, el anticuerpo humanizado puede comprender residuos que ni se encuentran en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de CDR o de la región estructural importadas. Estas modificaciones se hacen para refinar y optimizar adicionalmente el rendimiento de anticuerpos. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente

5 todos de al menos un dominio variable, y normalmente dos, correspondiéndose todas o sustancialmente todas las regiones CDR con 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 comprenderá óptimamente al menos una parte de una región o dominio constante (Fc) de inmunoglobulina, normalmente la de una inmunoglobulina humana.

10 [0067] Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o ha sido preparado usando cualquiera de las técnicas para preparar anticuerpos humanos conocidas en la técnica o como se desvelan en el presente documento. Esta definición de un anticuerpo humano incluye anticuerpos que comprenden al menos un polipéptido de la cadena pesada humana o al menos un polipéptido de la cadena ligera humana, por ejemplo, un anticuerpo que comprende polipéptidos de cadena ligera murina y cadena pesada humana. Los anticuerpos humanos pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en la técnica. En una realización, el anticuerpo humano se selecciona de una biblioteca de fagos en la que la biblioteca de fagos expresa anticuerpos humanos (Vaughan y col. *Nature Biotechnology*, 14:309-314 (1996); Sheets y col. *PNAS*, (USA) 95:6157-6162 (1998)); Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks y col., *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)). Los anticuerpos humanos también pueden prepararse introduciendo loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos, por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena han sido parcialmente o completamente inactivados. Tras la exposición se observa la producción de anticuerpos humanos, que se parece mucho en todos los sentidos a la observada en seres humanos, que incluye transposición de genes, unión y repertorio de anticuerpos. Esta solución se describe, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. nº 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y las siguientes publicaciones científicas: Marks y col., *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992); Lonberg y col., *Nature*, 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368:812-13 (1994); Fishwild y col., *Nature Biotechnology*, 14: 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14: 826 (1996); Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13:65-93 (1995).

15 20 Alternativamente, el anticuerpo humano puede prepararse mediante inmortalización de linfocitos B humanos para producir un anticuerpo dirigidos contra un antígeno diana (tales linfocitos B pueden recuperarse de un individuo o pueden haber sido inmunizados *in vitro*). Véanse, por ejemplo, Cole y col., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner y col., *J. Immunol.*, 147 (1):86-95 (1991); y la patente de EE.UU. nº 5.750.373.

25 30 [0068] El término "región Fc" se usa para definir la región del extremo C de una cadena pesada de inmunoglobulina que puede generarse por digestión con papaina de un anticuerpo intacto. La región Fc puede ser una región Fc de secuencia nativa o una región Fc variante. Aunque pueden variar los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana se define normalmente por alargarse desde un residuo de aminoácido en aproximadamente la posición Cys226, o desde aproximadamente la posición Pro230, hasta el extremo carbonilo de la región Fc (usando en el presente documento el sistema de numeración según Kabat y col., anteriormente). La región Fc de una inmunoglobulina comprende generalmente dos dominios constantes, un dominio CH2 y un dominio CH3, y opcionalmente comprende un dominio CH4.

35 40 [0069] Por "cadena de la región Fc" se indica en el presente documento una de las dos cadenas de polipéptidos de una región Fc.

45 50 [0070] El "dominio CH2" de una región Fc de IgG humana (también denominado en lo sucesivo dominio "C γ 2") normalmente se extiende desde un residuo de aminoácido en aproximadamente la posición 231 hasta un residuo de aminoácido en aproximadamente la posición 340. El dominio CH2 es único porque no está estrechamente apareado con otro dominio. Más bien, dos cadenas de hidratos de carbono ramificadas ligadas a N están interpuestas entre los dos dominios CH2 de una molécula de IgG nativa intacta. Se ha especulado que el hidrato de carbono puede proporcionar un sustituto al apareamiento dominio-dominio y ayudar a estabilizar el dominio CH2. Burton, *Molec. Immunol.*, 22:161-206 (1985). El dominio CH2 en el presente documento puede ser un dominio CH2 de secuencia nativa o dominio CH2 variante.

55 60 [0071] El "dominio CH3" comprende el alargamiento de residuos del extremo C con respecto a un dominio CH2 en una región Fc (es decir, desde un residuo de aminoácido en aproximadamente la posición 341 hasta un residuo de aminoácido en aproximadamente la posición 447 de una IgG). La región CH3 en el presente documento puede ser un dominio CH3 de secuencia nativa o un dominio CH3 variante (por ejemplo, un dominio CH3 con una "protuberancia" introducida en una cadena del mismo y una "cavidad" introducida correspondiente en la otra cadena del mismo; véase la patente de EE.UU. nº 5.821.333). Tales dominios CH3 variantes pueden usarse para preparar anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos) como se describe en el presente documento.

65 [0072] La "región bisagra" se define generalmente como el alargamiento desde aproximadamente Glu216, o aproximadamente Cys226, hasta aproximadamente Pro230 de IgG1 humana (Burton, *Molec. Immunol.*, 22:161-206 (1985)). Las regiones bisagra de otros isotipos de IgG pueden alinearse con la secuencia de IgG1 colocando el primer y el último residuo de cisteína que forman enlaces S-S entre cadenas pesadas en las mismas posiciones. La región bisagra en el presente documento puede ser una región bisagra de secuencia nativa o una región bisagra

variante. Las dos cadenas de polipéptidos de una región bisagra variante retienen generalmente al menos un residuo de cisteína por cadena de polipéptidos, de manera que las dos cadenas de polipéptidos de la región bisagra variante pueden formar un enlace disulfuro entre las dos cadenas. La región bisagra preferida en el presente documento es una región bisagra de secuencia nativa humana, por ejemplo, una región bisagra de IgG1 humana de secuencia nativa.

[0073] Una “región Fc funcional” posee al menos una “función efectora” de una región Fc de secuencia nativa. A título de ejemplo, “funciones efectoras” incluyen unión a C1q; citotoxicidad dependiente de complemento (CDC); unión a receptor Fc; citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de receptores de la superficie de células (por ejemplo, receptor de células B; BCR), etc. Tales funciones efectoras requieren generalmente que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo) y pueda evaluarse usando diversos ensayos conocidos en la técnica para evaluar tales funciones efectoras de anticuerpos.

[0074] Una “región Fc de secuencia nativa” comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc encontrada en la naturaleza. Una “región Fc variante” comprende una secuencia de aminoácidos que se diferencia de una región Fc de secuencia nativa en virtud de al menos una modificación de aminoácidos. Preferentemente, la región Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácidos en comparación con una región Fc de secuencia nativa o con la región Fc de un polipéptido parental, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos, y preferentemente de aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia nativa o en la región Fc del polipéptido parental. La región Fc variante en el presente documento poseerá preferentemente al menos aproximadamente el 80% de identidad de secuencias con una región Fc de secuencia nativa y/o con una región Fc de un polipéptido parental, y lo más preferentemente al menos aproximadamente el 90% de identidad de secuencias con el mismo, más preferentemente al menos aproximadamente el 95% de identidad de secuencias con el mismo.

[0075] La “citotoxicidad celular mediada por anticuerpos” y “ADCC” se refieren a una reacción mediada por células en la que células citotóxicas no específicas que expresan receptores Fc (FcR) (por ejemplo, linfocitos citolíticos espontáneos (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen anticuerpo unido sobre una célula diana y posteriormente producen lisis de la célula diana. Las células primarias para mediar ADCC, los linfocitos NK, sólo expresan Fc γ RIII, mientras que los monocitos expresan Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resumen en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol., 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés puede realizarse un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en las patentes de EE.UU. nº 5.500.362 o 5.821.337. Células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre de periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos espontáneos (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el desvelado en Clynes y col. PNAS (USA), 95:652-656 (1998).

[0076] Las “células efectoras humanas” son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. Preferentemente, las células expresan al menos Fc γ RIII y realizan la función efectora ADCC. Ejemplos de leucocitos humanos que median ADCC incluyen células mononucleares de sangre de periférica (PBMC), linfocitos citolíticos espontáneos (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos; prefiriéndose PBMC y linfocitos NK. Las células efectoras pueden aislarse de una fuente nativa de las mismas, por ejemplo, de sangre o PBMC como se describe en el presente documento.

[0077] Los términos “receptor Fc” y “FcR” se usan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de secuencia nativa. Además, un FcR preferido es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases Fc γ RI, Fc γ RII y Fc γ RIII, que incluyen variantes alélicas y alternativamente formas cortadas y empalmadas de estos receptores. Los receptores Fc γ RII incluyen Fc γ RIIA (un “receptor activador”) y Fc γ RIIB (un “receptor inhibidor”) que tienen secuencias de aminoácidos similares que se diferencian principalmente en los dominios citoplásmicos de los mismos. El receptor activador Fc γ RIIA contiene un motivo de activación de inmunorreceptores basado en tirosina (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor inhibidor Fc γ RIIB contiene un motivo de inhibición de inmunorreceptores basado en tirosina (ITIM) en su dominio citoplásmico (revisado en Daëron, Annu. Rev. Immunol., 15:203-234 (1997)). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol., 9:457-92 (1991); Capel y col., Immunomethods, 4:25-34 (1994); y de Haas y col., J. Lab. Clin. Med., 126:330-41 (1995). Otros FcR que incluyen aquellos que van a identificarse en el futuro están englobados por el término “FcR” en el presente documento. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer y col., J. Immunol., 117:587 (1976); y Kim y col., J. Immunol., 24:249 (1994)).

[0078] La “citotoxicidad dependiente de complemento” y “CDC” se refieren a la lisis de una diana en presencia de complemento. La ruta de activación del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) a una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) complejado con un antígeno consanguíneo. Para

evaluar la activación del complemento puede realizarse un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro y col., *J. Immunol. Methods*, 202:163 (1996).

[0079] Un anticuerpo "madurado por afinidad" es uno con una o más alteraciones en una o más CDR del mismo que dan como resultado una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee esa(s) alteración(es). Los anticuerpos madurados por afinidad preferidos tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares para el antígeno diana. Los anticuerpos madurados por afinidad se producen mediante procedimientos conocidos en la técnica. Marks y col., *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992) describen la maduración por afinidad por barajado de dominios VH y VL. La mutagénesis aleatoria de residuos de CDR y/o de la región estructural se describe por: Barbas y col. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:3809-3813 (1994); Schier y col. *Gene*, 169:147-155 (1995); Yelton y col. *J. Immunol.*, 155:1994-2004 (1995); Jackson y col., *J. Immunol.*, 154(7):3310-9 (1995); y Hawkins y col., *J. Mol. Biol.*, 226:889-896 (1992).

[0080] El término "inmunoespecífico" como se usa en "unión inmunoespecífica de anticuerpos", por ejemplo, se refiere a la interacción de unión específica a antígeno que se produce entre el sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo y el antígeno específico reconocido por ese anticuerpo.

[0081] Los términos "cáncer", "canceroso", "metástasis" y "maligno" se refieren a o describen la afección fisiológica en mamíferos que normalmente se caracteriza por crecimiento celular sin regular. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma que incluye adenocarcinoma, linfoma, blastoma, melanoma, sarcoma y leucemia. Ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer gastrointestinal, linfoma de Hodgkin y de no Hodgkin, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado tal como carcinoma hepático y hepatoma, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial, mieloma (tal como mieloma múltiple), carcinoma de las glándulas salivares, cáncer de riñón tal como carcinoma de células renales y tumores de Wilms, carcinoma de células basales, melanoma, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, cáncer testicular, cáncer de esófago y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello. Los cánceres preferidos para el tratamiento en el presente documento incluyen cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer de pulmón, cáncer de colon o colorrectal, glioma y glioblastoma.

[0082] El término "profármaco" como se usa en esta solicitud se refiere a un precursor o forma derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica para células cancerosas en comparación con el fármaco parental y puede activarse enzimáticamente o convertirse en la forma parental más activa. Véanse, por ejemplo, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" *Biochemical Society Transactions*, 14, pág. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) y Stella y col., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery", *Directed Drug Delivery*, Borchardt y col., (ed.), pág. 247-267, Humana Press (1985). Los profármacos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptidos, profármacos modificados con D-aminoácidos, profármacos glicosilados, profármacos que contienen beta-lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituidos o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituidos, profármacos de 5-fluorocitosina y otros de 5-fluorouridina que pueden convertirse en el fármaco libre citotóxico más activo. Ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden derivatizarse en una forma de profármaco para uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, aquellos agentes quimioterapéuticos descritos más adelante.

[0083] El término "agente citotóxico" como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o produce la destrucción de células. El término pretende incluir isótopos radiactivos (por ejemplo, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos y toxinas tales como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal que incluyen fragmentos y/o variantes de las mismas.

[0084] Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento de afecciones como cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN™); alquilsulfonatos tales como busulfan, improsulfan y piposulfan; aziridinas tales como benzodopa, carbocuona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenlofotoforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecan); briostatina; callistatina; CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos KW-2189 y CBI-TMI); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, ciclofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalan, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos enediína (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina γ_1 y caliqueamicina θ_1 , véase, por ejemplo, Agnew Chem Int'l. Ed. Engl., 33:183-186 (1994); dinemicina, que incluye dinemicina A; una esperamicina; además del cromóforo

neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos de enediína de cromoproteínas relacionadas), aclacinomisin, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (incluyendo morfolino-doxorubicina, cianomorfolinodoxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina y desoxi-doxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potifiromicina, puromicina, quelamicina, rodonubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprín, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiostanol, mepitiostano, testolactona; antiadrenérgicos tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reparadores de ácido fólico tales como ácido frolinico; aceglatona; glucósido aldosfamida; ácido aminolevúlico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; el fornitin; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiurea; lentinan; lonidamina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; molidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilílico; 2-etilhidrazida; procarbazina; PSK®; razoxana; rizoxina; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazonico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazine; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) y doxetaxel (TAXOTERE®, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. En esta definición también están incluidos agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción de hormonas sobre tumores tales como antiestrógenos que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles inhibidores de aromatasa, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (Fareston); y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprorelin y goserelina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

[0085] Un "agente inhibidor del crecimiento" cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, tanto *in vitro* como *in vivo*. Por tanto, el agente inhibidor del crecimiento es uno que reduce significativamente el porcentaje de células que expresan en exceso tales genes en fase S. Ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un sitio distinto de la fase S) tales como agentes que inducen la detención de G1 y la detención de la fase M. Los bloqueadores clásicos de la fase M incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), taxol e inhibidores de topo II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Aquellos agentes que detienen G1 también se extienden a la detención de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazine, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C.

[0086] Puede encontrarse más información en The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs" de Murakami y col. (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente la pág. 13.

[0087] El término "citocina" es un término genérico para proteínas liberadas por una población de células que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Ejemplos de tales citocinas son linfocinas, monocinas y hormonas de polipéptidos tradicionales. Entre las citocinas están incluidas hormonas de crecimiento tales como hormona de crecimiento humana, hormona de crecimiento humana de N-metionilo y hormona de crecimiento bovina; hormona paratiroides; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas de glicoproteínas tales como hormona estimulante del folículo (FSH), hormona estimulante del tiroides (TSH) y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor de necrosis tumoral α y β ; ligando Apo-2 (también denominado en lo sucesivo TRAIL); sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoietina (TPO); factores de crecimiento nerviosos; factor de crecimiento de plaquetas; factores de crecimiento transformantes (TGF) tales como TGF- α y TGF- β ; factor de crecimiento similar a la insulina I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones tales como interferón α , β y gamma; factores estimulantes de colonias (CSF) tales como macrófago-CSF (M-CSF); granulocito-macrófago-CSF (GM-CSF); y granulocito-CSF (G-CSF); interleucinas (IL) tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; y otros factores de polipéptidos que incluyen LSI y el ligando kit (KL). Como se usa en el presente documento, el término citocina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia nativa.

[0088] "Tratamiento" es una intervención realizada con la intención de prevenir el desarrollo o alterar la

5 patología de un trastorno. Por consiguiente, "tratamiento" se refiere tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en el que el objeto es prevenir o ralentizar (aliviar) la afección o trastorno patológico elegido como diana. Aquellos en necesidad de tratamiento incluyen aquellos ya con el trastorno, además de aquellos en los que el trastorno va a prevenirse. En el tratamiento de un trastorno, un agente terapéutico puede disminuir directamente o aumentar la magnitud de respuesta de un componente patológico del trastorno, o hacer que la enfermedad sea más susceptible a tratamiento por otros agentes terapéuticos, por ejemplo, antibióticos, agentes antifúngicos, agentes antiinflamatorios, agentes quimioterapéuticos, etc.

10 [0089] El término "cantidad eficaz" es la concentración mínima de antagonista de WISP-1 que produce, induce o produce o bien una mejora detectable o una reducción de una afección patológica. En un procedimiento para tratar cáncer, una cantidad eficaz es una que produce, induce o produce la reducción del número de células cancerosas o volumen tumoral. Además, una "cantidad terapéuticamente eficaz" es la concentración (cantidad) mínima de antagonista de WISP-1 administrada a un mamífero que sería eficaz en al menos atenuar un síntoma patológico.

15 [0090] Administración "crónica" se refiere a la administración del (de los) factor(es) en un modo continuo a diferencia de un modo de dosis únicas, de manera que se mantenga el efecto (actividad) terapéutico inicial durante un periodo de tiempo prolongado. Administración "intermitente" es el tratamiento que no se hace consecutivamente sin interrupción, sino que es de naturaleza cíclica.

20 [0091] "Mamífero" para fines de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero que incluye seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, para deporte o mascotas tales como perros, caballos, gatos, reses, cerdos, hámsteres, etc. Preferentemente, el mamífero es el ser humano.

25 [0092] Administración "en combinación con" uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

30 [0093] "Vehículos" como se usa en el presente documento incluye vehículos, excipientes, o estabilizadores farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos para la célula o mamífero que se expone a los mismos a las dosificaciones y concentraciones empleadas. Frecuentemente, el vehículo fisiológicamente aceptable es una disolución tamponada acuosa a pH. Ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico; polipéptido de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN[®], polietilenglicol (PEG) y PLURONICS[®], ácido hialurónico (HA).

II. Procedimientos y composiciones de la invención

40 [0094] Como se describe adicionalmente en los ejemplos más adelante, el solicitante ha encontrado sorprendentemente que la expresión ectópica de WISP-1 en fibroblastos desencadenó la producción de HA, concretamente el aumento de la producción de HA indujo su acumulación en la superficie de células y en los medios de cultivo. Se cree que el HA de la superficie de células puede potenciar el crecimiento independiente de anclaje y la tumorigenidad (Kosaki y col., Cancer Res., 59:1141-1145 (1999)) y puede disminuir la inhibición de contacto de proliferación celular, promoviendo así la migración de células (Ichikawa y col., J. Invest. Dermatol., 113:935-939 (1999); Itano y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 99:3609-3614 (2002)). La formación de recubrimientos de hialuronano también guarda relación con el potencial metastásico celular (Zhang y col., Cancer Res., 55:428-433 (1995); Toole y col., J. Biol. Chem., 277:4593-4596 (2002)). El análisis de la expresión de HA sintetas (HAS1, HAS2 y HAS3) reveló que WISP-1 promovió la inducción de HAS2 a la vez que permanecieron constantes los niveles de ARNm de HAS1 y HAS3. HAS2 es la diana principal del factor de crecimiento y la citocina reguló por incremento la síntesis de HA (Pienimaki y col., J. Biol. Chem., 276:20428-20435 (2001)). La expresión ectópica de HAS2 aumenta la secreción de HA e induce la formación de recubrimientos de hialuronano (Kosaki y col., anteriormente). Además, se cree que HAS2 es importante para la transformación mediada por hialuronano de epitelio a mesénquima durante la morfogénesis cardiaca (Camenisch y col., J. Clin. Invest., 106:349-360 (2000)). Debido a que la transición de epitelio a mesénquima también es importante para la invasión y la metástasis tumorales, se postula que HAS2 desempeña una función importante en la progresión de tumores epiteliales (Boyer y col., Biochem. Pharmacol., 60:1091-1099 (2000); Hay, Acta Anat., 154:8-20 (1995); Arias, Cell, 105:425-431 (2001)). Estos resultados indican que la secreción de HA inducida por WISP-1 puede ser importante para la invasión y la metástasis tumorales.

60 [0095] WISP-1 también indujo la expresión de dos receptores de HA, CD44 y RHAMM. Induciendo la expresión de receptores de HA y aumentando la producción de HA, WISP-1 puede activar un bucle autocrino y/o paracrino. La interacción de hialuronano con CD44 y RHAMM promueve la locomoción y proliferación de células *in vitro* y el crecimiento y la metástasis tumorales *in vivo* (Turley y col., J. Biol. Chem., 277:4589-4592 (2002); Sy y col.,

Curr. Top. Microbiol. Immunol., 213:129-153 (1996); Hall y col., J. Neurooncol., 26:221-229 (1995)).

[0096] Los efectos de WISP-1 sobre la migración de células se analizaron en un ensayo de cicatrización de células y por microscopía a intervalos de tiempo, y los datos mostraron que la expresión de WISP-1 promovió la motilidad de células. Además, las células aisladas mostraron un aumento de la migración sugiriendo que la WISP-1 podría actuar mediante un mecanismo autocrino. Sin embargo, la WISP-1 recombinante purificada promovió la expresión de HAS2 y CD44 cuando se unió a una superficie. Esta inducción aumentó adicionalmente cuando la WISP-1 se unió mediante su interacción a decorina. Similarmente, la WISP-1 promovió la motilidad de células cuando estaba unida a la superficie, sugiriendo que WISP-1 también puede actuar mediante un mecanismo paracrino cuando se une a un sustrato. Los ejemplos en el presente documento muestran que la motilidad de células inducida por WISP-1 estaba mediada por CD44, aboliendo la migración con un anticuerpo anti-CD44. La motilidad de células inducida por WISP-1 también se inhibió por anticuerpos de WISP-1. Además, la actividad haptotáctica de WISP-1 no se limitó a un único tipo de células ya que indujo tanto la migración de fibroblastos normales como de células de adenocarcinoma de colon.

[0097] Debido a que se creía que WISP-1 era un efector aguas abajo de Wnt-1, la línea celular C57MG/Wnt-1 se analizó para fenotipos encontrados en células NRK/WISP-1. Consistente con una función para WISP-1 aguas abajo de Wnt-1, las células C57MG/Wnt-1 expresaron en exceso HAS2 y CD44 y tuvieron mayor contenido en proteína de CD44 en comparación con la línea celular parental. Además, las células C57/Wnt-1 se dispersaron espontáneamente en cultivo y demostraron una morfología fusiforme desdiferenciada similar a células NRK/WISP-1H.

[0098] El análisis de expresión también se realizó en un grupo de tumores mamarios MMTV-Wnt-1, y en todos los tumores mamarios de los ratones transgénicos MMTV-Wnt-1 se detectó una elevada expresión de CD44 y HAS2. En estos tumores, la expresión de WISP-1 estaba localizada en los fibroblastos del estroma, mientras que CD44 y HAS2 fueron expresados por células epiteliales tumorales. Aunque fue negativo para la expresión de HAS2, el estroma peritumoral contuvo altos niveles de HA, mientras que el parénquima tumoral sólo se tiñó débilmente para HA. Aunque se acepta generalmente que los fibroblastos son responsables de la producción de HA, el origen del HA del estroma no se conoce definitivamente. Como la expresión de HAS2 sólo se encontró en el parénquima, los resultados experimentales desvelados en el presente documento sugieren que las células tumorales son responsables de la síntesis y la deposición de HA en el estroma. La acumulación de hialuronano en el estroma peritumoral se encuentra frecuentemente en varios tipos de tumores y se informó previamente para adenocarcinomas de ovario, mama, próstata y colon (Ropponen y col., Cancer Res., 58:342-347 (1998); Lipponen y col., Eur. J. Cancer, 37:849-856 (2001); Auvinen y col., Am. J. Patol., 156:529-536 (2000); Anttila y col., Cancer Res., 60:150-155 (2000)). Además, un alto nivel de HA en el estroma se asoció a una escasa diferenciación, comportamiento metastásico y pronóstico desfavorable.

[0099] Debido a que el HA y el CD44 están asociados a invasión tumoral, el potencial metastásico de las células que expresan WISP-1 se evaluó *in vivo*. Después de la inoculación en la cola, las células NRK/WISP-1 colonizaron fácilmente los pulmones de ratones inyectados y formaron tumores invasivos. Las células NRK/WISP-1 presentaron un potencial metastásico significativo, pero no las células NRK. La observación histológica reveló que las células NRK/WISP-1 poblaron la vasculatura e invadieron las vías pulmonares. La colonización del pulmón fue proporcional al número de células inyectado, el tiempo después de la inyección y la expresión de WISP-1. Además, el solicitante encontró que el potencial metastásico era proporcional a los niveles de expresión de CD44 y HAS2, y el tratamiento de ratones inoculados con células NRK/WISP-1H con anticuerpo CD44 o anticuerpo de WISP-1 disminuyó enormemente el número y el tamaño de los tumores en el pulmón. Por tanto, es probable que los niveles de WISP-1 promovieran la colonización del pulmón mediante un mecanismo de hialuronano-CD44. Esto concuerda con informes previos que demuestran la importancia de CD44 y su interacción con HA para el crecimiento, la metástasis y la retención tumorales de células metastásicas para la vasculatura del pulmón (By y col., anteriormente; Kogerman y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 94:13233-13238 (1997)).

[0100] Aunque la activación de la ruta de Wnt por mutaciones de APC o β-catenina puede estar normalmente asociada a cáncer colorrectal, varias líneas de evidencia sugieren que también desempeña una función en otros tipos de cáncer que incluyen adenocarcinoma mamario (Polakie, Genes Dev., 14:1837-1851 (2000); Brown, Breast Cancer Res., 3:351-355 (2001)). Se encontraron truncación de APC y aumento de los niveles de β-catenina en líneas celulares de cáncer de mama humano (Schlosshauer y col., Carcinogenesis, 21:1453-1456 (2000)). Las mutaciones somáticas del gen APC se encontraron en cánceres de mama primarios (Furuuchi y col., Am. J. Patol., 156:1997-2005 (2000)). Además, las mutaciones activadoras de β-catenina promueven adenocarcinomas mamarios de ratón. Michaelson y col., Oncogene, 20:5525-5532 (2001)). Se encontraron niveles elevados de Wnt-1 y β-catenina en carcinomas ductales invasivos de mama y guardaron relación con un mal pronóstico (Lin y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 97:4262-4266 (2000)). Por tanto, es posible que la expresión de WISP-1 encontrada en ciertos adenocarcinomas de mama resultara de la activación de la ruta de Wnt. Los solicitantes también han encontrado por análisis Taqman que WISP-1 está expresada en exceso en cánceres tales como tumores de mama y de la glía.

[0101] Por al menos estas razones se cree que los antagonistas de WISP-1 serán particularmente útiles en el tratamiento y el diagnóstico de diversos trastornos patológicos tales como cáncer. Por consiguiente, la presente invención proporciona antagonistas de WISP-1 para su uso en procedimientos para modular, bloquear o neutralizar la actividad de WISP-1 en células de mamífero que comprende exponer las células a una cantidad deseada de antagonista de WISP-1 como se define en las reivindicaciones. Preferentemente, la cantidad de antagonista de WISP-1 empleada será una cantidad eficaz para reducir o inhibir el crecimiento, la metástasis o la motilidad de células cancerosas. Esto puede llevarse a cabo *in vivo* o *ex vivo*, por ejemplo, según los procedimientos descritos más adelante y en los ejemplos. Afecciones o trastornos a título de ejemplo que van a tratarse con tales antagonistas de WISP-1 incluyen afecciones en mamíferos denominadas clínicamente cáncer.

[0102] En el presente documento también se describen procedimientos de diagnóstico. Por ejemplo, los antagonistas pueden emplearse para detectar cánceres invasivos o metastásicos. La molécula de antagonista puede usarse, por ejemplo, en ensayos para detectar o cuantificar células cancerosas metastásicas en una muestra. Una muestra, tal como células obtenidas de un mamífero, puede incubarse en presencia de un antagonista marcado, y puede realizarse la detección del antagonista marcado unido en la muestra.

[0103] Los antagonistas que pueden emplearse en los procedimientos incluyen, pero no se limitan a, inmunoadhesinas de WISP-1, proteínas de fusión que comprenden WISP-1, formas covalentemente modificadas de WISP-1, variantes de WISP-1 y proteínas de fusión de las mismas. En el presente documento se describen diversas técnicas que pueden emplearse para preparar los antagonistas. Por ejemplo, se describen procedimientos y técnicas para preparar polipéptidos WISP-1. También se describen otras modificaciones de los polipéptidos, y anticuerpos para WISP-1.

[0104] Además del polipéptido WISP-1 de secuencia nativa de longitud completa descrito en el presente documento, se contempla que pueden prepararse variantes del polipéptido WISP-1. Las variantes de WISP-1 pueden prepararse introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN codificante, y/o mediante síntesis del polipéptido deseado. Aquellos expertos en la materia apreciarán que los cambios de aminoácidos pueden alterar procedimientos postraduccionales del polipéptido WISP-1 tales como cambiar el número o la posición de sitios de glicosilación o alterar las características de anclaje a la membrana.

[0105] Las variaciones en los polipéptidos WISP-1 descritos en el presente documento pueden hacerse, por ejemplo, usando cualquiera de las técnicas y pautas para mutaciones conservativas y no conservativas expuestas, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 5.364.934. Las variaciones pueden ser una sustitución, delección o inserción de uno o más codones que codifican el polipéptido que produce un cambio en la secuencia de aminoácidos en comparación con el polipéptido de secuencia nativa. Opcionalmente, la variación es mediante sustitución de al menos un aminoácido con cualquier otro aminoácido en uno o más de los dominios del polipéptido WISP-1. La orientación para determinar qué residuo de aminoácido puede insertarse, sustituirse o deletorarse sin afectar adversamente la actividad deseada puede encontrarse comparando la secuencia del polipéptido WISP-1 con las de moléculas de proteínas conocidas homólogas y minimizando el número de cambios de secuencias de aminoácidos hechos en regiones de alta homología. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser el resultado de sustituir un aminoácido por otro aminoácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas similares tales como la sustitución de una leucina por una serina, es decir, sustituciones de aminoácidos conservativos. Las inserciones o delecciones puede estar opcionalmente en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida puede determinarse haciendo sistemáticamente inserciones, delecciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia y probando las variantes resultantes para la actividad mostrada por la secuencia nativa de longitud completa o madura.

[0106] En el presente documento se proporcionan fragmentos de polipéptidos WISP-1. Tales fragmentos pueden estar truncados en el extremo N o extremo C, o pueden carecer de residuos internos, por ejemplo, cuando se comparan con una proteína nativa de longitud completa. Ciertos fragmentos carecen de residuos de aminoácidos que no son esenciales para una actividad biológica deseada del polipéptido WISP-1.

[0107] Los fragmentos de polipéptidos WISP-1 pueden prepararse por distintas técnicas convencionales. Los fragmentos de péptidos deseados pueden sintetizarse químicamente. Una solución alternativa implica generar fragmentos de polipéptidos por digestión enzimática, por ejemplo, tratando la proteína con una enzima conocida por escindir proteínas en sitios definidos por residuos de aminoácidos particulares, o digiriendo el ADN con enzimas de restricción adecuadas y aislando el fragmento deseado. Todavía otra técnica adecuada implica aislar y amplificar un fragmento de ADN que codifica un fragmento de polipéptido deseado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos que definen los extremos deseados del fragmento de ADN se emplean en los cebadores de 5' y 3' en la PCR.

[0108] En realizaciones particulares, sustituciones conservativas de interés se muestran en la tabla más adelante bajo el encabezamiento de Sustituciones preferidas. Si tales sustituciones producen un cambio en la actividad biológica, entonces se introducen más cambios sustanciales, denominados Sustituciones a título de

ejemplo en la tabla, o como se describe adicionalmente más adelante en referencia a clases de aminoácidos, y los productos se criban.

Tabla

Residuo original	Sustituciones a título de ejemplo	Sustituciones preferidas
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	leu
Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	leu

- 5 [0109] Las modificaciones sustanciales en la función o identidad inmunológica del polipéptido WISP-1 se llevan a cabo seleccionando sustituciones que se diferencian significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto de polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una hoja o conformación helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) la voluminosidad de la cadena lateral. Los residuos que se producen naturalmente se dividen en grupos basándose en propiedades comunes de cadenas laterales:
- (1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
 - (2) hidrófilos neutros: cys, ser, thr;
 - (3) ácidos: asp, glu;
 - (4) básicos: asn, gln, his, lys, arg;
 - (5) residuos que influyen en la orientación de cadenas: gly, pro; y
 - (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

- 20 [0110] Las sustituciones no conservativas implicarán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase. Tales residuos sustituidos también pueden introducirse en los sitios de sustitución conservativa o, más preferentemente, en los restantes sitios (no conservados).

- 25 [0111] Las variaciones pueden hacerse usando procedimientos conocidos en la técnica tales como mutagénesis mediada por oligonucleótidos (dirigida a sitio), exploración con alanina y mutagénesis por PCR. La mutagénesis dirigida a sitio [Carter y col., Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986); Zoller y col., Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987)], la mutagénesis por casete [Wells y col., Gene, 34:315 (1985)], la mutagénesis con selección de restricción [Wells y col., Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 (1986)] u otras técnicas conocidas pueden realizarse en el ADN clonado para producir el ADN variante del polipéptido WISP-1.

- 30 [0112] El análisis de aminoácidos por barrido también pueden emplearse para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua. Entre los aminoácidos por barrido preferidos están aminoácidos neutros relativamente pequeños. Tales aminoácidos incluyen alanina, glicina, serina y cisteína. La alanina es normalmente un aminoácido de barrido preferido entre este grupo porque elimina la cadena lateral más allá del carbono beta y es menos probable que altere la conformación de la cadena principal de la variante [Cunningham y Wells, Science, 244:1081-1085 (1989)]. La alanina también se prefiere normalmente porque es el aminoácido más común. Además, se encuentra frecuentemente tanto en posiciones enterradas como expuestas [Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150:1 (1976)]. Si la sustitución de alanina no proporciona cantidades adecuadas de variante, puede usarse un aminoácido isotópico.

- 40 [0113] Cualquier residuo de cisteína que no participe en el mantenimiento de la conformación apropiada del polipéptido WISP-1 también puede ser sustituido, generalmente por serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar la reticulación anómala. En cambio, el (los) enlace(s) de cisteína puede(n) añadirse al polipéptido WISP-1 para mejorar su estabilidad.

[0114] La descripción más adelante se refiere principalmente a la producción de polipéptidos WISP-1 cultivando células transformadas o transfectadas con un vector que contiene ácido nucleico que codifica el polipéptido WISP-1. Por supuesto, se contempla que pueden emplearse procedimientos alternativos, que son muy conocidos en la técnica, para preparar polipéptidos WISP-1. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos apropiada, o porciones de la misma, puede producirse por síntesis directa de péptidos usando técnicas en fase sólida [véanse, 5 por ejemplo, Stewart y col., Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963)]. La síntesis de proteína *in vitro* puede realizarse usando técnicas manuales o por automatización. La síntesis automatizada puede llevarse a cabo, por ejemplo, usando un sintetizador de péptidos de Applied Biosystems (Foster City, CA) usando las instrucciones del fabricante. Diversas 10 porciones del polipéptido WISP-1 pueden sintetizarse químicamente por separado y combinarse usando procedimientos químicos o enzimáticos para producir el polipéptido WISP-1 deseado. Los procedimientos y técnicas descritos pueden aplicarse similarmente a la producción de variantes de WISP-1, formas modificadas de WISP-1 y anticuerpos de WISP-1.

15 **1. Aislamiento del ADN que codifica el polipéptido WISP-1**

[0115] El ADN que codifica el polipéptido WISP-1 puede obtenerse de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido que se cree posee el ARNm del polipéptido WISP-1 y lo expresa a un nivel detectable. Por consiguiente, el ADN del polipéptido WISP-1 humano puede obtenerse convenientemente a partir de una biblioteca 20 de ADNc preparada a partir de tejido humano. El gen que codifica el polipéptido WISP-1 también puede obtenerse a partir de una biblioteca genómica o por procedimientos de síntesis conocidos (por ejemplo, síntesis automática de ácidos nucleicos).

[0116] Las bibliotecas pueden cribarse con sondas (tales como oligonucleótidos de al menos 25 aproximadamente 20-80 bases) diseñadas para identificar el gen de interés o la proteína codificada por él. El cribado del ADNc o la biblioteca genómica con la sonda seleccionada puede realizarse usando procedimientos habituales tal como se describen en Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Un medio alternativo para aislar el gen que codifica el polipéptido WISP-1 es usar metodología PCR [Sambrook y col., anteriormente; Dieffenbach y col., PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold 30 Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

[0117] Las técnicas para cribar una biblioteca de ADNc son muy conocidas en la técnica. Las secuencias de oligonucleótidos seleccionadas como sondas deben ser de longitud suficiente y suficientemente inequívocas de forma que se minimicen falsos positivos. El oligonucleótido está preferentemente marcado de forma que pueda detectarse tras la hibridación con ADN en la biblioteca que está cribándose. Los procedimientos de marcado son 35 muy conocidos en la técnica e incluyen el uso de radiomarcas como ATP marcado con ³²P, biotinilación o marcado con enzimas. Las condiciones de hibridación, que incluyen rigurosidad moderada y alta rigurosidad, se proporcionan en Sambrook y col., anteriormente.

[0118] Las secuencias identificadas en tales procedimientos de cribado de bibliotecas pueden compararse y 40 alinearse con otras secuencias conocidas depositadas y disponibles en bases de datos públicas tales como GenBank u otras bases de datos de secuencias privadas. La identidad de secuencias (a tanto el nivel de aminoácidos como de nucleótidos) dentro de regiones definidas de la molécula o a través de la secuencia de longitud completa puede determinarse usando procedimientos conocidos en la técnica y como se describen en el 45 presente documento.

[0119] La secuencia que codifica proteínas que tienen ácidos nucleicos puede obtenerse cribando ADNc seleccionado o bibliotecas genómicas usando la secuencia de aminoácidos deducida desvelada en el presente 50 documento por primera vez y, si fuera necesario, usando procedimientos de extensión de cebadores convencionales como se describen en Sambrook y col., anteriormente, para detectar precursores y productos intermedios de procesamiento de ARNm que pueden no haber sido transcritos de forma inversa en ADNc.

2. Selección y transformación de células huésped

[0120] Las células huésped se transfectan o transforman con vectores de expresión o de clonación descritos 55 en el presente documento para la producción de polipéptidos WISP-1 y se cultivan en medio nutriente convencional modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Las condiciones de cultivo, tales como medio, temperatura, pH y similares, pueden ser seleccionadas por el experto sin experimentación adicional. En general, los principios, protocolos y 60 técnicas prácticas para maximizar la productividad de cultivos celulares pueden encontrarse en Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) y Sambrook y col., anteriormente.

[0121] Los procedimientos de transfección de células eucariotas y transformación de células procariontas son conocidos para el experto general, por ejemplo, CaCl₂, CaPO₄, mediados por liposomas y electroporación.

Dependiendo de la célula huésped usada, la transformación se realiza usando técnicas habituales apropiadas para tales células. El tratamiento con calcio que emplea cloruro de calcio, como se describe en Sambrook y col., anteriormente, o la electroporación se usan generalmente para procariotas. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se usa para la transformación de ciertas células vegetales como se describe por Shaw y col., Gene, 23:315 (1983) y el documento WO 89/05859 publicado el 29 de junio de 1989. Para células de mamífero sin tales paredes celulares puede emplearse el procedimiento de precipitación con fosfato de calcio de Graham y van der Eb, Virology, 52:456-457 (1978). Los aspectos generales de las transfecciones del sistema huésped de células de mamífero se han descrito en la patente de EE.UU. nº 4.399.216. Las transformaciones en levadura se llevan a cabo normalmente según el procedimiento de Van Solingen y col., J. Bact., 130:946 (1977) y Hsiao y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76:3829 (1979). Sin embargo, también pueden usarse otros procedimientos para introducir ADN en células tales como por microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplastos bacterianos con células intactas o plications, por ejemplo, polibreno, poliornitina. Para diversas técnicas para transformar células de mamífero véanse Keown y col., Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990) y Mansour y col., Nature, 336:348-352 (1988).

[0122] Las células huésped adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores en el presente documento incluyen células procariotas, de levadura o de eucariotas superiores. Procariotas adecuados incluyen, pero no se limitan a, eubacterias tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, Enterobacteriaceae tales como *E. coli*. Diversas cepas de *E. coli* están públicamente disponibles tales como la cepa MM294 de *E. coli* K12 (ATCC 31,446); X1776 de *E. coli* (ATCC 31.537); cepa W3110 de *E. coli* (ATCC 27,325) y K5 772 (ATCC 53.635). Otras células huésped procariotas adecuadas incluyen Enterobacteriaceae tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescens* y *Shigella*, además de *Bacilli* tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, 41P de *B. licheniformis* desvelada en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Estos ejemplos son ilustrativos en vez de limitantes. La cepa W3110 es un huésped o huésped parental particularmente preferido ya que es una cepa huésped común para fermentaciones de productos de ADN recombinante. Preferentemente, la célula huésped secreta cantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la cepa W3110 puede modificarse para efectuar una mutación genética en los genes que codifican proteínas endógenas para el huésped, incluyendo ejemplos de tales huéspedes la cepa 1A2 de *E. coli* W3110, que tiene el genotipo completo *tonA*; cepa 9E4 de *E. coli* W3110, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3*; cepa 27C7 de *E. coli* W3110 (ATCC 55.244), que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT kan'*; cepa 37D6 de *E. coli* W3110, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT rbs7 ilvG kan'*; cepa 40B4 de *E. coli* W3110, que es la cepa 37D6 con un mutación por delección *degP* resistente a no kanamicina; y una cepa de *E. coli* que tiene proteasa periplásmica mutante desvelada en la patente de EE.UU. nº 4.946.783 concedida el 7 de agosto de 1990. Alternativamente son adecuados procedimientos de clonación *in vitro*, por ejemplo, PCR u otras reacciones de polimerasa de ácido nucleico.

[0123] Además de los procariotas, los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levadura son huéspedes de clonación o expresión adecuados para los vectores que codifican polipéptidos WISP-1. *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo huésped eucariota inferior comúnmente usado. Otros incluyen *Schizosaccharomyces pombe* (Beach y Nurse, Nature, 290: 140 [1981]; documento EP 139.383 publicado el 2 de mayo de 1985); huéspedes de *Kluyveromyces* (patente de EE.UU. nº 4.943.529; Fleer y col., Bio/Technology, 9:968-975 (1991)) tales como, por ejemplo, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt y col., J. Bacteriol., 154(2):737-742 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilaram* (ATCC 36.906; Van den Berg y col., Bio/Technology, 8:135 (1990)), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *yarrowia* (documento EP 402.226); *Pichia pastoris* (documento EP 183.070; Sreekrishna y col., J. Basic Microbiol., 28:265-278 [1988]); *Candida*; *Trichoderma reesei* (documento EP 244.234); *Neurospora crassa* (Case y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5259-5263 [1979]); *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis* (documento EP 394.538 publicado el 31 de octubre de 1990); y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (documento WO 91/00357 publicado el 10 de enero de 1991) y huéspedes de *Aspergillus* tales como *A. nidulans* (Ballance y col., Biochem. Biophys. Res. Commun., 112:284-289 [1983]; Tilburn y col., Gene, 26:205-221 [1983]; Yelton y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1470-1474 [1984]) y *A. niger* (Kelly y Hynes, EMBO J., 4:475-479 [1985]). Las levaduras metilotróficas son adecuadas en el presente documento e incluyen, pero no se limitan a, levadura capaz de crecer en metanol seleccionada de los géneros que están constituidos por *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* y *Rhodotorula*. Una lista de especies específica que son a título de ejemplo de esta clase de levaduras puede encontrarse en C. Anthony, The Biochemistry of Methylotrophs, 269 (1982).

[0124] Células huésped adecuadas para la expresión del polipéptido WISP-1 glicosilado se derivan de organismos multicelulares. Ejemplos de células de invertebrados incluyen células de insecto tales como *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9, además de células vegetales tales como cultivos celulares de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco. Se han identificado numerosas cepas baculovíricas y variantes y células huésped de insecto permisivas correspondientes de huéspedes tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti*

(mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Una variedad de cepas víricas para transfección está públicamente disponible, por ejemplo, la variante L-1 de *Autographa californica* NPV y la cepa Bm-5 de *Bombyx mori* NPV, y tales virus pueden usarse como virus en el presente documento según la presente invención, particularmente para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

5 [0125] Sin embargo, el mayor interés ha sido en células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo de tejido) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Ejemplos de líneas celulares huésped de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón de embrión humano (células 293 o 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, 10 Graham y col., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); células de riñón de bebés de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino-DHFR (CHO, Urlaub y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA, 15 ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather y col., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

20 [0126] Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o de clonación anteriormente descritos para la producción de polipéptidos WISP-1 y se cultivan en medio nutriente convencional modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

3. Selección y uso de un vector replicable

25 [0127] El polipéptido WISP-1 que codifica ácidos nucleicos (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) puede insertarse en un vector replicable para clonación (amplificación del ADN) o para expresión. Diversos vectores están públicamente disponibles. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de un plásmido, cósmido, partícula vírica o fago. La secuencia de ácidos nucleicos apropiada puede insertarse en el vector mediante una variedad de 30 procedimientos. En general, el ADN se inserta en un sitio(s) de endonucleasas de restricción apropiado(s) usando técnicas conocidas en la técnica. Los componentes de vector incluyen generalmente, pero no se limitan a, uno o más de una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción. La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de estos componentes emplea técnicas de ligación habituales que son conocidas para el experto.

35 [0128] WISP-1 puede producirse recombinantemente no sólo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia señal u otro polipéptido que tenga un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína o polipéptido maduro. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN que codifica el polipéptido WISP-1 que se inserta en el vector. La secuencia señal puede ser una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de la fosfatasa alcalina, penicilinasa, 1pp o líderes de enterotoxina II estables al calor. Para la secreción de levaduras, la secuencia señal puede ser, por ejemplo, el líder de la levadura invertasa, líder del factor alfa (incluyendo líderes de factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, este último descrito en la patente de EE.UU. nº 5.010.182), o líder de fosfatasa ácida, el líder de glucoamilasa de *C. albicans* (documento EP 362.179 publicado el 4 de abril de 1990), o la señal descrita en el documento WO 90/13646 publicado el 15 de noviembre de 1990. En la expresión de células de mamífero, las secuencias señal de mamíferos pueden usarse para dirigir la secreción de la proteína, tal como secuencias señal de polipéptidos secretados de la misma especie o relacionadas, además de líderes secretorios víricos.

50 [0129] Tanto los vectores de expresión como de clonación contienen una secuencia de ácidos nucleicos que permite que el vector se replique en una o más células huésped seleccionadas. Tales secuencias son muy conocidas para una variedad de bacterias, levadura y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias Gram-negativas, el origen de plásmidos 2μ es adecuado para levadura, y diversos orígenes víricos (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamífero.

55 [0130] Los vectores de expresión y de clonación contendrán normalmente un gen de selección, también llamado un marcador de selección. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles a partir de medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica D-alanina racemasa para *Bacilli*.

[0131] Un ejemplo de marcadores de selección adecuados para células de mamífero son aquellos que permiten la identificación de células competentes para recibir el ácido nucleico que codifica el polipéptido WISP-1 tal

como DHFR o timidina cinasa. Una célula huésped apropiada cuando se emplea DHFR natural es la línea celular CHO deficiente en actividad de DHFR, preparada y propagada como se describe por Urlaub y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980). Un gen de selección adecuado para uso en levadura es el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura YRp7 [Stinchcomb y col., Nature, 282:39 (1979); Kingsman y col., Gene, 7:141 (1979);

5 Tschemper y col., Gene, 10:157 (1980)]. El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de capacidad para crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC nº 44076 o PEP4-1 [Jones, Genetics, 85:12 (1977)].

10 [0132] Los vectores de expresión y de clonación contienen normalmente un promotor operativamente ligado a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido WISP-1 para dirigir la síntesis de ARNm. Los promotores reconocidos mediante una variedad de posibles células huésped son muy conocidos. Los promotores adecuados para uso con huéspedes procariotas incluyen los sistemas promotores de β -lactamasa y lactosa [Chang y col., Nature, 275:615 (1978); Goeddel y col., Nature, 281:544 (1979)], fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (*trp*) [Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); documento EP 36.776] y promotores híbridos tales como el promotor tac [deBoer y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)]. Los promotores para uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia Shine-Dalgarno (S.D.) operativamente ligada al ADN que codifica el polipéptido WISP.

15 [0133] Ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para uso con huéspedes de levadura incluyen los promotores para 3-fosfoglicerato cinasa [Hitzeman y col., J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)] u otras enzimas glicolíticas [Hess y col., J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900 (1978)] tales como enolasa, gliceralehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato cinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucocinasa.

20 [0134] Otros promotores de levadura que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de la transcripción controlada por condiciones de crecimiento son las regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradantes asociadas al metabolismo de nitrógeno, metalotioneína, gliceralehído-3-fosfato deshidrogenasa y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Vectores y promotores adecuados para uso en la expresión de levadura se describen adicionalmente en el documento EP 73.657.

25 [0135] La transcripción de polipéptidos WISP a partir de vectores en células huésped de mamífero está controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos a partir de los genomas de virus tales como virus del poliomavirus, virus de la viruela aviar (documento UK 2.211.504 publicado el 5 de julio de 1989), adenovirus (tal como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y virus simio 40 (SV40), de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, y de promotores de choque térmico, siempre que tales promotores sean compatibles con los sistemas de células huésped.

30 [0136] La transcripción de un ADN que codifica el polipéptido WISP-1 por eucariotas superiores puede aumentarse insertando una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos de ADN que actúan en cis, normalmente aproximadamente de 10 a 300 pb, que actúan en un promotor para aumentar su transcripción. Ahora se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína, e insulina). Sin embargo, normalmente se usará un potenciador de un virus de células eucariotas. Ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (100-270 pb), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de poliomavirus en el lado tardío del origen de replicación y los potenciadores de adenovirus. El potenciador puede cortarse y empalmarse en el vector en una posición 5' o 3' con respecto a la secuencia que codifica polipéptidos WISP-1, pero preferentemente está localizado en un sitio 5' del promotor.

35 [0137] Los vectores de expresión usados en células huésped eucariotas (células de levadura, de hongo, de insecto, vegetales, animales, humanas o nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Tales secuencias están comúnmente disponibles a partir de regiones sin traducir en 5' y, ocasionalmente 3', de ADN o ADNc de eucariota o vírico. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción sin traducir del ARNm que codifica el polipéptido WISP-1.

40 [0138] Todavía otros procedimientos, vectores y células huésped adecuados para la adaptación a la síntesis del polipéptido WISP en cultivo de células de vertebrados recombinantes se describen en Gething y col., Nature, 293:620-625 (1981); Mantei y col., Nature, 281:40-46 (1979); documentos EP 117.060; y EP 117.058.

4. Cultivo de células huésped

[0139] Las células huésped usadas para producir el polipéptido WISP de la presente invención pueden cultivarse en una variedad de medios. Para cultivar las células huésped son adecuados medios de cultivo comercialmente disponibles tales como F10 de Ham (Sigma), medio esencial mínimo ((MEM), (Sigma)), RPMI-1640 (Sigma) y medio de Eagle modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma). Además, cualquiera de los medios descritos en Ham y col., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes y col., Anal. Biochem, 102:255 (1980), patentes de EE.UU. nº 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; documentos WO 90/03430; WO 87/00195; o la patente de EE.UU. Re. 30.985. Cualquiera de estos medios puede complementarse según se necesite con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tal como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCIN™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos normalmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También puede incluirse cualquier otro complemento necesario a concentraciones apropiadas que serían conocidas para aquellos expertos en la materia. Las condiciones de cultivo tales como temperatura, pH y similares son aquellas previamente usadas con la célula huésped seleccionada para expresión, y serán evidentes para el experto general.

5. Detección de la amplificación/expresión de genes

[0140] La amplificación y/o expresión de genes puede medirse en una muestra directamente, por ejemplo, mediante transferencia Southern convencional, transferencia Northern para cuantificar la transcripción de ARNm [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)], transferencia por puntos (análisis de ADN) o hibridación *in situ* usando una sonda apropiadamente marcada basándose en las secuencias proporcionadas en el presente documento. Alternativamente pueden emplearse anticuerpos que pueden reconocer dúplex específicos que incluyen dúplex de ADN, dúplex de ARN y dúplex híbridos de ADN-ARN o dúplex de ADN-proteína. A su vez, los anticuerpos pueden estar marcados y el ensayo puede llevarse a cabo cuando el dúplex está unido a una superficie, de manera que tras la formación del dúplex sobre la superficie pueda detectarse la presencia de anticuerpo unido al dúplex.

[0141] Alternativamente, la expresión de genes puede medirse por procedimientos inmunológicos tales como tinción inmunohistoquímica de células o secciones de tejido y ensayo de cultivo celular o fluidos corporales para cuantificar directamente la expresión de producto génico. Anticuerpos útiles para tinción inmunohistoquímica y/o ensayo de fluidos de muestra pueden ser tanto monoclonales como policlonales, y pueden prepararse en cualquier mamífero. Convenientemente, los anticuerpos pueden prepararse contra un polipéptido WISP de secuencia nativa o contra un péptido sintético basado en las secuencias de ADN proporcionadas en el presente documento o contra secuencia exógena fusionada a ADN de WISP y que codifique un epítopo de anticuerpo específico.

6. Purificación del polipéptido WISP

[0142] Las formas del polipéptido WISP pueden recuperarse a partir de medio de cultivo o de lisados de células huésped. Si está unido a membrana puede desprenderse de la membrana usando una disolución de detergente adecuado (por ejemplo, Triton-X 100) o mediante escisión enzimática. Las células empleadas en la expresión del polipéptido WISP-1 pueden romperse por diversos medios físicos o químicos tales como ciclos de congelación-descongelación, sonicación, rotura mecánica o agentes de lisado de células.

[0143] Puede desecharse purificar polipéptidos WISP-1 a partir de proteínas de células recombinantes o polipéptidos. Los siguientes procedimientos son a título de ejemplo de procedimientos de purificación adecuados: por fraccionamiento sobre una columna de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía sobre sílice o sobre una resina de intercambio catiónico tal como DEAE; cromatofracción; SDS-PAGE; precipitación con sulfato de amonio; filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75; columnas de proteína A-Sepharose para eliminar contaminantes tales como IgG; y columnas quelantes de metales para unir formas marcadas con epítopos del polipéptido WISP-1. Pueden emplearse diversos procedimientos de purificación de proteínas y tales procedimientos se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Deutscher, Methods in Enzymology, 192 (7.990) Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, Nueva York (1982). La(s) etapa(s) de purificación seleccionada(s) dependerá(n), por ejemplo, de la naturaleza del procedimiento de producción usado y del polipéptido WISP-1 particular producido.

[0144] Las formas solubles de WISP-1 pueden emplearse como antagonistas en los procedimientos de la invención. Tales formas solubles de WISP-1 pueden comprender modificaciones como se describen más adelante (tales como fusionando a una inmunoglobulina, marca de epítopo o cremallera de leucina). Las moléculas de inmunoahesina se contemplan adicionalmente para uso en los procedimientos en el presente documento. Las inmunoahesinas de WISP-1 pueden comprender diversas formas de WISP-1 tales como formas solubles de WISP-1 o un fragmento de la misma. En realizaciones particulares, la molécula puede comprender una fusión del polipéptido WISP-1 con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma

bivalente de la inmunoadhesina, una fusión tal podría ser a la región Fc de una molécula de IgG. Las fusiones a Ig incluyen preferentemente la sustitución de una forma soluble (dominio transmembrana delecionado o inactivado) del polipéptido en lugar de al menos una región variable dentro de una molécula de Ig. En una realización particularmente preferida, la fusión de inmunoglobulinas incluye las regiones bisagra, CH2 y CH3, o las regiones bisagra, CH1, CH2 y CH3 de una molécula de IgG1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulinas véanse también la patente de EE.UU. nº 5.428.130 concedida el 27 de junio de 1995 y Chamow y col., TIBTECH, 14:52-60 (1996).

[0145] La inmunoadhesina más simple y más sencilla combina el (los) dominio(s) de unión de la adhesina (por ejemplo, la WISP-1) con la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina. Generalmente, cuando se preparan las inmunoadhesinas de la presente invención, el ácido nucleico que codifica el dominio de unión de la adhesina se fusionará con el extremo C con respecto al ácido nucleico que codifica el extremo N de una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina; sin embargo, también son posibles las fusiones del extremo N.

[0146] Normalmente, en tales fusiones, el polipéptido químérico codificado retendrá al menos los dominios bisagra, C_H2 y C_H3 funcionalmente activos de la región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina. También se hacen fusiones al extremo C de la porción Fc de un dominio constante, o inmediatamente al extremo N con respecto a la región C_H1 de la cadena pesada o la región correspondiente de la cadena ligera. El sitio preciso en el que se hace la fusión no es crítico; los sitios particulares son muy conocidos y pueden seleccionarse con el fin de optimizar la actividad biológica, secreción o características de unión de la inmunoadhesina.

[0147] En una realización preferida, la secuencia de adhesina está fusionada al extremo N de la región Fc de la inmunoglobulina G₁ (IgG₁). Es posible fusionar toda la región constante de la cadena pesada a la secuencia de adhesina. Sin embargo, en la fusión se usa más preferentemente una secuencia que empieza en la región bisagra justamente aguas arriba del sitio de escisión de la papaina que define Fc de IgG químicamente (es decir, el residuo 216, considerando que el primer residuo de la región constante de la cadena pesada es 114), o sitios análogos de otras inmunoglobulinas. En una realización particularmente preferida, la secuencia de adhesina de aminoácidos está fusionada a (a) la región bisagra y C_H2 y C_H3 o (b) los dominios C_H1, bisagra, C_H2 y C_H3, de una cadena pesada de IgG.

[0148] Para inmunoadhesinas biespecíficas, las inmunoadhesinas se ensamblan como multímeros, y particularmente como heterodímeros o heterotetrámeros. Generalmente, estas inmunoglobulinas ensambladas tendrán estructuras unitarias conocidas. Una unidad estructural básica de cuatro cadenas es la forma en la que existen IgG, IgD y IgE. Una unidad de cuatro cadenas se repite en las inmunoglobulinas de mayor peso molecular; la IgM generalmente existe como un pentámero de cuatro unidades básicas mantenidas juntas por enlaces disulfuro. La globulina IgA, y ocasionalmente la globulina IgG, también pueden existir en forma multimérica en suero. En el caso del multímero, cada una de las cuatro unidades puede ser igual o diferente.

[0149] Diversas inmunoadhesinas ensambladas a título de ejemplo dentro del alcance en el presente documento se presentan esquemáticamente en un diagrama a continuación:

- (a) A_{C_L}-A_{C_L};
- (b) A_{C_H}-(A_{C_H}, A_{C_L}-A_{C_H}, A_{C_L}-V_HC_H, o V_LC_L-A_{C_H}),
- (c) A_{C_L}-A_{C_H}-(A_{C_L}-A_{C_H}, A_{C_L}-V_HC_H, V_LC_L-A_{C_H}, o V_LC_L-V_HC_H)
- (d) A_{C_L}-V_HC_H-(A_{C_H}, o A_{C_L}-V_HC_H o V_LC_L-A_{C_H});
- (e) V_LC_L-A_{C_H}-(A_{C_L}-V_HC_H, o V_LC_L-A_{C_H}); y
- (f) (A-Y)_n-(V_LC_L-V_HC_H)₂,

en las que cada A representa secuencias de aminoácidos de adhesina idénticas o diferentes;

V_L es un dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina;
V_H es un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina;
C_L es un dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina;
C_H es un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina;
n es un número entero superior a 1;
Y designa el residuo de un agente de reticulación covalente.

[0150] En aras de la brevedad, las estructuras anteriores sólo muestran características clave; no indican dominios de unión (J) u otros de las inmunoglobulinas, ni se muestran enlaces disulfuro. Sin embargo, cuando tales dominios se requieren para la actividad de unión, deben construirse para estar presentes en las localizaciones corrientes que ocupan en las moléculas de inmunoglobulina.

[0151] Alternativamente, las secuencias de adhesina pueden insertarse entre las secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera de inmunoglobulina, de forma que se obtiene una inmunoglobulina que comprende una

cadena quimérica pesada. En esta realización, las secuencias de adhesina están fusionadas al extremo 3' de una cadena pesada de inmunoglobulina en cada brazo de una inmunoglobulina, tanto entre los dominios bisagra y C_H2 como entre los dominios C_H2 y C_H3. Hoogenboom y col., Mol. Immunol., 28:1027-1037 (1991) han informado de construcciones similares.

- 5 [0152] Aunque la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina no se requiere en las inmunoadhesinas de la presente invención, una cadena ligera de inmunoglobulina puede estar presente tanto covalentemente asociada a un polipéptido de fusión de cadena pesada de inmunoglobulina-adhesina como directamente fusionada a la adhesina. En el caso anterior, el ADN que codifica una cadena ligera de inmunoglobulina se coexpresa normalmente con el ADN que codifica la proteína de fusión de la cadena pesada de la adhesina-inmunoglobulina. Tras la secreción, la cadena pesada y la cadena ligera híbridas se asociarán covalentemente para proporcionar una estructura similar a inmunoglobulina que comprende dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina ligadas por disulfuro. Los procedimientos adecuados para la preparación de tales estructuras se desvelan, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 4.816.567 concedida el 28 de marzo de 1989. Las inmunoadhesinas se construyen más convenientemente fusionando la secuencia ADNc que codifica la porción de adhesina en marco a una secuencia de ADNc de inmunoglobulina. Sin embargo, también puede usarse la fusión a fragmentos genómicos de inmunoglobulina (véase, por ejemplo, Aruffo y col., Cell, 61:1303-1313 (1990); y Stamenkovic y col., Cell, 66:1133-1144 (1991)). Este último tipo de fusión requiere la presencia de secuencias reguladoras de Ig para la expresión. Los ADNc que codifican regiones constantes de cadena pesada de IgG pueden aislar basándose en las secuencias publicadas de bibliotecas de ADNc derivadas de linfocitos del bazo o de sangre periférica, por hibridación o por técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los ADNc que codifican la "adhesina" y las partes de inmunoglobulina de la inmunoadhesina se insertan en tándem en un vector de plásmido que dirige eficazmente la expresión en las células huésped elegidas.
- 10 [0153] En otra realización, WISP-1 o el antagonista de WISP-1 puede modificarse covalentemente ligando el polipéptido receptor a uno de una variedad de polímeros no proteináceos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxialquilenos, en el modo expuesto en las patentes de EE.UU. nº 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337, u otro como moléculas tales como poliglutamato. Tales formas pegiladas pueden prepararse usando técnicas conocidas en la técnica.
- 15 [0154] La invención también contempla las formas de cremallera de leucina de estas moléculas. La "cremallera de leucina" es un término usado en la técnica para referirse a una secuencia rica en leucina que potencia, promueve o activa la dimerización o trimerización de su componente de fusión (por ejemplo, la secuencia o molécula a la que está fusionada o ligada la cremallera de leucina). En la técnica se han descrito diversos polipéptidos de cremallera de leucina. Véanse, por ejemplo, Landschulz y col., Science, 240:1759 (1988); la patente de EE.UU. 5.716.805; el documento WO 94/10308; Hoppe y col., FEBS Letters, 344:1991 (1994); Maniatis y col., Nature, 341:24 (1989). Aquellos expertos en la materia apreciarán que una secuencia de cremallera de leucina puede fusionarse a o bien los extremos 5' o 3' de WISP-1 o a la molécula antagonista de WISP-1.
- 20 [0155] Los polipéptidos WISP-1 de la presente invención también pueden modificarse de forma que se formen moléculas químicas fusionando el polipéptido a otro polipéptido heterólogo o secuencia de aminoácidos. Preferentemente, tal polipéptido heterólogo o secuencia de aminoácidos es uno que actúa para oligomerizar la molécula química. En una realización, una molécula química comprende una fusión del polipéptido WISP-1 a un polipéptido de marca que proporciona un epítopo al que puede unirse selectivamente un anticuerpo antimarca. La marca de epítopo se sitúa generalmente en el extremo amino o carboxilo del polipéptido. La presencia de tales formas marcadas con epítopo del polipéptido puede detectarse usando un anticuerpo contra el polipéptido de marca. Por tanto, la provisión de la marca de epítopo permite que el polipéptido se purifique fácilmente por purificación de afinidad usando un anticuerpo anti-marca u otro tipo de matriz de afinidad que se une a la marca de epítopo. Diversos polipéptidos de marca y sus anticuerpos respectivos son muy conocidos en la técnica. Ejemplos incluyen marcas de poli-histidina (poli-his) o poli-histidina-glicina (poli-his-gly); el polipéptido de marca de HA flu y su anticuerpo 12CA5 [Field y col., Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)]; la marca c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 para la misma [Evan y col., Molecular and Celular Biology, 5:3610-3616 (1985)]; y la marca de glicoproteína D del virus del herpes simple (gD) y su anticuerpo [Paborsky y col., Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)]. Otros polipéptidos de marca incluyen el péptido Flag [Hopp y col., BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)]; el péptido del epítopo KT3 [Martin y col., Science, 255:192-194 (1992)]; un péptido del epítopo de α -tubulina [Pielner y col., J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)]; y la marca del péptido de proteína del gen 10 de T7 [Lutz-Freyermuth y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)].
- 25 [0156] En el presente documento también se describen anticuerpos anti-WISP-1 empleados en los procedimientos presentemente desvelados. Ejemplos de tales moléculas incluyen anticuerpos neutralizantes o bloqueantes que pueden reducir el crecimiento, la metástasis o la motilidad de células cancerosas. El anti-WISP-1 puede ser anticuerpos monoclonales.
- 30 [0157] Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando procedimientos de hibridoma tales como

aquellos descritos por Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495 (1975). En un procedimiento de hibridoma, un ratón, hámster u otro animal huésped apropiado se inmuniza normalmente con un agente inmunizante para provocar linfocitos que producen o pueden producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*.

- 5 [0158] El agente inmunizante incluirá normalmente un polipéptido WISP-1 o una proteína de fusión del mismo tal como una proteína de fusión de WISP-1-IgG.
- 10 [0159] Generalmente se usan tanto linfocitos de sangre periférica ("PBL") si se desean células de origen humano como células de bazo o células de ganglios linfáticos si se desean fuentes de mamífero no humano. Entonces, los linfocitos se fusionan a una línea celular inmortalizada usando un agente de fusión adecuado tal como polietilenglicol para formar una célula de hibridoma [Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986) pág. 59-103]. Las líneas celulares inmortalizadas son normalmente células transformadas de mamífero, particularmente células de mieloma de origen de roedor, bovino y humano. Normalmente se emplean líneas celulares de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células inmortalizadas sin fusionar. Por ejemplo, si las células parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá normalmente hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), sustancias que previenen el crecimiento de células deficientes en HGPRT.
- 15 [0160] Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son aquellas que se fusionan eficientemente, soportan un alto nivel de expresión estable del anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Las líneas celulares inmortalizadas más preferidas son líneas de mieloma murino que pueden obtenerse, por ejemplo, de Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California y la Colección americana de cultivos tipo, Manassas, Virginia. Las líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. *Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur y col., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, (1987) pág. 51-63).
- 20 [0161] El medio de cultivo en el que las células de hibridoma se cultivan puede ensayarse entonces para la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra WISP-1. Preferentemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión *in vitro* tal como radioinmunoensayo (RIA) o enzimoinmunoanálisis de adsorción (ELISA). Tales técnicas y ensayos se conocen en la técnica. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, por el análisis de Scatchard de Munson y Pollard, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).
- 25 [0162] Despues de identificarse las células de hibridoma deseadas, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitante y cultivarse por procedimientos convencionales (Goding, *Monoclonal* anteriormente). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco o medio RPMI-1640. Alternativamente, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como ascitis en un mamífero.
- 30 [0163] Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden aislar o purificarse del medio de cultivo o fluido ascítico mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxiapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.
- 35 [0164] Los anticuerpos monoclonales también pueden prepararse mediante procedimientos de ADN recombinante tales como aquellos descritos en la patente de EE.UU. nº 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención se aísla y se secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma sirven de fuente preferida de tal ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión que entonces se transfecan en células huésped tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen de otra forma proteína de inmunoglobulina para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante para dominios constantes humanos de cadena pesada y ligera en lugar de las secuencias murinas homólogas, Morrison y col. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 81, 6851 (1984), o uniéndose covalentemente a la secuencia codificante de inmunoglobulinas toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido de no inmunoglobulina.
- 40 [0165] Normalmente, tales polipéptidos de no inmunoglobulina se sustituyen para los dominios constantes de un anticuerpo o se sustituyen para los dominios variables de un sitio de combinación con antígeno de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo bivalente químérico.

[0166] Los anticuerpos químéricos o híbridos también pueden prepararse *in vitro* usando procedimientos conocidos en la química de proteínas sintéticas que incluyen aquellos que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, las immunotoxinas pueden construirse usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Ejemplos de reactivos adecuados para este fin incluyen iminotiolato y 4-mercaptobutirimidato de metilo.

[0167] Los fragmentos Fv monocatenarios también pueden producirse tal como se describe en Iliades y col., FEBS Letters, 409:437-441 (1997). El acoplamiento de tales fragmentos monocatenarios usando diversos ligadores se describe en Kortt y col., Protein Engineering, 10:423-433 (1997). En la técnica se conoce una variedad de técnicas para la producción y manipulación recombinante de anticuerpos. Ejemplos ilustrativos de tales técnicas que normalmente se utilizan por expertos se describen más adelante en mayor detalle.

(i) *Anticuerpos humanizados*

[0168] Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él de una fuente no humana. Estos residuos no humanos de aminoácidos se denominan frecuentemente en lo sucesivo residuos "importados", que se toman normalmente de un dominio variable "importado". La humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores [Jones y col., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann y col., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen y col., Science, 239:1534-1536 (1998)] sustituyendo CDR de roedor o secuencias de CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano.

[0169] Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos químicos en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR están sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

[0170] Es importante que los anticuerpos se humanicen con retención de la alta afinidad para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, según un procedimiento preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un procedimiento de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales están comúnmente disponibles y son familiares para aquellos expertos en la materia. Están disponibles programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de esta muestra permite el análisis de la función probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta forma, los residuos FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de la secuencia consenso y de importación de manera que se logre la característica de anticuerpos deseada, tal como el aumento de la afinidad para el (los) antígeno(s) diana. En general, los residuos de CDR participan directamente y lo más sustancialmente en influir la unión a antígeno.

(ii) *Anticuerpos humanos*

[0171] Los anticuerpos monoclonales humanos pueden prepararse por el procedimiento de hibridoma. Se han descrito líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos, por ejemplo, por Kozbor, J. Immunol. 133, 3001 (1984), y Brodeur, y col., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987).

[0172] Ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que tras la inmunización pueden producir un repertorio de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo (J_H) en ratones químéricos y mutantes en la línea germinal produce la inhibición completa de la producción de anticuerpo endógeno. La transferencia de la matriz de genes de inmunoglobulina de la línea germinal en tales ratones mutantes en la línea germinal producirá la producción de anticuerpos humanos tras la exposición a antígeno. Véanse, por ejemplo, Jakobovits y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 2551-255 (1993); Jakobovits y col., Nature 362, 255-258 (1993).

[0173] Mendez y col. (Nature Genetics 15: 146-156 [1997]) han mejorado adicionalmente la tecnología y han generado una línea de ratones transgénicos designada "Xenomouse II" que, cuando se expone a un antígeno, genera anticuerpos completamente humanos de alta afinidad. Esto se logró mediante integración de la línea germinal de loci de cadena pesada y cadena ligera humanos de megabases en ratones con delección en el segmento J_H endógeno como se describe anteriormente. El Xenomouse II alberga 1.020 kb de locus de cadena pesada humana que contienen aproximadamente 66 genes V_H , regiones D_H y J_H completas y tres regiones constantes diferentes (μ , δ y χ), y también alberga 800 kb de locus k humano que contiene 32 genes V_k , segmentos J_k y genes

Ck. Los anticuerpos producidos en estos ratones se parecen mucho en todos los sentidos a los observados en seres humanos, incluyendo transposición, ensamblaje y repertorio de genes. Los anticuerpos humanos se expresan preferentemente con respecto a anticuerpos endógenos debido a la delección en el segmento J_H endógeno que previene la transposición de genes en el locus murino.

5 [0174] Alternativamente, la tecnología de expresión en fago (McCafferty y col., Nature 348, 552-553 [1990]) puede usarse para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro* a partir de repertorios de genes del dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes sin inmunizar. Según esta técnica, los genes del dominio V de anticuerpo se clonian en marco en un gen de la proteína de la cubierta tanto principal como minoritario de un bacteriófago filamentoso tal como M13 o fd, y se muestran como fragmentos funcionales de anticuerpos sobre la superficie de la partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenaria del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también producen la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta esas propiedades. Por tanto, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. Las muestras de fago pueden realizarse en una variedad de formas; para su revisión véase, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3, 564-571 (1993). Pueden usarse varias fuentes de segmentos de genes de V para la expresión en fago. Clackson y col., Nature 352, 624-628 (1991) aislaron una matriz diferente de anticuerpos de anti-oxazolona a partir de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes de V derivados de los bazos de ratones inmunizados. Puede construirse un repertorio de genes V de donantes humanos sin inmunizar y los anticuerpos con respecto a una matriz diferente de antígenos (incluyendo autoantígenos) pueden aislarse esencialmente siguiendo las técnicas descritas por Marks y col., J. Mol. Biol. 222, 581-597 (1991), o Griffith y col., EMBO J. 12, 725-734 (1993). En una respuesta inmunitaria natural, los genes de anticuerpos acumulan mutaciones a una alta velocidad (hipermutación somática). Algunos de los cambios introducidos conferirán mayor afinidad, y los linfocitos B que muestran inmunoglobulina de superficie de alta afinidad se replican y se diferencian preferentemente durante la posterior exposición del antígeno. Este proceso natural puede imitarse empleando la técnica conocida como "barajado de cadenas" (Marks y col., Bio/Technol. 10, 779-793 [1992]). En este procedimiento, la afinidad de anticuerpos humanos "primarios" obtenidos por expresión en fago puede mejorarse sustituyendo secuencialmente los genes de la región V de la cadena pesada y ligera por variantes (repertorios) que se producen naturalmente de genes del dominio V obtenidos a partir de donantes sin inmunizar. Esta técnica permite la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos con afinidades en el intervalo de nM. Una estrategia para preparar repertorios de anticuerpos de fago muy grandes (también conocidos como "las bibliotecas madre de todas las bibliotecas") se ha descrito por Waterhouse y col., Nucl. Acids Res. 21, 2265-2266 (1993). El barajado de genes también puede usarse para衍生anticuerpos humanos de anticuerpos de roedor, en el que el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares al anticuerpo de roedor de partida. Según este procedimiento, que también se denomina en lo sucesivo "sellado de epítopos", el gen del dominio V de la cadena pesada o ligera de anticuerpos de roedor obtenido por la técnica de expresión en fago se reemplaza por un repertorio de genes del dominio V humano, creándose quimeras de roedor-ser humano. La selección en antígeno produce el aislamiento de variable humano que puede restaurar un sitio de unión a antígeno funcional, es decir, el epítopo gobierna (sella) la elección del componente. Si el proceso se repite con el fin de sustituir el dominio V de roedor restante se obtiene un anticuerpo humano (véase la solicitud de patente PCT WO 93/09213 publicada el 1 de abril de 1993). A diferencia de la humanización tradicional de anticuerpos de roedor por injerto de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos que no tienen región estructural o residuos de CDR de origen de roedor.

45 [0175] Como se trata más adelante, los anticuerpos pueden comprender opcionalmente anticuerpos monoméricos, anticuerpos diméricos, además de formas multivalentes de anticuerpos. Aquellos expertos en la materia pueden construir tales formas diméricas o multivalentes por técnicas conocidas en la técnica. Los procedimientos para preparar anticuerpos monovalentes también son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, un procedimiento implica la expresión recombinante de cadena ligera y cadena pesada modificada de inmunoglobulina. La cadena pesada se trunca generalmente en cualquier punto en la región Fc de forma que se previene la reticulación de la cadena pesada. Alternativamente, los residuos de cisteína relevantes están sustituidos con otro residuo de aminoácido o están delecionados para prevenir la reticulación.

(iii) Anticuerpos biespecíficos

55 [0176] Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferentemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es para WISP-1, por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos que se unen específicamente a WISP-1 o variantes de WISP-1 y otro miembro de la familia de CNN (por ejemplo, WISP-2, WISP-3, CTGF, Cyr61 o Nov) u otras moléculas tales como CD44.

60 [0177] Los procedimientos para preparar anticuerpos biespecíficos se conocen en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina en los que las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello, Nature 305, 537-539 (1983)). Debido al surtido aleatorio de cadenas pesadas y

ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una posible mezcla de 10 moléculas de anticuerpos diferentes, de las que sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se hace normalmente por etapas de cromatografía de afinidad, es bastante embarazosa, y los rendimientos de producto son bajos. Procedimientos similares se desvelan en la publicación de la solicitud PCT nº 5 WO 93/08829 (publicada el 13 de mayo de 1993) y en Traunecker y col., EMBO 10, 3655-3659 (1991).

[0178] Según una solución diferente y más preferida, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios que combinan anticuerpo-antígeno) están fusionados a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferentemente con un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere que tenga la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión a cadena ligera presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad en el 10 ajuste de proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptidos en realizaciones en las que relaciones desiguales de las tres cadenas de polipéptidos usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas de polipéptidos en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptidos en relaciones iguales produzca 15 altos rendimientos o cuando las relaciones no sean de significancia particular. En una realización preferida de esta solución, los anticuerpos biespecíficos están compuestos por una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se encontró que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado a partir de combinaciones de cadenas de 20 inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una forma fácil de separación. Esta solución se desvela en la publicación PCT nº 25 WO 94/04690 publicada el 3 de marzo de 1994.

[0179] Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh y col., Methods in Enzymology 121, 210 (1986).

30 (iv) *Anticuerpos heteroconjugados*

[0180] Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos por dos anticuerpos covalentemente unidos. Tales anticuerpos han sido propuestos, por ejemplo, para elegir como diana células del sistema inmunitario con respecto a células no deseadas (patente de EE.UU. nº 4.676.980) y para tratamiento de infección por VIH 35 (publicación de solicitud PCT nº WO 91/00360 y documentos WO 92/200373; EP 03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden prepararse usando cualquier procedimiento de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados son muy conocidos en la técnica y se desvelan en la patente de EE.UU. nº 4.676.980, junto con varias técnicas de reticulación.

40 (v) *Fragments de anticuerpos*

[0181] El anticuerpo anti-WISP-1 (que incluye anticuerpos murinos, humanos y humanizados, y variantes de anticuerpos) puede ser un fragmento de anticuerpo. Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaron mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véanse, por ejemplo, Morimoto y col., J. Biochem. Biophys. Methods 24:107-117 (1992) y Brennan y col., Science 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos pueden producirse ahora directamente por células huésped recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter y col., Bio/Technology 10:163-167 (1992)). En otra realización, F(ab')₂ se forma usando la cremallera de leucina GCN4 para promover el ensamblaje de la molécula de 45 F(ab')₂. Según otra solución, los fragmentos Fv, Fab o F(ab')₂ pueden aislarse directamente de cultivo de células huésped recombinantes. Una variedad de técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el médico experto. Por ejemplo, la digestión puede realizarse usando papaína. Ejemplos de digestión con papaína se describen en el documento WO 94/29348 publicado el 22/12/94 y la patente de EE.UU. nº 4.342.566. La digestión con papaína de anticuerpos produce normalmente dos fragmentos de unión a antígeno idénticos llamados 50 fragmentos Fab, cada uno con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento Fc residual. El tratamiento con pepsina proporciona un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación a antígeno y todavía puede reticular el antígeno.

[0182] Los fragmentos Fab producidos en la digestión de anticuerpos también contienen los dominios constantes de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH₁) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' se diferencian de los fragmentos Fab mediante la adición de algunos residuos en el extremo carboxi del dominio CH₁ de cadena pesada que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para Fab' en el que el (los) residuo(s) de cisteína de los dominios constantes posee(n) un grupo tiol libre. Los fragmentos F(ab')₂ de anticuerpos se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab'

que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

[0183] Los anticuerpos están glicosilados en posiciones conservadas en sus regiones constantes (Jefferis y Lund, *Chem. Immunol.* 65:111-128 [1997]; Wright y Morrison, *TibTECH* 15:26-32 [1997]). Las cadenas laterales del oligosacárido de las inmunoglobulinas afectan la función de la proteína (Boyd y col., *Mol. Immunol.* 32:1311-1318 [1996]; Wittwe y Howard, *Biochem.* 29:4175-4180 [1990]) y la interacción intramolecular entre porciones de la glicoproteína que puede afectar la conformación y la superficie tridimensional presentada de la glicoproteína (Hefferis y Lund, anteriormente; Wyss y Wagner, *Current Opin. Biotech.* 7:409-416 [1996]). Los oligosacáridos también pueden servir para elegir como diana una glicoproteína dada para ciertas moléculas basadas en estructuras de reconocimiento específicas. Por ejemplo, se ha informado que en IgG agalactosilada, el resto de oligosacárido 'salta' del espacio inter-CH2 y los residuos de N-acetilglucosamina del extremo están disponibles para unirse a proteína de unión a manosa (Malhotra y col., *Nature Med.* 1:237-243 [1995]). La eliminación por glicopeptidasa de los oligosacáridos de CAMPATH-1H (un anticuerpo IgG1 monoclonal murino humanizado recombinante que reconoce el antígeno CDw52 de linfocitos humanos) producidos en células de ovario de hámster chino (CHO) produjo una reducción completa en la lisis mediada por complemento (CMCL) (Boyd y col., *Mol. Immunol.* 32:1311-1318 [1996]), mientras que la eliminación selectiva de residuos de ácido siálico usando neuraminidasa no dio pérdida de DMCL. También se ha informado que la glicosilación de anticuerpos afecta la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En particular, se informó que las células CHO con expresión regulada con tetraciclina de β (1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), una formación catalizadora de glicosiltransferasa de GlcNAc bisecante, tenían actividad ADCC mejorada (Umana y col., *Mature Biotech.* 17:176-180 [1999]).

[0184] Las variantes de glicosilación de anticuerpos son variantes en las que se altera el patrón de glicosilación de un anticuerpo. Por alteración se pretende deleccionar uno o más restos de hidrato de carbono encontrados en el anticuerpo, añadir uno o más restos de hidrato de carbono al anticuerpo, cambiar la composición de glicosilación (patrón de glicosilación), el grado de glicosilación, etc. Las variantes de glicosilación pueden prepararse, por ejemplo, eliminando, cambiando y/o añadiendo uno o más sitios de glicosilación en la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el anticuerpo.

[0185] La glicosilación de anticuerpos está normalmente o ligada a N o ligada a O. Ligado a N se refiere a la unión del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias tripeptídicas asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, están en las secuencias de reconocimiento para unión enzimática del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de asparagina. Por tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido crea un posible sitio de glicosilación. La glicosilación ligada a O se refiere a la unión de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un hidroxiaminoácido, los más comunes serina o treonina, aunque también puede usarse 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

[0186] La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se realiza convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de forma que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas anteriormente descritas (para sitios de glicosilación ligados a N). La alteración también puede hacerse mediante la adición de, o sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glicosilación ligados a O).

[0187] La glicosilación (incluyendo patrón de glicosilación) de anticuerpos también puede alterarse sin alterar la secuencia de nucleótidos subyacente. La glicosilación depende ampliamente de la célula huésped usada para expresar el anticuerpo. Debido a que el tipo de célula usado para la expresión de glicoproteínas recombinantes, por ejemplo anticuerpos, como posibles medicamentos es raramente la célula nativa, pueden esperarse variaciones significativas en el patrón de glicosilación de los anticuerpos (véase, por ejemplo Hse y col., *J. Biol. Chem.* 272:9062-9070 [1997]). Además de la elección de células huésped, los factores que afectan la glicosilación durante la producción recombinante de anticuerpos incluyen modo de crecimiento, formulación de medios, densidad de cultivo, oxigenación, pH, esquemas de purificación y similares. Se han propuesto diversos procedimientos para alterar el patrón de glicosilación logrado en un organismo huésped particular que incluyen introducir o expresar en exceso ciertas enzimas que participan en la producción de oligosacáridos (patente de EE.UU. nº 5.047.335; 5.510.261 y 5.278.299). La glicosilación, o ciertos tipos de glicosilación, puede eliminarse enzimáticamente de la glicoproteína, por ejemplo, usando endoglicosidasa H (Endo H). Además, la célula huésped recombinante puede manipularse genéticamente, por ejemplo, hacer defectuoso el procesamiento de ciertos tipos de polisacáridos. Estas técnicas y similares son muy conocidas en la técnica.

[0188] La estructura de glicosilación de anticuerpos puede analizarse fácilmente por técnicas convencionales de análisis de hidratos de carbono que incluyen cromatografía de lectina, RMN, espectrometría de masas, HPLC, GPC, análisis composicional de monosacáridos, digestión enzimática secuencial y HPAEC-PAD, que usa cromatografía de intercambio aniónico a alto pH para separar oligosacáridos basándose en la carga. También se conocen procedimientos para liberar los oligosacáridos para fines analíticos e incluyen, sin limitación, tratamiento

enzimático (realizado comúnmente usando péptido-N-glicosidasa F/endo- β -galactosidasa), eliminación usando entorno alcalino agresivo para liberar principalmente estructuras ligadas por O, y procedimientos químicos usando hidracina anhidra para liberar tanto oligosacáridos ligados por N como por O.

5 [0189] Los triacuerpos se describen, por ejemplo, en Iliades y col., anteriormente, y Kortt y col., anteriormente.

10 [0190] Los anticuerpos pueden modificarse conjugando el anticuerpo a un agente citotóxico (como una molécula de toxina) o una enzima activadora de profármaco que convertir un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico de peptidilo, véase el documento WO81/01145) en un fármaco anticanceroso activo. Véase, por ejemplo, el documento WO 88/07370 y la patente de EE.UU. nº 4.975.278. Esta tecnología también se denomina en lo sucesivo "Terapia con profármacos mediada por enzimas dependientes de anticuerpos" (ADEPT).

15 [0191] El componente de enzima del inmunoconjuguado útil para ADEPT incluye cualquier enzima que pueda actuar sobre un profármaco de tal forma que lo convierta en su forma citotóxica más activa. Enzimas que son útiles en el procedimiento de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, fosfatasa alcalina útil para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasa útil para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina desaminasa útil para convertir no 5-fluorocitosina tóxica en el fármaco anticanceroso, 5-fluorouracilo; proteasas tales como serratia proteasa, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; caspasas tales como caspasa 3; D-alanilcarboxipeptidasas útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes de D-aminoácido; enzimas que escinden hidratos de carbono tales como beta-galactosidasa y neuraminidasa útiles para convertir profármacos glicosilados en fármacos libres; beta-lactamasa útil para convertir fármacos derivatizados con beta-lactamas en fármacos libres; y penicilina amidas tales como penicilina V amidasa o penicilina G amidasa útiles para convertir fármacos derivatizados en sus nitrógenos de amina con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Alternativamente, los anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la técnica como "abzimas", pueden usarse para convertir los profármacos de la invención en fármacos activos libres (véase, por ejemplo, Massey, Nature 328: 457-458 (1987)). Los conjugados anticuerpo-abzima pueden prepararse como se describen en el presente documento para administrar la abzima a una población de células tumorales.

30 [0192] Las enzimas pueden unirse covalentemente a los anticuerpos por técnicas muy conocidas en la técnica tales como el uso de reactivos de reticulación heterobifuncional. Alternativamente, las proteínas de fusión que comprenden al menos la región de unión a antígeno de un anticuerpo de la invención ligada a al menos una porción funcionalmente activa de una enzima de la invención pueden construirse usando técnicas de ADN recombinante muy conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Neuberger y col., Nature, 312: 604-608 (1984)).

40 [0193] Se contemplan otras modificaciones de anticuerpos. Por ejemplo, el anticuerpo puede ligarse a uno de una variedad de polímeros no proteináceos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, polioxialquilenos, o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol, u otras moléculas tales como poliglutamato. El anticuerpo también puede atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial (por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de polimetacrilato de metilo), respectivamente), en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Tales técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16^a edición, Osol, A., Ed., (1980). Para aumentar la semivida en suero del anticuerpo puede incorporarse un epítopo de unión a receptor de salvamento en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. 5.739.277. Como se usa en el presente documento, el término "epítopo de unión a receptor de salvamento" se refiere a un epítopo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃ o IgG₄) que es responsable de aumentar la semivida en suero *in vivo* de la molécula de IgG.

50 FORMULACIONES

55 [0194] Los antagonistas de WISP-1 descritos en el presente documento se emplean opcionalmente en un vehículo. Vehículos adecuados y sus formulaciones se describen en Remington's. Pharmaceutical Sciences, 16^a ed., 1980, Mack Publishing Co., editado por Osol y col. Normalmente, una cantidad apropiada de una sal farmacéuticamente aceptable se usa en el vehículo para hacer que la formulación sea isotónica. Ejemplos de vehículo incluyen solución salina, disolución de Ringer y disolución de dextrosa. El pH del vehículo es preferentemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 8, y más preferentemente de aproximadamente 7,4 a aproximadamente 7,8. Será evidente para aquellos expertos en la materia que ciertos vehículos pueden ser más preferibles dependiendo de, por ejemplo, la vía de administración y la concentración de agente activo que se administra. El vehículo puede estar en forma de una formulación liofilizada o disolución acuosa.

60 [0195] Vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables son preferentemente no tóxicos para células y/o receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros

ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecidimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o benílico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinal; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas tales como 5 albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

10 [0196] La formulación también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que está tratándose, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan adversamente entre sí.

15 [0197] Los antagonistas descritos en el presente documento también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, 20 microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16^a edición, Osol, A. Ed. (1980).

[0198] Las formulaciones que van a usarse para administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se realiza fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

25 [0199] Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el agente activo cuyas matrices están en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente de EE.UU. nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato 30 de γ-etilo, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuproliida), y ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante períodos de tiempo más cortos.

MODOS DE TERAPIA

35 [0200] Las moléculas descritas en el presente documento son útiles en el tratamiento de diversas afecciones patológicas tales como cáncer. Estas afecciones pueden tratarse mediante la administración de uno o más antagonistas descritos en el presente documento.

40 [0201] El médico experto puede hacer el diagnóstico en mamíferos de las diversas afecciones patológicas descritas en el presente documento. Las técnicas de diagnóstico están disponibles en la técnica que permiten, por ejemplo, el diagnóstico o la detección de cáncer o enfermedad inmunitaria relacionada en un mamífero. Por ejemplo, 45 los cánceres pueden identificarse mediante técnicas que incluyen, pero no se limitan a, palpación, análisis de sangre, rayos X, RMN y similares.

50 [0202] El (Los) antagonista(s) puede(n) administrarse según procedimientos conocidos tales como administración intravenosa como un bolo o por infusión continua durante un periodo de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intra-articular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, o por inhalación. Opcionalmente, la administración puede realizarse mediante infusión con minibomba usando diversos dispositivos comercialmente disponibles. Los antagonistas también pueden emplearse usando técnicas de terapia génica que se han descrito en la técnica.

55 [0203] Dosificaciones y programas eficaces para administrar antagonistas pueden determinarse empíricamente, y el hacer tales determinaciones está dentro de la habilidad en la técnica. Pueden emplearse dosificaciones únicas o múltiples. Actualmente se cree que una dosificación o cantidad eficaz de antagonista usado solo puede oscilar de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal o más por día. La gradación de dosificaciones entre especies puede realizarse de un modo conocido en la técnica, por ejemplo, como 60 se desvela en Mordenti y col., Pharmaceut. Res., 8:1351 (1991).

[0204] Cuando se emplea la administración *in vivo* de un antagonista del mismo, las cantidades de dosificación normal pueden variar de aproximadamente 10 ng/kg a 100 mg/kg de peso corporal de mamífero o más por día, preferentemente aproximadamente 1 µg/kg/día a 10 mg/kg/día, que depende de la vía de administración. La

orientación sobre dosificaciones y procedimientos particulares de administración se proporciona en la bibliografía; véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 4.657.760; 5.206.344; o 5.225.212. Se anticipa que las diferentes formulaciones serán eficaces para diferentes compuestos de tratamiento y diferentes trastornos, eligiendo esa administración como diana un órgano o tejido, por ejemplo, puede necesitar administración de un modo diferente de ese a otro órgano o tejido. Aquellos expertos en la materia entenderán que la dosificación de antagonista que debe administrarse variará dependiendo de, por ejemplo, el mamífero que recibirá el agonista o antagonista, la vía de administración y los otros fármacos o terapias que se administran al mamífero.

[0205] Dependiendo del tipo de células y/o gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1-20 mg/kg) de anticuerpo antagonista es una dosificación candidata inicial para administración, tanto, por ejemplo, por una o más administraciones separadas como por infusión continua. Una dosificación diaria típica puede oscilar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantiene hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de enfermedad. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación.

[0206] Puede usarse un único tipo de antagonista en los procedimientos de la invención. Por ejemplo, puede administrarse una molécula de inmunoadhesina WISP-1. Alternativamente, el médico experto puede optar por emplear una combinación de antagonistas en los procedimientos, por ejemplo, una combinación de una inmunoadhesina WISP-1 y un anticuerpo de WISP-1. Se contempla que todavía puedan emplearse terapias adicionales en los procedimientos. La una o varias terapias distintas pueden incluir, pero no se limitan a, administración de radioterapia, citocina(s), agente(s) inhibidor(es) del crecimiento, agente(s) quimioterapéutico(s), agente(s) citotóxico(s), inhibidores de tirosina cinasas, inhibidores de ras-farnesiltransferasa, inhibidores de la angiogénesis e inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas que se conocen en la técnica y se definen adicionalmente con particularidad en la Sección I anterior. Además, terapias basadas en anticuerpos terapéuticos que eligen como diana antígenos tumorales tales como Rituxan™ o Herceptin™, además de anticuerpos antiangiogénicos tales como anti-VEGF.

[0207] La preparación y los programas de dosificación para agentes quimioterapéuticos pueden usarse según las instrucciones del fabricante o como se determina empíricamente por el médico experto. La preparación y los programas de dosificación para tal quimioterapia también se describen en Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992). El agente quimioterapéutico puede preceder, o seguir la administración de, por ejemplo, un antagonista, o puede administrarse simultáneamente con el mismo. El antagonista también puede combinarse, por ejemplo, con un compuesto antiestrogénico tal como tamoxifeno o una antiprogesteron tal como onapristona (véase el documento EP 616812) en dosificaciones conocidas para tales moléculas.

[0208] También puede desearse administrar anticuerpos contra otros antígenos tales como anticuerpos que se unen a CD20, CD11a, CD18, CD40, CD44, ErbB2, EGFR, ErbB3, ErbB4, factor endotelial vascular (VEGF) u otros miembros de la familia de TNFR (tales como DR4, DR5, OPG, TNFR1, TNFR2). Alternativamente, o además, dos o más anticuerpos que se unen al mismo antígeno o dos o más antígenos diferentes desvelados en el presente documento pueden coadministrarse al paciente. Algunas veces también puede ser beneficioso administrar una o más citocinas al paciente. En una realización, los antagonistas en el presente documento se coadministran con un agente inhibidor del crecimiento. Por ejemplo, el agente inhibidor del crecimiento puede administrarse primero, seguido de un antagonista de la presente invención.

[0209] El antagonista y la una o varias terapias distintas pueden administrarse simultáneamente o secuencialmente. Tras la administración de antagonista pueden analizarse las células tratadas *in vitro*. Si ha sido tratamiento *in vivo*, un mamífero tratado puede monitorizarse de diversas formas muy conocidas para el médico experto.

ARTÍCULOS DE FABRICACIÓN

[0210] Un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente se describe en el presente documento. El artículo de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta. Recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringuillas y tubos de ensayo. Los recipientes pueden estar formados por una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es eficaz para tratar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de disolución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Los agentes activos en la composición pueden comprender antagonista(s). La etiqueta sobre el, o asociada al, recipiente indica que la composición se usa para tratar la afección de elección. El artículo de fabricación puede comprender adicionalmente un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable tal como solución salina tamponada con fosfato, disolución de Ringer y disolución de dextrosa. Adicionalmente puede incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario que incluyen otros tampones, diluyente, filtros, agujas, jeringuillas y prospectos con instrucciones para uso.

[0211] Los siguientes ejemplos sólo se ofrecen para fines ilustrativos y no pretenden limitar de ningún modo el alcance de la presente invención.

EJEMPLOS

5 [0212] Los reactivos comercialmente disponibles mencionados en los ejemplos se usaron según las instrucciones del fabricante, a menos que se indique lo contrario. La fuente de aquellas células identificadas en los siguientes ejemplos, y en toda la memoria descriptiva, por los números de acceso de ATCC es la Colección americana de cultivos tipo, Manassas, VA. A menos que se indique lo contrario, la presente invención usa 10 procedimientos convencionales de tecnología de ADN recombinante tales como aquellos descritos anteriormente en el presente documento y en los siguientes libros de texto: Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press N.Y., 1989; Ausubel y col., Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989; Innis y col., PCR Protocol: A Guide to Methods And Applications, Academic Press, Inc., N.Y., 1990; Harlow y col., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold 15 Spring Harbor, 1988; Gait, M.J., Oligonucleotide Synthesis, IRL Press, Oxford, 1984; R.I. Freshney, Animal Cell Culture, 1987; Coligan y col., Current Protocols in Immunology, 1991.

20 [0213] Una descripción de los ensayos y materiales mencionados en los siguientes ejemplos se proporciona más adelante:

25 [0214] Proteínas y anticuerpos: La proteína de fusión WISP-1-Fc humana de longitud completa se expresó y se purificó como se describe previamente (Desnoyers y col., J. Biol. Chem., 276:47599-47607 (2001)). El anticuerpo CD44 anti-rata de ratón purificado (clon OX49) era de BD Bioscience (Bedford MA). El anticuerpo de control de isotipo IgG2a de ratón era de Pharmingen. El CD44 anti-rata de ratón conjugado con FITC era de Serotec (Raleigh, NC) y el anticuerpo de control de isotipo IgG1 de ratón conjugado con FITC era de DAKO (Dinamarca). El CD44 anti-ratón de rata (clon KM114) era de Pharmingen. El anticuerpo de actina (clon C4) era de ICN biomedicals (Aurora, OH). Los anticuerpos monoclonales de WISP-1 anti-humanos murinos se generaron y se seleccionaron usando WISP-1-Fc como inmunógeno y los protocolos y reactivos descritos en los Ejemplos de la patente de EE.UU. nº 6.387.657 concedida el 14 de mayo de 2002. Cinco de tales anticuerpos monoclonales han sido depositados por los 30 solicitantes en la ATCC, como se indica más adelante.

35 [0215] Células y especímenes de tejido: Las líneas celulares NRK-49F y SW480 (ATCC, Manassas, VA) se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco con alto contenido de glucosa (HGDMEM) complementado con suero bovino fetal al 10% (SBF). C57MG parentales, C57MG que expresan Wnt-1 (C57MG/Wnt-1), NRK-49F que expresa altos niveles de hWISP-1 (NRK/WISP-1H), NRK-49F que expresa niveles más bajos de hWISP-1 (NRK/WISP-1L) y NRK-49F que contiene un vector vacío (NRK/control) se obtuvieron de Arnold Levine (Princeton University, Princeton, NJ) y se mantuvieron en medios que contenían 2,5 µg ml⁻¹ de puromicina (Xu y col., Genes Dev., 14:585-595 (2000)). Los ratones transgénicos Wnt-1 obtenidos de Harold Varmus (National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD) se criaron con ratones nulos para p53 obtenidos de Jackson 40 Laboratories (Bar Harbor, MA) para generar los ratones transgénicos Wnt-1/de genes inactivos p53. Los especímenes de tumor de mama y de epitelio del conducto mamario se extirparon de aquellos ratones para análisis.

45 [0216] Ensayo de exclusión de partículas: El ensayo de sedimentación de eritrocitos se usó como se describe previamente, con modificaciones mínimas. (Knudson y col., J. Cell Sci., 99:227-235 (1991)). Se sembraron NRK/WISP-1 ((fibroblastos de riñón de rata normales transfectados con WISP-1; véase Xu y col., Genes Dev., 14:585-595 (2000)) y células NRK/control (fibroblastos de riñón de rata normales; obtenidos de Arnold Levine, Princeton University, Princeton, NJ) (1 X 10⁵ células/pocillo) en placas de 6 pocillos Falcon (Becton Dickinson, Franklin Lanes, NJ) y se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco con alto contenido de glucosa complementado con suero bovino fetal al 10% (SBF) (Life Technologies, Gaithersburg, MD) durante la noche a 37°C, 5% de CO₂. Al día siguiente, el medio se eliminó y se añadieron 10⁸ RBC de oveja (Inter-Cell Technologies, Hopewell, NJ) en 750 µl de PBS/BSA al 0,1% (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN) y se dejaron depositar durante 15 minutos. Las células se observaron usando un microscopio invertido Nikon Diaphot 300 y se adquirieron imágenes digitales usando una cámara de fotos digital SONY DPK-5000 (Japón).

55 [0217] Tinción con hialuronano de células cultivadas: La tinción con hialuronano se realizó como se describe previamente, con modificaciones mínimas (Pienimaki y col., J. Biol. Chem., 276:20428-20435 (2001)). Las células NRK/WISP-1 y NRK/control (8-10 X 10³) se sembraron en portaobjetos de plástico de 8 pocillos y se mantuvieron (como se describe anteriormente) durante la noche a 37°C, 5% de CO₂. Al día siguiente, las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron con PBS y los sitios de unión no específica se saturaron durante 30 minutos con agua destilada que contenía albúmina de suero bovino al 1% (BSA) y Triton X-100 al 0,1% (Calbiochem, LaJolla, CA). Se añadió proteína biotinilada de unión a HA (HA-BP) (Seikagaku America, Falmouth, MA) (5 µg/ml en PBS/BSA al 3%) y se incubó durante la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, las células se lavaron con PBS y se incubaron durante 30 minutos con 1:1000 de estreptavidina conjugada con FITC (DAKO,

Carpinteria, CA) en TBS y 1%/BSA. Las células se lavaron en PBS, se montaron usando Vectashield (Burlingame, CA) que contenía 1 µg/ml de Hoechst 33342 (Molecular Probes, Eugene, OR) y se visualizaron bajo un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 800. Las imágenes se adquirieron con una cámara Photometrics 300 CCD operada a -40°C conectada a un ordenador Apple G3. El mismo procedimiento también se usó para teñir secciones congeladas de tumores mamarios de ratones transgénicos Wnt-1.

[0218] RT-PCR en tiempo real: El nivel de expresión relativo de ARN se determinó usando RT-PCR en tiempo real como se informó previamente (Winer y col., Anal. Biochem., 270:41-49 (1999)). El ARN total se extrajo de células con Tri-Reagent usando el protocolo del fabricante (Molecular Research Center). Los cebadores específicos y las sondas fluorogénicas se diseñaron y se usaron para amplificar y cuantificar el nivel de expresión de genes. Las señales específicas de genes se normalizaron a la del gen de mantenimiento gliceralehído-3-fosfato deshidrogenasa. Los conjuntos de datos por triplicado se promediaron para cada condición. Todos los reactivos de RT-PCR TaqMan se compraron de Applied Biosystems (Foster City, CA). Para probar el efecto de WISP-1 recombinante sobre la expresión de genes, placas de Petri (35 mm) se recubrieron durante la noche a 4°C con 75 µg ml⁻¹ de hWISP-1-Fc en PBS. Al día siguiente, las células (3 X 10⁵ células/placa) se sembraron en la superficie recubierta y el análisis de expresión se realizó después de 18 horas. En ciertos casos, la superficie recubierta se lavó y se trató durante 2 horas adicionales a temperatura ambiente antes de sembrar las células.

[0219] Análisis por FACS: Las células se recogieron por tripsinización, se lavaron con PBS y se incubaron en PBS BSA al 1%/glucosa al 20% que contenía 1 µg ml⁻¹ de anti-CD44 conjugado con FITC (Serotec, Raleigh, NC) o un Ab de control de isotipo (DAKO, Dinamarca) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron con el mismo tampón y se analizaron en un EPICS XL-MCL (Coulter, Miami, FL).

[0220] Transferencia Western: Se cultivaron NRK/C y NRK/W1H a confluencia en placas de 10 cm². Las células se lavaron con PBS y se extrajeron con 300 µl de Triton-X100 al 1% en TBS durante 5 minutos. Las proteínas se precipitaron añadiendo 10 volúmenes de acetona al extracto. Las muestras se redujeron, se desnaturizaron y se cargaron sobre un gel de poliacrilamida SDS al 4-20% de gradiente. El gel se transfirió a membranas de PVDF y se sondó con un anticuerpo CD44 anti-rata (OX49) o uno CD44 anti-ratón (KM114) a una concentración de 1 µg/ml y se detectó usando un anticuerpo secundario IgG anti-ratón conjugado con HRP y los reactivos de detección de Amersham ECL. La detección de actina en las muestras se usó como control de carga.

[0221] Ensayo de dispersión: Las células se sembraron en placas de 24 pocillos a baja concentración (~1000 células/pocillo) y se dejó que formaran colonias durante 3 días. Las células se tiñeron usando Diff-Quik (Dade Behring, Newark, DE) y las colonias se observaron bajo el microscopio.

[0222] Ensayo de cicatrización de células: La migración de células se evaluó usando un ensayo de cicatrización de células previamente descrito con modificaciones menores (Pienimaki y col., J. Biol. Chem., 276:20428-20435 (2001)). Brevemente, las células se cultivaron hasta que alcanzaron la confluencia. Se extrajo una línea (~1 mm) en la capa de células usando una micropipeta equipada con un punta amarilla desecharable. La migración de células con respecto al área limpia se monitorizó por microscopía a intervalos de tiempo durante 15 horas. El área nuevamente ocupada por las células después de este periodo se midió usando el software de imágenes NIH calibrado con un micrómetro de platina.

[0223] Microscopía a intervalos de tiempo: Las células se sembraron en placa en HGDMEM/SBF al 10% y se observó su migración aleatoria durante 15 horas usando microscopía a intervalos de tiempo. La distancia cubierta por las células se midió usando el software de imágenes NIH calibrado con un micrómetro de platina.

[0224] Ensayo de migración: Se midió la haptotaxis usando un sistema de cámara de Boyden modificado como se describe previamente (Bourguignon y col., J. Biol. Chem., 275:1829-1838 (2000)). La parte inferior de filtros de membrana de PET con forma de 25 pocillos de 8 µm de porosidad (Falcon) se recubrió durante la noche a 4°C con 50 µl de proteína (50 pg ml⁻¹) en PBS. Los insertos recubiertos se aclilaron en medio libre de suero y a la cámara superior se añadieron 0,5 X 10⁵ células NRK en 0,5 ml de HGDMEM/SBF al 10%. La cámara inferior se llenó con 0,75 ml del mismo medio y las placas se incubaron durante la noche a 37°C. Al día siguiente, la cámara superior se limpió con un hisopo de algodón y las células que migraron al lado inferior del inserto se tiñeron con el kit de tinción Diff-Quik (Dade Behring Inc.) y se contaron bajo el microscopio. Los conjuntos de datos por triplicado se promediaron para cada condición.

[0225] En ciertos casos, los insertos recubiertos se lavaron y se trataron durante 2 horas adicionales a temperatura ambiente.

[0226] Hibridación *in situ*: Se diseñaron cebadores de PCR para amplificar tanto un fragmento de 740 pb de WISP-1 murina que se extiende desde los nt 440-1180 de NM_018865 (superior- 5' GGCTGCCATCTGTGACCCA (SEQ ID NO:12) e inferior- 5' CATAGGACCT GCCGGGGAGAA A (SEQ ID NO:13)) o un fragmento de 706 pb de WISP-1 murina que se extiende desde los nt 204-910 de NM_018865 (superior- 5' GCCGTGGCAGTCCTGAGGG

(SEQ ID NO:14) e inferior- 5' CAGCACCGGG CATTGACGTT A (SEQ ID NO:15)) o un fragmento de 464 pb de CD44 murino que se extiende desde los nt 144-608 de M27129 (superior- 5' TGGAGAAAAATGGCCGCTAC A (SEQ ID NO:16) e inferior-5' TGGGGTGCTC TTCTCGATGG (SEQ ID NO:17)) o un fragmento de 630 pb de HAS2 murino que se extiende desde los nt 927-1557 de NM_008216 (superior- 5' GGACAAATCGGCCACGTACA T (SEQ ID NO:18) e inferior-5' CTTGCTCCAT CGGGTCTGC (SEQ ID NO:19)). Los cebadores incluyeron extensiones que codificaban sitios de iniciación de T7 o T3 ARN polimerasa de 27 nucleótidos para permitir la transcripción *in vitro* de sondas sentido o antisentido, respectivamente, de los productos amplificados. (Lu y col., Cell Vision, 1:169-176 (1994)). Todos los tejidos se fijaron en formalina al 4% y se incorporaron en parafina. Se desparafinaron secciones de 3-5 micrómetros de espesor, se desproteinaron en 4 mg/ml de proteinasa K durante 30 minutos a 37°C y se procesaron adicionalmente para la hibridación *in situ* como se describe previamente. (Holcomb y col., EMBO J., Aug 2000 1;19(15):4046-55). Las sondas sentido y antisentido marcadas con ³³P-UTP se hibridaron con las secciones a 55°C durante la noche. La sonda sin hibridar se eliminó por incubación en 20 mg/ml de RNase A durante 30 minutos a 37°C, seguido de un lavado de alta rigurosidad a 55°C en 0,1 X SSC durante 2 horas y deshidratación mediante etanoles graduados. Los portaobjetos se sumergieron en emulsión de rastreo nuclear NBT2, se expusieron en cajas de portaobjetos de plástico selladas que contenían desecante durante 4 semanas a 4°C, se revelaron y se contratiñeron con hematoxilina y eosina.

EJEMPLO 1

20 [0227] Se usaron líneas celulares de fibroblastos estables que expresan niveles altos (NRK/WISP-1H) o bajos (NRK/WISP-1L) de WISP-1 y una línea celular de control que contenía un vector vacío (NRK/control) para evaluar el efecto de WISP-1 en la producción de HA. Como se demuestra por el ensayo de exclusión de partículas, las células NRK/WISP-1H acumularon una gran recubrimiento pericelular de hialuronano que puede excluir eritrocitos en sedimentación (Fig. 1a). NRK/WISP-1L acumularon una matriz pericelular más pequeña (Fig. 1b), mientras que ninguna matriz rodeó a las células NRK/control (Fig. 1e) o NRK/WISP-1H tratadas con hialuronidasa (datos no mostrados). La acumulación de HA asociada a la superficie de células también se evaluó por tinción fluorescente usando la proteína biotinilada de unión a HA (bHABP). La tinción reveló la acumulación de HA en la superficie de células NRK/WISP-1H (Fig. 1d), mientras que no se detectó tinción sobre células de control NRK (Fig. 1e).

30 [0228] El efecto de WISP-1 sobre la secreción de HA se evaluó comparando la acumulación de HA en los medios de cultivo de células NRK/WISP-1H con respecto a células NRK/control con respecto al tiempo. Después de 24 horas, la concentración de HA en el medio de NRK/WISP-1H era 3,5 veces superior a la del medio de células NRK/control y aumentó gradualmente hasta 8 veces después de 144 h (Fig. 1f). Estos resultados muestran juntos que la expresión de WISP-1 en células NRK promueve la acumulación de HA en la superficie de células y en los medios de cultivo.

EJEMPLO 2

40 [0229] Para identificar la enzima responsable de la producción de HA desencadenada por WISP-1 se analizó la expresión de las HA sintetasas conocidas (HAS1, HAS2 y HAS3) en células NRK/WISP-1H, NRK/WISP-1L y NRK/control. La expresión de HAS2 aumentó hasta 10 veces en células productoras de WISP-1, mientras que los niveles de ARNm de HAS1 y HAS3 fueron idénticos al control (Fig. 2a). Los niveles de ARNm de CD44 y RHAMM también aumentaron en líneas celulares NRK/WISP-1, mientras que la expresión de hialuronidasa permaneció invariable (Fig. 2a). Además, los niveles de ARNm de HAS2, CD44 y RHAMM fueron proporcionales a la expresión de WISP-1. Como se demuestra por análisis de FACS (Fig. 2b) y transferencia Western (Fig. 2c), el aumento en la expresión de ARNm de CD44 en las células NRK/WISP-1H produjo un aumento de 4 veces en el nivel en proteína de CD44.

EJEMPLO 3

50 [0230] Se mostró que HA estimulaba la migración de células interactuando con dos receptores de la superficie de células, CD44 y RHAMM (Hall y col., anteriormente; Bourguignon y col., anteriormente). Debido a que WISP-1 aumentó tanto la producción de HA como la expresión de CD44 y RHAMM, se evaluó la motilidad de células que expresaban WISP-1. Cuando se sembraron a una baja densidad, las células NRK/control proliferaron y se formaron colonias muy definidas (Fig 3a). Las células NRK/WISP-1L proliferantes formaron menos grupos definidos que algunas células apartadas de las colonias en crecimiento (Fig. 3b). No se observaron colonias de NRK/WISP-1H, las células se dispersaron en un patrón aleatorio (Fig. 3c). A diferencia del control (Fig. 3d), las células que expresaban WISP-1 también revelaron una morfología hiperalargada con lamelipodios extendidos característicos de alta motilidad (Fig. 3e). Usando microscopía a intervalos de tiempo se observó un aumento de 4 veces en la distancia de migración de NRK/WISP-1H en comparación con células de control (Fig. 3f). NRK/WISP-1H también mostraron un aumento de 2,5 en el área de migración en un ensayo de cicatrización de células (Fig. 3g). Estos resultados muestran juntos que la expresión de WISP-1 puede promover la migración de células.

EJEMPLO 4

[0231] Para determinar si la adición ectópica de WISP-1 podría promover la expresión de HAS2 y la migración de células se realizó un ensayo usando WISP-1-IgG recombinante purificado (Desnoyers y col., anteriormente). La adición de WISP-1 a los medios de cultivo no promovió la expresión de HAS2 (datos no mostrados). Cuando las células NRK se sembraron sobre una superficie recubierta con WISP-1-IgG, la expresión de HAS2 aumentó en comparación con células sembradas sobre plástico sin recubrir o sobre una superficie recubierta de proteína químérica de IgG irrelevante (TNFR-IgG) (Fig. 4a). Aunque la decorina sola promovió la expresión de HAS2, esta inducción aumentó adicionalmente tres veces después de incubarse la superficie recubierta con WISP-1. También se examinaron los efectos de la adición ectópica de WISP-1 sobre la migración de células NRK. En un ensayo en Transwell, WISP-1-IgG indujo la migración haptotáctica de células NRK cuando se recubrieron sobre la superficie inferior del filtro (Fig. 4b). El recubrimiento de una proteína químérica de IgG irrelevante (TNFR-IgG) o la adición de WISP-1-IgG a la cámara inferior no promovió la migración. Un anticuerpo CD44 o de WISP-1 (Fig. 4b) inhibió la migración haptotáctica inducida por WISP-1. Además, la actividad haptotáctica de WISP-1 no se limitó a fibroblastos ya que también promovió la migración de células SW480, una línea celular de adenocarcinoma de colon (Fig. 4c). Estos resultados muestran juntos que la adición ectópica de WISP-1 aumenta la expresión de HAS2 y promueve la migración de células mediante un mecanismo mediado por CD44. Se cree, aunque no se entiende completamente, que la presentación de WISP-1 puede ser importante para la migración ya que puede necesitar unirse a un sustrato para provocar esta actividad.

EJEMPLO 5

[0232] Debido a que se cree que WISP-1 es un efector aguas abajo de Wnt-1, se analizó la expresión de WISP-1, HAS2 y CD44 en una línea celular epitelial mamaria establemente transfectada con Wnt-1 (C57MG/Wnt-1). Cuando se compararon con la línea celular de control (C57MG), las células C57MG/Wnt-1 mostraron un aumento de 2,7, 5,8 y 3 veces en la expresión de ARNm de WISP-1, HAS2 y CD44, respectivamente (Fig. 5a). Como se demuestra por transferencia Western, las células C57/Wnt-1 también mostraron un aumento de 6 veces en el contenido en proteína de CD44 (Fig. 5b). Además, a diferencia de la línea celular de control, las células que expresaban Wnt-1 fracasaron al formar distintas colonias y se dispersaron cuando se pusieron en cultivo a baja densidad (Fig. 5c). Estos resultados muestran que la expresión de HAS2 y CD44 y la motilidad de células son elevadas en líneas celulares en las que la expresión de WISP-1 está desencadenada por Wnt-1.

EJEMPLO 6

[0233] La expresión de Wnt-1 en epitelio mamario promueve el desarrollo de tumores en ratones transgénicos (Li y col., Oncogene, 19:1002-1009 (2000); Tsukamoto y col., Cell, 55:619-625 (1988)). Debido a que WISP-1 es un efector putativo aguas abajo de Wnt-1, se midió la expresión de ARNm de HAS2 y CD44 en tumores mamarios espontáneos a partir de ratones transgénicos MMTV-Wnt-1. Cuando se comparó con epitelio del conducto mamario, la expresión de ARNm de HAS2 aumentó entre 2,5 y 5,5 veces en todos los tumores mamarios analizados (n=5; Fig. 5d). Similarmente, la expresión de ARNm de CD44 se indujo entre 2,2 y 4,2 veces en todos los tumores (n=5; Fig. 5e). Estos resultados muestran que HAS2 y CD44 están expresados en exceso en tumores mamarios de ratones transgénicos MMTV-Wnt-1 que expresan WISP-1.

EJEMPLO 7

[0234] La hibridación *in situ* demostró una elevada expresión de WISP-1 en el estroma peritumoral de tumores mamarios de ratones transgénicos MMTV-Wnt-1 (Fig. 6a, b). A diferencia, la expresión de HAS2 (Fig. 6c-d) y CD44 (Fig. 6 e-f) sólo se encontró en células epiteliales tumorales. La localización de CD44 en el parénquima tumoral se confirmó por inmunohistoquímica (Fig. 6g). La tinción de proteína de unión reveló una acumulación de hialuronano asociada al estroma de tumor (Fig. 6h). La mayor intensidad de tinción se encontró en la proximidad inmediata del lóbulo tumoral, mientras que la tinción más débil estaba localizada con respecto al epitelio del conducto mamario normal. Estos hallazgos están de acuerdo con la sugerencia de que WISP-1 puede regular interacciones entre células tumorales y de estroma que implican ácido hialurónico y CD44.

EJEMPLO 8

[0235] La metástasis y el potencial de crecimiento de líneas transformadas se evaluó como se describe previamente (Welch y col., Cancer Res., 60:1552-1556 (2000)). Se usaron ratones hembra nu/nu Swiss de nueve semanas de edad. Brevemente, las células se recogieron por trypsinización y se lavaron dos veces con PBS. Cada ratón se inyectó en la vena lateral de la cola con 100 µl de una suspensión que contenía 5×10^4 o $2,5 \times 10^5$ células. 2, 3 y 4 semanas posinyección, los ratones se examinaron usando obtención de imágenes por resonancia cinemagnética (MRI) para la aparición de lesiones pulmonares y se realizaron las autopsias. Los pulmones se perfundieron en fijador de Bouin, se extirparon y se generaron secciones teñidas con H&E para la evaluación de la colonización tumoral pulmonar.

[0236] Se evaluaron secciones longitudinales del pulmón izquierdo, y una única sección transversal de los lóbulos craneales, mediales, caudales y accesorios del pulmón derecho. Histológicamente, los pulmones afectados tenían células neoplásicas fusiformes que se infiltraron en el intersticio pulmonar. Sin embargo, debido a que la gravedad de los cambios era variable, se estableció el siguiente sistema de clasificación. I = implicación mínima en el intersticio pulmonar - 10-20% del pulmón está afectado. Nidos y agrupaciones de células neoplásicas fusiformes rompen multifocalmente el intersticio pulmonar. Los focos afectados están comúnmente a lo largo de la superficie pleural, extendiéndose en el intersticio. No se afectan vasos ni vías pulmonares grandes. II = implicación moderada del intersticio pulmonar - 20-50% del pulmón está afectado. Nidos y agrupaciones de células neoplásicas fusiformes rompen multifocalmente el intersticio pulmonar. Algunos vasos o vías respiratorias grandes están llenos de células fusiformes. Las células fusiformes forman frecuentemente una banda ancha o gran masa subyacente a la pleura y que se extiende en el intersticio. El mesotelio depositado encima es grueso (reactivo).

[0237] III = implicación grave del intersticio pulmonar - 50- 100% del pulmón está afectado. Nidos y agrupaciones de células neoplásicas fusiformes rompen multifocalmente el intersticio pulmonar. Los vasos sanguíneos y las vías respiratorias grandes están llenos de células fusiformes. Las células fusiformes forman una banda ancha o gran masa subyacente a la pleura y que se extiende en el intersticio. Las células fusiformes están frecuentemente incorporadas en un material acelular de basófilo a anfófilo pálido. El mesotelio depositado encima es grueso (reactivo). Queda un área mínima sin afectar para el intercambio de gas.

[0238] Los resultados de la colonización de pulmón de ratones desnudos inoculados con células NRK/WISP-1H, NRK/WISP-1L y NRK/control se resumen en las Figuras 7 y 10. En ratones inoculados con NRK/WISP-1H o NRK/WISP-1L, las células formaron masas de pulmón de un modo dependiente del tiempo y de la dosis. Las lesiones más graves se observaron en ratones inyectados con $2,5 \times 10^5$ NRK/WISP-1H y a los que se les hizo la autopsia 4 semanas posinyección. 2 y 3 semanas posinyección, los ratones tenían menos formación de tumores grave, pero progresiva (grado I - II; véase el sistema de clasificación antes). Los ratones inyectados con $2,5 \times 10^5$ NRK/WISP-1L sólo tenían una mínima formación de tumores pulmonares 4 semanas posinyección. Después de 4 semanas posinyección, los ratones inoculados con $0,5 \times 10^5$ células NRK/WISP-1L eran o normales o tenían una mínima infiltración neoplásica (grado I), mientras que los ratones inyectados con $0,5 \times 10^5$ células NRK/WISP-1H mostraron un aumento de la infiltración neoplásica (grado I - II). La observación histológica reveló que los pulmones de animales inoculados con células NRK/control eran normales (Fig. 7a-c). En animales inyectados con NRK/WISP-1, las células fusiformes neoplásicas formaron inicialmente pequeñas agrupaciones dentro de, sobresaliendo de, o subyacentes a la superficie pleural de los pulmones (grado I; Fig. 7d-f) frecuentemente incorporados en un material acelular de basófilo a anfófilo pálido. En animales más gravemente afectados, las células neoplásicas formaron una amplia banda confluyente subyacente a la pleura (grado II; Fig. 7g-i). En los animales más gravemente afectados, los vasos sanguíneos y las vías respiratorias grandes se llenaron de células fusiformes, (grado III; Fig. 7j-1). El análisis por MRI mostró un aumento de la densidad (hiperseñal) que trazaba los pulmones derecho e izquierdo entre la pleura en animales con invasión histológica de grado II y grado III. La gravedad de la lesión en MRI guardaba relación con la puntuación histológica (Figura 7a, d, g, j). Estos resultados indican que la expresión de WISP-1 promueve el potencial de crecimiento metastásico celular.

EJEMPLO 9

[0239] Se inocularon células NRK/WISP-1H ($2,5 \times 10^5$ células) en la vena de la cola de ratones desnudos. Empezando en el día de la inoculación de las células, los ratones se inyectaron intraperitonealmente dos veces a la semana con 10 mg/kg de un anticuerpo CD44, un anticuerpo de control de isotipo o con tampón solo (PBS). Los pulmones se fijaron y se extirparon después de cuatro semanas para el análisis anatómico macroscópico.

[0240] Despues de 4 semanas, la gravedad de las lesiones encontradas en animales tratados con el anticuerpo CD44 (n=5) varió de normal a grado I, mientras que todos los animales (n=10) tratados con un anticuerpo de control o solución salina tenían lesiones de grado III (Fig. 8a). El área promedio de los focos metastásicos en los pulmones de animales tratados con anticuerpo CD44 se redujo el 99% ($P < 0,00003$) en comparación con animales tratados con un anticuerpo de control (Fig. 8b).

EJEMPLO 10

[0241] Se realizó un ensayo para examinar la especificidad de unión de ciertos anticuerpos de WISP-1. Se clonaron WISP-1 de ratón de longitud completa (número de acceso de GenBank NM_018865) y WISP-1 humana de longitud completa (número de acceso de GenBank AF100779; Fig. 9) en un vector de expresión que codificaba la región Fc de IgG₁ humana aguas abajo de la secuencia de WISP-1. La proteína de fusión recombinante resultante (WISP-1-Fc) se sintetizó en un sistema de expresión en baculovirus usando células de insecto Sf9 y se purificó hasta homogeneidad a partir de medio acondicionado libre de suero por cromatografía de afinidad sobre una proteína A-Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech). La WISP-1 humana de longitud completa también se expresó con un marca de hexahistidina del extremo amino (WISP-1-His) en una cepa de *E. coli*. Los lisados de células se sometieron a cromatografía en una columna de Ni²⁺-NTA agarosa (Qiagen). WISP-1-His se eluyó con un

gradiente de imidazol 0 a 500 mM. Las fracciones que contenían la WISP-1-His eluída se reunieron y se dializaron. La WISP-1 humana de un sistema de expresión en mamífero se obtuvo lisando células NRK establemente transfectadas con WISP-1 humana (Arnold Levine; Princeton University, Princeton, NJ) con tampón de muestra de SDS-PAGE. Se generó un lisado de células de control con células NRK establemente transfectadas con un vector vacío.

5 [0242] Se sometió WISP-1 (50 ng) de diversos sistemas de expresión a electroforesis sobre un gel de SDS-poliacrilamida y se electrotransfirió sobre membranas de poli(difluoruro de vinilo) (PVDF) y se sondaron con diferentes anticuerpos monoclonales de WISP-1.

10 [0243] Los anticuerpos de WISP-1 3D11.D7 (también denominado en el presente documento "3D11"), 11C2.C10 (también denominado en el presente documento "11C2"), 9C11.C7 (también denominado en el presente documento "9C11") y 5D4.F6 (también denominado en el presente documento "5D4") se unieron específicamente a WISP-1 generada a partir de sistemas de expresión en baculovirus, bacterianos y en mamífero (Fig. 11a). Estos anticuerpos no se unieron a la WISP-1 murina de baculovirus y no reconocieron ninguna proteína del lisado de control. Los anticuerpos de WISP-1 6F8, 3A7, 10H12, 3A11, 6E3, 3H10, 5G1 y 10B1 reconocieron WISP-1 tanto humana como murina sólo cuando se generaron con el sistema de expresión en baculovirus (Fig. 11b). Estos anticuerpos no reconocieron WISP-1 humana cuando se produjeron en un sistema de expresión bacteriano o en mamífero. El anticuerpo del clon 9C10 no se unió a ninguna proteína después de la transferencia Western.

15 [0244] Estos resultados sugieren que los anticuerpos de WISP-1 3D11, 11C2, 9C11 y 5D4 reconocen específicamente WISP-1 humana y pueden usarse para la detección de WISP-1 por transferencia Western.

EJEMPLO 11

20 [0245] Se realizó un ensayo para identificar los epítopos reconocidos por los anticuerpos de WISP-1 11C2, 9C11, 5D4 y 3D11.

25 [0246] Se clonó WISP-1 humana de longitud completa (número de acceso de GenBank AF100779) en un vector de expresión pIRESpuro2 (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA) que codificaba 6 histidinas aguas abajo de la secuencia de WISP-1. Los mutantes de delección también se generaron eliminando uno, dos o tres dominios de WISP-1 humana. Las construcciones resultantes también se clonaron en el vector de expresión pIRESpuro2. La nomenclatura usada para identificar las diferentes construcciones de WISP-1 se refiere a los dominios que contienen (véase la Fig. 12B). El dominio 1 es el dominio de proteína de unión a factor de crecimiento similar a la insulina (IFGBP), el dominio 2 es el dominio del factor de von Willebrand C (VWFc), el dominio 3 es el dominio de trombospondina (TSP) y el dominio 4 es el dominio del extremo C (CT). La región variable reside entre el dominio 2 y 3. Estas regiones y dominios de WISP-1 se ilustran en la Fig. 12A.

30 [0247] Las secuencias que codifican estos dominios de WISP-1 son del siguiente modo: Secuencias de construcciones de WISP-1

40 Dominio 1:

```
GAATTCACCATGAGGTGGTCCCTGCCCTGGACGCTGGCAGCAGTGACAGCAGCAGCCGCCAGCACCGTC
CTGGCCACGGCCCTCTCTCCAGCCCTACGACCATGGACTTACTCCAGCTCCACTGGAGGACACCTCC
TCACGCCCCCAATTCTGCAAGTGGCCATGTGAGTGCCCCGCATCCCCACCCCGCTGCCGCTGGGGGTC
AGCCTCATCACAGATGGCTGTGAGTGCTGTAAGATGTGCGCTCAGCAGCTGGGGACAAC TGCA CGGAG
GCTGCCATCTGTGACCCCCACCGGGGCTCTACTGTGACTACAGCGGGGACCGCCCGAGGTACCGAATA
GGAGTGTGTCACAGGGGCCGCACACCACCATCACCATCACTAAGTGAGGCCGATAGATAA
CTGATCCAGTGTGCTGGAATTAAATTC (SEQ ID NO:3)
```

45

Dominio 2:

```
GAATTCACCATGAGGTGGTCCCTGCCCTGGACGCTGGCAGCAGTGACAGCAGCAGCCGCCAGCACCGTC
CTGGCCACCTGCAAGTACAAC TGCACTGCACGTGCATCGACGGCGCGTGGGCTGCACACCAC TGCCCTCGA
CAGCCTAAC TGCAAGTACAAC TGCACTGCACGTGCATCGACGGCGCGTGGGCTGCACACCAC TGCCCTCGA
GTGCGCCCCCGCGTCTGGTGCCCTACCCGGCGCGTGA GCACTGGCCACTGCTGTGAGCAG
TGGGTATGTGCGGCCGCACACCACCATCACCATCACTAAGTGAGGCCGATAGATAAC (SEQ
ID NO:4)
```

Dominio 3:

```
GAATTCAACCATGAGGTGGTTCCTGCCCTGGACGCTGGCAGCAGTGACAGCAGCAGCCGCAGCACCGTC
CTGGCCACTGCAGCATGGCACAGGAACGTGCATAGCCTACACAAGCCCTGGAGCCCTTGCTCCACCAGC
TGCAGCCCTGGGGTCTCCACTCGGATCTCAATGTTAACGCCAGTGCTGGCTGAGCAAGAGAGCCGC
CTCTGCACTTGCGGCCATGCGATGTGGACATCCATACACTCATTAAGGGGGCCACACCACCATCAC
CATCACCATCAACTAAGTGAGGCCGCATAGATAACTGATCCAGTGT (SEQ ID NO:5)
```

5

Dominio 4:

```
GAATTCAACCATGAGGTGGTTCCTGCCCTGGACGCTGGCAGCAGTGACAGCAGCAGCCGCAGCACCGTC
CTGGCCACTGCAGGGAAAGAAGTGTCTGGCTGTACAGCCAGAGGCATCCATGAACCTCACACTTGCG
GGCTGCATCAGCACACGCCCTATCAACCCAAGTACTGTGGAGTTTGATGGACAATAGGTGCTGCATC
CCCTACAAGTCTAAGACTATCGACGTGTCTTCCAGTGTCTGTGGCTTCTCCGCCAGGTC
CTATGGATTAAATGCCCTGCTTCTGTAACCTGAGCTGTAGGAATCCCAATGACATCTTGCTGACTTGGAA
TCCTACCCGTGACTTCTCAGAAAATTGCCAACGGGGCCACACCACCATCACCATCACCATCACTAAGTG
AGGCCGCATAGATAACTGATCCAGTGTG (SEQ ID NO:6)
```

Dominio 1.2:

10

```
GAATTCAACCATGAGGTGGTTCCTGCCCTGGACGCTGGCAGCAGTGACAGCAGCAGCCGCAGCACCGTC
CTGGCCACGGCCCTCTCCAGCCCTACGACCATGGACTTACTCCAGCTCCACTGGAGGACACCTCC
TCACGCCCCAATTCTGCAAGTGGCCATGTGAGTGCCCCTACCCCCACCCCGCTGCCGCTGGGGTC
AGCCTCATCACAGATGGCTGTGAGTGCTGTAAGATGTGCGCTCAGCAGCTTGGGGACAACGTGACGGAG
GCTGCCATCTGTGACCCCCACCGGGGCTCTACTGTGACTACAGCGGGGACCGCCCGAGGTACGCAATA
GGAGTGTGTCACAGGTGGTCGGTGTGGCTGCGTCTGGATGGGGTGCCTACACAAACGGCCAGTCC
TTCCAGCCTAACTGCAAGTACAACGTGACGTGCATCGACGGCGCGGTGGCTGCACACCACGTGCTC
CGAGTGCGCCCTGGCGCTCTGGTGGCCACCCCGGGCGTGGAGCATAACCTGGCCACTGCTGTGAG
CAGTGGGTATGTGCGGGCGACACCACCATCACCACCATCACTAAGTGAGGCCGCATAGATAAC
(SEQ ID NO:7)
```

Dominio 1.2.3:

15

```
GAATTCAACCATGAGGTGGTTCCTGCCCTGGACGCTGGCAGCAGTGACAGCAGCAGCCGCAGCACCGTC
CTGGCCACGGCCCTCTCCAGCCCTACGACCATGGACTTACTCCAGCTCCACTGGAGGACACCTCC
TCACGCCCCAATTCTGCAAGTGGCCATGTGAGTGCCCCTACCCCCACCCCGCTGCCGCTGGGGTC
AGCCTCATCACAGATGGCTGTGAGTGCTGTAAGATGTGCGCTCAGCAGCTTGGGGACAACGTGACGGAG
GCTGCCATCTGTGACCCCCACCGGGGCTCTACTGTGACTACAGCGGGGACCGCCCGAGGTACGCAATA
GGAGTGTGTCACAGGTGGTCGGTGTGGCTGCGTCTGGATGGGGTGCCTACACAAACGGCCAGTCC
TTCCAGCCTAACTGCAAGTACAACGTGACGTGCATCGACGGCGCGGTGGCTGCACACCACGTGCTC
CGAGTGCGCCCTGGCGCTCTGGTGGCCACCCCGGGCGTGGAGCATAACCTGGCCACTGCTGTGAG
CAGTGGGTATGTGAGGACGACGCCAGAGGCCACGCCACGGCAAGACGGCACCCCGTGAACACAGGAGCCTCGAT
GCTGTGGGTGAGGTGGAGGCATGGCACAGGAACGTGCATAGCCTACACAAGCCCTGGAGGCCCTTGCTCC
ACCAGCTGCCCTGGGGTCTCCACTCGGATCTCAATGTTAACGCCAGTGCTGGCTGAGCAAGAG
AGCCGCCTCTGCAACTGCGGCCATGCGATGTGGACATCCATACACTCATTAAGGCGGCCACACCAC
CATCACCATCACCACCATCACTAAGTGAGGCCGCATAGATAACTGATCCAGTGTGCTGGA (SEQ ID
NO:8)
```

Dominio 1.2.4:

GAATTCAACCATGAGGTGGTCTGCCCTGGACGCTGGCAGCAGTGACAGCAGCAGCCGCCAGCACCGTC
 CTGGCCACGGCCCTCTCCAGCCCTACGACCATGGACTTACTCCAGCTCCACTGGAGGACACCTCC
 TCACGCCCCAATTCTGCAAGTGGCATGTGAGTGCGCCATCCCCACCCCGCTGCCGCTGGGGGTC
 AGCCTCATCACAGATGGCTGTGAGTGCTGTAAGATGTGCGCTCAGCAGCTGGGGACAACGTGACGGAG
 GCTGCCATCTGTGACCCCCACCGGGGCTCTACTGTGACTACAGCGGGACCGCCCAGGTACGCAATA
 GGAGTGTGTGCACAGGTGGTCGGGTGCGTCCTGGATGGGGTGCCTACAACAAACGCCAGTCC
 TTCCAGCCTAACGTCAAGTACAACGTGACGTGCATCGACGGCGGGTGGCTGCACACCACGTGCTC
 CGAGTGCGCCCGCCCGCGTCTGGTCCCCCACCGCGCGCGTGAACGACATACCTGCCACTGCTGTGAG
 CAGTGGGTATGTCTGCAGGCAGGGAAAGAAGTGTCTGGCTGTGACTACAGCAGGGCATCCATGAACTTC
 ACACCTGGGGCTGCATCAGCACACGCTCTATCAACCCAAAGTACTGTGGAGTTGCAATGGACAATAGG
 TGCTGCATCCCCATCAAAGTCTAACGTATCGACGTGCTCCAGTGTCTGTGATGGCTTGGCTTCTCC
 CGCCAGGTCTATGGATTAATGCCGCTCTGTAACCTGAGCTGTAGGAATCCAATGACATTTGCT
 GACTTGGAAATCCTACCCCTGACTTCTCAGAAATTGCCAACGCGGCCGACACCACCATCACCACCAT
 CACTAAGTGCAGGCCCATAGATAACTGATCCAGTGTGCTGGAATTAAATCGCTGTGCGAGGGCCAGC
 TGTTGGGGTGAGTACTCCCTCTCAAAAGCGGCATGACTTCTGCGCTA (SEQ ID NO: 9)

Dominio 1.3.4:

GAATTCAACCATGAGGTGGTCTGCCCTGGACGCTGGCAGCAGTGACAGCAGCAGCCGCCAGCACCGTC
 CTGGCCACGGCCCTCTCCAGCCCTACGACCATGGACTTACTCCAGCTCCACTGGAGGACACCTCC
 TCACGCCCCAATTCTGCAAGTGGCATGTGAGTGCTGTAAGATGTGCGCTCAGCAGCTGGGGACAACGTGACGGAG
 GCTGCCATCTGTGACCCCCACCGGGGCTCTACTGTGACTACAGCGGGACCGCCCAGGTACGCAATA
 GGAGTGTGTGCATGCTGTGGGTGAGGTGGAGGCATGGCACAGGAATGCAAGCTACACAAAGCCCC
 TGGAGCCCTGCTCCACCAGCTGGCCTGGGGTCTCCACTGGATCTCAATGTTAACGCCAGTGC
 TGGCCTGAGCAAGAGAGCCGCTCTGCAACTTGCGGCCATGCGATGTGGACATCCATACACTCATTAAG
 GCAGGAAAGAAGTGTCTGGCTGTGACTACAGCAGGGCATCCATGAACTTACACTTGCCTGAGGGCTG
 AGCACACGCTCTATCAACCCAAAGTACTGTGGAGTTGCAATGGACAATAGGTGCTGCATCCCCATCAAG
 TCTAACGACTATCGACGTGCTCCAGTGTCTGTGATGGCTTGGCTTCCGCCAGGTCTATGGATT
 AATGCCCTGCTCTGTAACCTGAGCTGTAGGAATCCAATGACATTTGCTGACTTGGAAATCCTACCC
 GACTTCTCAGAAATTGCCAACGCGGCCGACACCACCATCACCACCATCACTAACGAGGGCCAGC
 AGATAAC (SEQ ID NO: 10)

5

Dominio 2.3.4:

GAATTCAACCATGAGGTGGTCTGCCCTGGACGCTGGCAGCAGTGACAGCAGCAGCCGCCAGC
 ACCGTCTGCCACTGCAGTGGCGGTGCGTCCTGGATGGGGTGCCTACAACAAACGCCAG
 TCCCTCCAGCTAACGTCAAGTACAACGTGACGTGCATCGACGGCGGGTGGCTGCACACCACGTG
 CTCCGAGTGCGCCCGCGTCTGGTCCCCCACCGCGCGCGTGAACGATACCTGCCACTGCTGT
 GAGCAGTGGGTATGTGAGGACGACGCCAAGAGGCCACGCAAGACCGCACCCGTGACACAGGAGCCTTC
 GATGCTGTGGGTGAGGTGGAGGCATGGCACAGGAATGCAAGCTACACAAAGCCCTGGAGGCCCTG
 TCCACCCAGCTGCCCTGGGGTCTCCACTGGATCTCAATGTTAACGCCAGTGTGCTGCCCTGAGCAA
 GAGAGCCGCTCTGCAACTTGCGGCCATGCGATGTGGACATCCATACACTCATTAAGGCAGGGAAAGAAG
 TGTCTGGCTGTGACTGTGGAGTTGCAATGGACAATAGGTGCTGCATCCCCATCAAGTCTAACGACTATC
 TATCAACCCAAAGTACTGTGGAGTTGCAATGGACAATAGGTGCTGCATCCCCATCAAGTCTAACGACTATC
 GACGTGTCCCTCCAGTGTCTGTGATGGCTTGGCTTCCGCCAGGTCTATGGATTAATGCCCTGAGCAA
 ATTGCCAACGCGGCCGACACCACCATCACCACCATCACTAACGAGGGCCAGATAACTGATC
 CAGTGTGTGCTGGAATTAAATCGCTGTGCGA (SEQ ID NO:11)

10

5 [0248] Se transfecaron células (HEK 293T) con las diferentes construcciones, y los medios de cultivo se recogieron después de 48 horas. Un mililitro de medio de cultivo se incubó con 20 µl de cobalto-agarosa durante 1 hora, se centrifugó y se lavó. Las proteínas adsorbidas se eluyeron mediante calentamiento del sedimento a 100°C durante 5 minutos en 20 µl de tampón de muestra de SDS-PAGE. Las muestras se sometieron a electroforesis, se electrotransfirieron sobre PVDF y se sondaron con los diferentes anticuerpos de WISP-1.

10 [0249] Los anticuerpos 11C2, 9C11 y 5D4 sólo reconocieron construcciones de WISP-1 que contenían los 19 primeros aminoácidos de la región variable localizada entre el dominio 2 y 3 (Fig. 12C; 12E; 12G). El anticuerpo de WISP-1 3D11 sólo reconoció construcciones de WISP-1 que contenían el dominio 1 (aminoácidos 24 a 117; Fig. 12D; 12F).

15 [0250] Estos resultados indican que los anticuerpos 11C2, 9C11 y 5D4 reconocen específicamente la región variable de WISP-1, mientras que el anticuerpo 3D11 reconoce específicamente el dominio 1 de WISP-1.

15 EJEMPLO 12

20 [0251] Se realizó un ensayo para identificar el epítopo reconocido por el anticuerpo de WISP-1 9C10.F5 (también denominado en el presente documento "9C10").

25 [0252] El medio de cultivo de células HEK 293T transfecadas con las diversas construcciones de delección de WISP-1 (como se describe anteriormente en el Ejemplo 11) se incubó con 1 pg de anticuerpo de WISP-1 9C10 y 20 µl de proteína A-agarosa durante 1 hora a temperatura ambiente. El inmunocomplejo se precipitó por centrifugación y se eluyó mediante calentamiento del sedimento a 100°C durante 5 minutos en 20 µl de tampón de muestra de SDS-PAGE. Las muestras se sometieron a electroforesis, se electrotransfirieron sobre PVDF y se sondaron con anticuerpo de WISP-1 11C2.

30 [0253] El anticuerpo 9C10 sólo inmunoprecipitó construcciones que contenían el dominio 1 de WISP-1 (Fig. 13). Estos resultados demuestran que el anticuerpo 9C10 reconoce específicamente el dominio 1 de WISP-1 y puede usarse para inmunoprecipitación.

30 EJEMPLO 13

35 [0254] El anticuerpo de WISP-1 9C10 (100 µl de 2 µg/ml en tampón carbonato, pH 9,6) se recubrió sobre placas Maxisorb durante la noche a 4°C. Las placas se bloquearon con 200 µl de PBS/BSA al 3% durante 1 hora. Se hizo una curva patrón de diluciones seriadas de WISP-1-Fc (100 µl en PBS/BSA al 3%) y se incubaron durante 1 hora. Despues de la incubación, las placas se lavaron con 100 µl de PBS/Tween al 0,05% y los anticuerpos de WISP-1 (100 µl de 2 µg/ml) en PBS/BSA al 3% (11C2 o 55B biotinilado) se incubaron durante 1 hora. Para 11C2 biotinilado, las placas se incubaron adicionalmente con 2 µg/ml de estreptavidina conjugada con HRP. Para 55B, las placas se lavaron y se incubaron con IgG anti-conejo de burro conjugada con HRP durante 1 hora. Al final de la incubación, los pocillos se lavaron 6 veces con 200 µl de PBS que contenía Tween-20 al 0,05%, y la señal se visualizó usando 100 µl del sustrato cromogénico de peroxidasa de rábano picante TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories). La reacción se detuvo con 100 µl de ácido fosfórico 1 M, y se midió la DO a 450 nm. La unión no específica se determinó en incubaciones en paralelo omitiendo el recubrimiento de pocillos de microtitulación. No se generó señal cuando se omitió WISP-1-Fc o un anticuerpo de WISP-1.

45 [0255] Usando el anticuerpo 9C10 para la captura y los anticuerpos 11C2 y 55B para la detección se realizó un ELISA que puede detectar concentración de WISP-1 de tan sólo 0,4 µg/ml (Fig. 14). Este ELISA puede ser útil para detectar proteína WISP-1 en fluidos biológicos tales como suero.

50 EJEMPLO 14

55 [0256] Las placas Maxisorb se recubrieron durante la noche a 4°C con 50 µl/pocillo de 10 µg/ml de heparina (Sigma). Los sitios de unión no específicos se bloquearon con 200 µl de PBS/BSA al 3% durante 1 hora. Entonces, las placas se incubaron durante 1 hora con 50 µl de 6 µg/ml de hWISP-1-Fc en PBS/BSA al 3% en presencia de diluciones seriadas de anticuerpos de WISP-1. Las placas se lavaron con PBS/Tween al 0,05% y se incubaron adicionalmente 1 hora con 50 µl de 2 µg/ml de IgG-Fc anti-humana conjugada con HRP en PBS/BSA al 3%. Las placas se lavaron y se añadieron 100 µl de sustrato HRP (TMB). El revelado de color se detuvo con 100 µl de ácido fosfórico 1 M y se midió la DO a 450 nm.

60 [0257] Los anticuerpos de WISP-1 11C2, 5D4 y 9C11 inhibieron la unión de WISP-1 a heparina con una IC_{50} de 1,9, 2,5 y 3,7 µg/ml, respectivamente (Fig. 15). El anticuerpo 3D11 redujo moderadamente la unión de WISP-1 a heparina con una inhibición máxima del 62% a la mayor concentración probada (40 µg/ml). El anticuerpo 9C10 no atenuó la unión a heparina de WISP-1, que muestra una curva de inhibición similar al control de anticuerpo irrelevante.

[0258] Estos resultados demuestran que los anticuerpos que reconocen la región variable pueden inhibir la unión de WISP-1 a heparina. Debido a que los dos anticuerpos de WISP-1 que reconocen el dominio 1 tienen poco o ningún efecto sobre la unión de WISP-1 a heparina, actualmente se cree que es menos probable que el dominio 1 participe en esta interacción.

5

EJEMPLO 15

[0259] La haptotaxis se midió usando un sistema de cámara de Boyden modificado. La parte inferior de filtros de membrana de PET con forma de 24 pocillos de 8 µm de porosidad (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey) se recubrió durante la noche a 4°C con 50 µl de proteína (50 µg/ml) en PBS. Se añadieron células de riñón de rata normales (NRK; 5 x 10⁴/0,5 ml de HGDMEM/SBF al 10%) a la cámara superior, la cámara inferior se llenó del mismo medio y las placas se incubaron a 37°C. Al día siguiente, la cámara superior se limpió con un hisopo de algodón y las células que migraron al lado inferior del inserto se tiñeron y se contaron bajo un microscopio. Los conjuntos de datos por triplicado se promediaron para cada condición. En ciertos casos, los insertos recubiertos se lavaron y se trataron durante 2 horas adicionales a temperatura ambiente.

10

15

20

25

[0260] En un ensayo en Transwell, WISP-1-Fc recubierta sobre la superficie inferior del filtro indujo la migración haptotáctica de células NRK (Fig. 16A). El recubrimiento de una proteína químérica de IgG irrelevante (TNFR-Fc) o la adición de WISP-1-Fc a la cámara inferior no promovió la migración. En presencia de WISP-1-Fc recubierta, cinco anticuerpos de WISP-1 diferentes (9C10, 11C2, 3D11, 9C11, 5D4) inhibieron notablemente la migración de células. En ausencia de WISP-1-Fc recubierto, estos anticuerpos no mostraron ningún efecto sobre la migración de células. Estos resultados demuestran que anticuerpos de WISP-1 pueden modular la migración de células en presencia de WISP-1. Bloqueando la migración de células, los anticuerpos de WISP-1 pueden desempeñar una función terapéutica importante en la prevención de la progresión del cáncer.

30

[0261] En la Fig. 16B se proporciona un resumen de las características y propiedades de los anticuerpos 3D11, 9C10, 11C2, 5D4 y 9C11 tratados en los ejemplos anteriores.

EJEMPLO 16

35

40

45

50

[0262] Ratones hembra nu/nu Swiss de nueve semanas de edad se inyectaron en la vena lateral de la cola con 100 µl de una suspensión que contenía 2,5 x 10⁵ células. Empezando en el día de la inoculación, los ratones se trataron bisemanalmente mediante inyección intraperitoneal (10 mg/kg) de anticuerpos de WISP-1 (9C11, 11C2, 5D4, 9C10, 3D11) o anticuerpo de control de isotipo. Después de 3 semanas, los pulmones se perfundieron con formalina al 4% tamponada neutra, se extirparon y se generaron secciones teñidas con H&E. Se evaluaron secciones longitudinales del pulmón izquierdo, y una sección transversal de los lóbulos craneales, mediales, caudales y accesorios del pulmón derecho. Para cada portaobjetos se contó el número de focos metastásicos y se midió el área promedio de focos metastásicos usando el software SPOT RT (Diagnostic Instruments Incorporated, Burlingame, California). El área (µm²) se determinó para al menos cinco focos metastásicos individuales en cuatro secciones de pulmón.

[0263] Despues de 3 semanas, la gravedad de las lesiones encontradas en animales tratados con el anticuerpo de WISP-1 se había atenuado enormemente en comparación con el control (Fig. 17 a, b). El número de nódulos y el área promedio de los focos metastásicos encontrados en ratones tratados con anticuerpos de WISP-1 (n=5) se redujeron en comparación con animales tratados con un anticuerpo de control (Fig. 17 c, d). Además, tras el tratamiento con el anticuerpo de WISP-1, el área pulmonar total cubierta por las lesiones se redujo el 82-97% en comparación con el animal tratado con un anticuerpo de control de isotipo (Fig. 17e). Estos resultados demuestran la eficacia *in vivo* de anticuerpos de WISP-1 en la reducción de la carga tumoral relacionada con metástasis. Aunque el mecanismo de acción de los anticuerpos de WISP-1 no se entiende completamente, se cree que su eficacia puede estar mediada por una capacidad reductora del crecimiento y/o una capacidad en la inhibición de la motilidad, invasión y siembra de células cancerosas en un sitio de tejido.

EJEMPLO 17

55

60

[0264] Se clonó WISP-1 de ratón de longitud completa (número de acceso de GenBank NM_018865) en el vector de expresión de mamífero pRK. La construcción resultante (pRK-WISP-1; 18 ug) se cotransfirió con 2 ug de plásmido pSVi-puromicina en una línea celular de adenocarcinoma mamario de ratón 4T1 (obtenida del Dr. Fred Miller, Barbara Ann Karmanos Cancer Institute, Detroit, MI) usando Fugene6 (Roche) según instrucciones del fabricante. Despues de 2 días, las células se seleccionaron en 2 µg/ml de puromicina. Despues de 2 semanas, los clones se aislaron y la expresión de WISP-1 se evaluó por inmunofluorescencia. El mismo procedimiento se usó para generar líneas celulares de control usando un vector vacío. Las líneas celulares 4T1/control y 4T1/WISP-1 resultantes se mantuvieron en medio de Iscove que contenía SBF al 10% y 3 µg/ml de puromicina.

[0265] La expresión de WISP-1 en líneas celulares 4T1/control, 4T1/WISP-1L, 4T1/WISP-1H, NRK/control,

NRK/WISP-1L y NRK/WISP-1H se midió por RT-PCR semicuantitativa (Taqman) usando cebadores y sondas que no distinguían entre gen de WISP-1 humano y de ratón.

5 [0266] WISP-1 no se expresó en líneas celulares 4T1/control. La expresión de WISP-1 en la línea celular 4T1/WISP-1H era 2 veces superior a en 4T1/WISP-1L, pero 700 veces inferior a en NRK/WISP-1H (Figura 18).

EJEMPLO 18

10 [0267] Para evaluar el efecto de WISP-1 sobre la dispersión de células 4T1 se sembraron 100.000 células 4T1/control, 4T1/WISP-1L o 4T1/WISP-1H en una placa de 6 pocillos en medio de Iscove que contenía suero bovino fetal al 10%. Cuando se sembraron a una baja densidad, las células 4T1/control proliferaron y formaron colonias muy definidas (Fig. 19). Las proliferación de células 4T1/WISP-1L formó grupos menos definidos que algunas células apartadas de las colonias de crecimiento (Fig. 19). No se observaron colonias de 4T1/WISP-1H y las células se dispersaron en un patrón aleatorio (Fig. 19). Estos resultados sugieren juntos que la expresión de WISP-1 promueve la migración de células.

EJEMPLO 19

20 [0268] También se evaluó el efecto de WISP-1 sobre la invasión de células 4T1 usando un sistema de cámara de Boyden modificado recubierto con Matrigel de filtros de membrana de PET con forma de 24 pocillos de 8 µm de porosidad (Falcon). Se añadieron células 4T1/control, 4T1/WISP-1L o 4T1/WISP-1H (100.000 células) a la cámara superior en 0,5 ml de medio de Iscove. La cámara inferior se llenó de 0,75 ml del mismo medio que contenía suero bovino fetal al 5% y las placas se incubaron durante la noche a 37°C. Al día siguiente, la cámara superior se limpió con un hisopo de algodón y las células que migraron al lado inferior del inserto se tiñeron con el kit de tinción Diff-Quik (Dade Behring Inc.) y se contaron bajo el microscopio. Los conjuntos de datos por triplicado se promediaron para cada condición. Las células 4T1/WISP-1H y 4T1/WISP-1L demostraron un aumento de 12 y 6 veces en la invasión en comparación con 4T1/control, respectivamente (Fig. 20). Estos resultados sugieren que WISP-1 promueve la invasión de células epiteliales mamarias tumorigénicas y puede desempeñar una función en la metástasis.

EJEMPLO 20

30 [0269] Se evaluaron los efectos de WISP-1 sobre la tumorigénesis de células epiteliales mamarias inyectando $1,5 \times 10^5$ células (4T1/control 1, 4T1/control 2, 4T1/WISP-1L o 4T1/WISP-1H) en la cuarta bola adiposa mamaria de ratones BALB/c hembra de 6-8 semanas de edad (6 ratones/grupo). Los volúmenes tumorales se midieron tres veces por semana. Treinta y un días después de la inyección, los ratones se sacrificaron, los tumores se extirparon y se pesaron.

40 [0270] La inoculación de células 4T1/WISP-1L (Fig. 21a; cuadrados vacíos) y células 4T1/WISP-1H (Fig. 21a; cuadrados rellenos) generó tumores de crecimiento más rápidamente en comparación con células 4T1/control 1 y 4T1/control 2 (Fig. 21a; círculos vacíos y rellenos). Después de 31 días, los tumores formados por 4T1/WISP-1L y 4T1/WISP-1H inoculados fueron 4 veces más grandes (Fig. 21a) y 3 veces más pesados (Fig. 21b) que los tumores formados por células 4T1/control. Estos resultados sugieren que WISP-1 puede aumentar la proliferación de células tumorales epiteliales mamarias.

EJEMPLO 21

45 [0271] Se midió la expresión de HAS2 y CD44 en tumores formados por las células 4T1/control, 4T1/WISP-1L y 4T1/WISP-1H inoculadas. Cuando se comparó con el tumor de células 4T1/control, la expresión de CD44 aumentó entre 5 y 23 veces en tumores de células 4T1/WISP-1 (Fig. 22). Por otra parte, la expresión de HAS2 permaneció idéntica en todos los tumores analizados. Estos resultados sugieren que WISP-1 aumenta la expresión de CD44 en ratones inoculados con células 4T1. La expresión en exceso de CD44 en estos tumores puede contribuir a la promoción de metástasis.

EJEMPLO 22

55 [0272] Se evaluaron los efectos de WISP-1 sobre metástasis de células epiteliales mamarias inoculando células 4T1 en bolas adiposas mamarias de ratones (véase el Ejemplo 20) y examinando el grado de la propagación metastásica por tomografía microcomputerizada e histología. Después de 31 días, los ratones inoculados con células 4T1/WISP-1L o 4T1/WISP-1H tenían amplias metástasis tumorales (Fig. 23b y 23d) en comparación con los ratones inyectados con 4T1/control (Fig. 23a y 23c). No se observaron diferencias significativas entre el potencial metastásico de células 4T1/WISP-1L y 4T1/WISP-1H. Los ratones inoculados con células 4T1/control tenían un promedio de 2,11 focos pulmonares con una masa promedio de 0,68 gramos, mientras que los ratones inoculados con células 4T1/WISP-1 tenían un promedio de 20,25 focos pulmonares con una masa promedio de 12,46 gramos.

Por tanto, los datos promedio de histología para el pulmón de ratones inyectados con células 4T1/WISP-1 era 0,92 en comparación con 0,11 para los ratones inyectados con células NRK/control.

[0273] Usando inmunohistoquímica también se observó que los focos metastásicos pulmonares 4T1/WISP-1 expresaron altos niveles de CD44 (Fig. 23e). En estos tumores, CD44 estaba localizado en la membrana plasmática de las células 4T1/WISP-1 (Fig. 23f). Estos resultados demuestran juntos que WISP-1 promueve el potencial metastásico de células 4T1, aumentando el número de focos metastásicos pulmonares (10 veces) y el tamaño (18 veces). Por tanto, el aumento de la expresión de CD44 se mantuvo después de que 4T1/WISP-1 hubiera metastatizado a los pulmones.

[0274] Las observaciones clínicas de ratones inoculados con células 4T1/control 1 o 4T1/WISP-1 demostraron que la expresión de WISP-1 promovió la metástasis en sitios secundarios adicionales. Dos ratones inoculados con 4T1/WISP-1H tenían una masa blanca descolorida sobre el riñón, mientras que ningún otro ratón tenía pruebas de tumores de riñón.

EJEMPLO 23

[0275] Las construcciones mutantes de longitud completa y de delección de WISP-1 humana descritas anteriormente se transfecaron en células de riñón de rata normal (NRK-49F). Después de 48 horas, el medio de cultivo se complementó con 2 µg/ml de puromicina. Después de 2 semanas, los conjuntos de células de expresión se analizaron y las líneas celulares resultantes se mantuvieron en medio Eagle modificado por Dulbecco de alto contenido de glucosa (HGDMEM) complementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) y 2 µg/ml de puromicina.

[0276] La expresión de WISP-1 en las líneas celulares NRK/control, NRK/WISP-1_1234, NRK/WISP-1_134, NRK/WISP-1_234, NRK/WISP-1_123 y NRK/WISP-1_124 se midió por RT-PCR semi-cuantitativa (Taqman). Los resultados se expresan como veces con respecto a la expresión de WISP-1 en NRK/WISP-1_1234 (Figura 24A). La expresión de WISP-1 en NRK/WISP-1_134 y NRK/WISP-1_234 es 0,035 y 0,09 veces, respectivamente, en comparación con NRK/WISP-1_1234. NRK/WISP-1_123 se expresa 16,1 veces y NRK/WISP-1_124 7,6 veces en comparación con NRK/WISP-1_1234.

[0277] La contribución de dominios particulares a la tumorigénesis promovida por WISP-1 se evaluó inyectando 5×10^6 células (células PTRK/control, NRK/WISP-1_1234, NRK/WISP-1_123, NRK/WISP-1_124, NRK/WISP-1_134, NRK/WISP-1_234) subcutáneamente en ratones sin pelo hembra de 6-8 semanas de edad (10 ratones/grupo). Los volúmenes tumorales se midieron semanalmente. Después de 35 días, los ratones se sacrificaron, los tumores se extirparon y se analizaron histológicamente.

[0278] La inoculación de células NRK/WISP-1_1234 (Figura 24B; triángulos rellenos), NRK/WISP-1_134 (Figura 24B; círculos rellenos) y NRK/WISP-1_234 (Figura 24B; cuadrados rellenos) generó tumores. Sin embargo, la inoculación de NRK/WISP-1_123 (Figura 24B; cuadrados vacíos), NRK/WISP-1_124 (Figura 24B; círculos vacíos) y NRK/control (Figura 24B; triángulos vacíos) no generó tumores. Después de 35 días, los tumores formados por células NRK/WISP-1_234 fueron de tamaño comparable a los tumores formados por células NRK/WISP-1_1234. Sin embargo, los tumores formados por células NRK/WISP-1_134 fueron 2,5 veces más grandes que los tumores formados por células NRK/WISP-1_1234. Estos resultados sugieren que los dominios 1 y 2 no son requeridos para la tumorigénesis de NRK promovida por WISP-1, pero que los dominios 3 y 4 se requieren para la tumorigénesis de NRK promovida por WISP-1. Se cree que los antagonistas de WISP-1 de la invención pueden unirse preferentemente a y/o bloquear los dominios 3 y/o 4 de WISP-1.

[0279] Además, los resultados sugieren que la delección del dominio 2 de WISP-1 puede aumentar su potencial tumorigénico.

[0280] El análisis histológico de los tumores extirpados (Figura 25) reveló que las células neoplásicas de tumores NRK/WISP-1_234 fueron fenotípicamente similares a las células neoplásicas de tumores NRK/WISP-1_1234. En estos tumores, las células parecieron fibroblásticas, diferenciadas y fusiformes. Sin embargo, las células neoplásicas de tumores NRK/WISP-1_134 fueron fenotípicamente diferentes y parecieron menos diferenciadas, frecuentemente multinucleadas, y tuvieron una rápida tasa mitótica como se demuestra por la presencia de múltiples figuras mitóticas (flechas). Además, las células neoplásicas invadieron varios vasos sanguíneos adyacentes a tumores NRK/WISP-1_134 (Figura 26). Estos resultados indican que la expresión de WISP-1_134 puede conferir tumorigenidad a células NRK promoviendo su crecimiento *in vivo* y potencial invasivo. Además, la expresión de esta construcción induce una transformación fenotípica característica de células neoplásicas agresivas.

EJEMPLO 24

[0281] La contribución de los dominios de WISP-1 particulares a la invasión de células 4T1 promovida se evaluó usando un sistema de cámara de Boyden modificado recubierto con Matrigel de filtros de membrana de PET

en forma de 24 pocillos de 8 pm de porosidad (BD Biosciences). Células HEK 293 (20×10^6) que expresaban establemente las construcciones de WISP-1 previamente mencionadas (WISP-1_1234, WISP-1_134, WISP-1_123, WISP-1_12, WISP-1_23, WISP-1_3, WISP-1_1 y WISP-1_4) se sembraron en la cámara inferior en 0,75 ml de medio 50:50 (1:1 mezcla de DME y medio F-12 de Ham) que contenía 5% de suero bovino fetal y las placas se mantuvieron durante la noche a 37°C. Al día siguiente se añadieron células 4T1 (100.000 células) a la cámara superior en 0,5 ml de medio 50:50 sin suero y las placas se incubaron durante la noche a 37°C. Al día siguiente, la cámara superior se limpió con un hisopo de algodón y las células que migraron a la parte inferior del inserto se tiñeron con el kit de tinción Diff-Quik (Dade Behring Inc.) y se contaron bajo el microscopio. Los conjuntos por triplicado de los datos se promediaron para cada condición y los resultados se expresaron como la invasión en veces en comparación con un control en el que células HEK 293 transfectadas con un vector vacío se sembraron en la cámara inferior. Las células 4T1 demostraron un aumento de 4 veces en la invasión cuando las células HEK 293 que expresaban las construcciones WISP-1_1234, WISP-1_134 o WISP-1_123 se sembraron en la cámara inferior (Fig. 27). Las células HEK 293 que expresaban la construcción WISP-1_12 aumentaron la invasión de células 4T1 sólo 2,5 veces. El aumento en la invasión de células 4T1 fue mínimo cuando las células HEK 293 que expresaban WISP-1_23, WISP-1_3, WISP-1_1 o WISP-1_4 se sembraron en la cámara inferior. Estos resultados sugieren que el dominio 1 se requiere para la invasión de células 4T1 promovida por WISP-1. Además, los datos muestran que el dominio 1 de WISP-1 solo es probablemente insuficiente para promover la invasión de células 4T1.

EJEMPLO 25

[0282] Se realizó un ensayo para evaluar la actividad antagonista del dominio 1 de WISP-1 sobre la invasión de células 4T1 promovida por WISP-1. El dominio 1 de WISP-1 se clonó en un vector de expresión inmediatamente en la dirección 5' de la secuencia de la región Fc de IgG₁ humana. La proteína de fusión recombinante resultante (WISP-1-dominio-1-Fc) se sintetizó en un sistema de expresión de mamífero usando células de ovario de hámster chino (CHO) y se purificó a homogeneidad a partir del medio acondicionado por cromatografía de afinidad sobre proteína A-Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech). El dominio 1 de WISP-1 también se expresó con una marca de hexa-histidina del extremo amino (WISP-1-dominio-1-His) en un sistema de expresión de CHO y se purificó a homogeneidad a partir del sobrenadante de cultivo por cromatografía de afinidad sobre una columna de agarosa Ni²⁺-NTA (Qiagen). Las fracciones que contenían WISP-1-dominio-1-His eluída se reunieron luego y se dializaron.

[0283] El efecto antagonista del dominio 1 de WISP-1 purificado soluble sobre la invasión de células 4T1 promovida por WISP-1 se evaluó usando un sistema de cámara de Boyden modificado recubierto con Matrigel de filtros de membrana de PET en forma de 24 pocillos de 8 μm de porosidad (BD Biosciences). Células 4T1/control o 4T1/WISP-1 (100.000 células) se añadieron a la cámara superior en 0,5 ml de medio Iscove. La cámara inferior se llenó con 0,75 ml del mismo medio que contenía 5% de suero bovino fetal. Se añadieron diversas concentraciones de WISP-1-dominio-1-Fc o WISP-1-dominio-1-His a las cámaras superior e inferior y las placas se incubaron durante la noche a 37°C. Al día siguiente, la cámara superior se limpió con un hisopo de algodón y las células que migraron a la parte inferior del inserto se tiñeron con el kit de tinción Diff-Quik (Dade Behring Inc.) y se contaron bajo el microscopio. Los conjuntos por triplicado de los datos se promediaron para cada condición. Los resultados se expresan como invasión relativa en veces en comparación con células 4T1/control. WISP-1-dominio-1-His y WISP-1-dominio-1-Fc demostraron una actividad antagonista dependiente de la dosis hacia la invasión de 4T1 promovida por WISP-1 (Figura 28). Tanto WISP-1-dominio-1-His como WISP-1-dominio-1-Fc mostraron una IC_{50} aparente de 0,01 μg/ml. Estos resultados sugieren que el dominio 1 de WISP-1 purificado antagoniza la invasión de células promovida por WISP-1.

EJEMPLO 26

[0284] Se realizó un estudio en animales para evaluar la expresión de WISP-1 en el modelo de xenoinjerto de HPAC de adenocarcinomas pancreáticos humanos. 5×10^6 células de adenocarcinoma pancreático humano (línea celular HPAC, nº cat. CRL-2119; ATCC, Manassas, VA, EE.UU.) se inyectaron subcutáneamente en ratones sin pelo hembra de 6-8 semanas de edad. Despues de 21 días, los ratones se sacrificaron, los tumores se extirparon y la expresión de WISP-1 se analizó por hibridación *in situ* usando una sonda específica para WISP-1 humana y una sonda específica para WISP-1 de ratón (Figura 29). Los resultados demuestran una fuerte expresión de WISP-1 de ratón en áreas correspondientes al estroma del tumor. Por otra parte, no se encontró expresión de WISP-1 humana en los tumores extirpados. Además, los tumores revelaron una tinción inmunohistoquímica fuerte con α-actina de músculo liso y débil con vimentina sobre el estroma tumoral. Estos resultados indican que la inoculación de células HPAC en ratones sin pelo induce el reclutamiento de un estroma miofibroblástico de ratón en el que se expresa WISP-1.

EJEMPLO 27

[0285] Se realizó un estudio en animales para evaluar la eficacia *in vivo* del dominio 1 de WISP-1 en retardar el crecimiento tumoral. Las construcciones WISP-1_1, WISP-1_12 humanas clonadas en un vector de expresión

(pIRES puro2; Clontech Laboratories, Palo Alto, CA) se transfecaron en la línea celular de adenocarcinoma pancreático humano HPAC. Después de 48 horas, el medio de cultivo se complementó con 2 µg/ml de puromicina. Despues de 2 semanas se analizaron los conjuntos de las células expresadas y las líneas celulares resultantes se mantuvieron en medio 50:50 (mezcla 1:1 de DME y medio F-12 de Ham) complementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) y 2 µg/ml de puromicina.

[0286] La eficacia *in vivo* del dominio 1 de WISP-1 en retardar el crecimiento tumoral se evaluó inyectando 5 x 10⁶ células (células HPAC/WISP-1_12, HPAC/WISP-1_1) subcutáneamente en ratones sin pelo hembra de 6-8 semanas de edad (10 ratones/grupo). Los volúmenes tumorales se midieron dos veces semanalmente hasta el día 25. Los resultados demuestran que la expresión de WISP-1_1 o WISP-1_12 en células HPAC retarda su crecimiento *in vivo*. El volumen tumoral de células HPAC/WISP-1_12 y HPAC/WISP-1_1 fue el 12% y el 54% más pequeño, respectivamente, en comparación con tumores de células de control HPAC (Figura 30). Estos resultados indican que el dominio 1 de WISP-1 y el dominio 12 de WISP-1 expresados por células HPAC retardan su crecimiento tumoral posiblemente antagonizando las actividades promotoras de tumor de WISP-1 de ratón.

EJEMPLO 28

[0287] Se realizaron estudios de hibridación *in situ* para evaluar la expresión de WISP-1 en adenocarcinomas pancreáticos humanos primarios. Usando una micromatriz de tumor (TMA) se mostró que el 68% (125/184) de los núcleos de muestras fueron positivos para la expresión de WISP-1. Además, en estas muestras, la expresión de WISP-1 se restringió al compartimento estromal (Figura 31). Estos resultados indican una alta incidencia de la expresión de WISP-1 en el compartimento estromal de tumores pancreáticos primarios humanos.

EJEMPLO 29

[0288] Se realizó tinción inmunohistoquímica para evaluar la expresión de WISP-1 en adenocarcinomas de colon primarios. Un panel de 15 muestras de adenocarcinomas humanos primarios se tiñó para WISP-1 usando un anticuerpo de cabra polyclonal específico para WISP-1 (R&D Systems; nº de cat. AF1627). WISP-1 se detectó en el 100% (15/15) de las muestras analizadas. En todos los casos, WISP-1 se localizó en el compartimento estromal alrededor de los tumores (Figura 32). Estos resultados indican que WISP-1 está frecuente en el compartimento estromal de adenocarcinomas de colon humanos.

Construcciones de WISP-1

35 [0289]

Dominio 2.3:

```

GAATTCACCATGAGGTGGTTCCCTGCCCTGGACGCTGGCAGCAGTGACAGCAGCAGCCGCAGCACCGTC
CTGGCCACTGCAGTGGTGGTGGCTGCGTCTGGATGGGGTGCCTACAACAAACGGCCAGTCCTTC
CAGCTTAACGTCAAGTACAACGTGACGTGACGGCGCGTGGCTGCACACCAGTGTGCCTCCGA
GTGCGCCCCCGGTCTCTGGTGCCCCACCCGGCGCGTGGAGCATACCTGGCCACTGCTGTGAGCAG
TGGGTATGTGAGGACGACGCCAAGAGGCCACGCAAGACCGCACCCGTGACACAGGAGCCTTCGATGCT
GTGGGTGAGGTGGAGGCATGGCACAGGAACACTGCATAGCCTACACAAGCCCCTGGAGCCCTGCTCCACC
AGCTGCGGCCCTGGGGTCTCCACTCGGATCTCAAATGTTAACGCCAGTGCTGGCCTGAGCAAGAGAGC
CGCCTCTGCAACTTGGCCATGGATGTGGACATCCATACACTCATTAAGGCGGCCACACCAACCAT
CACCATCACCATCACTAAGTGAGGCCGATAGATAACTGATCCAGTGTGCTGGAATTAAATCGCTGTCT
40 GCAG (SEQ ID NO:21)

```

Dominio 1-IgG:

CCTCGGTTCTATCGATTGAATTCCACCATGAGGTGGTCTGCCCTGGACGCTGGCAGCAGTG
 ACAGCAGCAGCCGCCAGCACCGTCTGGCCACGGCCCTCTCCAGCCCCATCGACCAGTGGACTTTACT
 CCAGCTCCACTGGAGGACACCTCCTCACGCCCAATTCTGCAAGTGGCATGTGAGTGCCCACATCC
 CCAACCCCGCTGCCGCTGGGGTCAGCCTCATCACAGATGGCTGTGAGTGCTTAAGATGTGGCTCAG
 CAGCTTGGGGACAACGCACGGAGGCTGCCATCTGTGACCCCCACCGGGGCTCTACTGTGACTACAGC
 GGGGACCGCCCGAGGTACGCAATAGGAGTGTGTCACAGGTGGTCGGTGTGGGGTCACCGACAAA
 CACACATGCCAACCGTCCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCAAAA
 CCCAAGGACACCCATGATCTCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGACGTGAGCCACGAA
 GACCCCTGAGGTCAAGTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAACAGACAAAGCCCG
 GAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAAT
 GGCAAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCAAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA
 GCCAAAGGGCAGCCCCAGAACACAGGTGTACCCCTGCCCAATCCGGAAAGAGATGACCAAGAAC
 CAGGTCAAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTCTATCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCAAT
 GGGCAGCCCCAGAACAAACTACAAGACCACGCCCTCCGTGTGGACTCCGACGGCTCTTCTCTAC
 AGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAACGTCTCTCATGCTCCGTATGCGATGAG
 GCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCGTCTCCGGTAAATGAGTGCACGGCCCTAG
 AGTCGACCTGCAGAAGCTTGGCCGCCATGGCC (SEQ ID NO:22)

Depósito de material

- 5 [0290] Los siguientes materiales han sido depositados en la Colección americana de cultivos tipo, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, EE.UU. (ATCC):

Material	Nº de dep. de ATCC	Fecha de depósito
3D11.D7	PTA-4624	4 de septiembre de 2002
11C2.C10	PTA-4628	4 de septiembre de 2002
9C10.F5	PTA-4626	4 de septiembre de 2002
5D4.F6	PTA-4625	4 de septiembre de 2002
9C11.C7	PTA-4627	4 de septiembre de 2002

- 10 [0291] Este depósito se hizo bajo las provisiones del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines del procedimiento de patente y las reglamentaciones en virtud del mismo (Tratado de Budapest). Éste asegura el mantenimiento de un cultivo viable del depósito durante 30 años a partir de la fecha de depósito. El depósito se pondrá a disposición por la ATCC bajo los términos del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento, y sujeto a un acuerdo entre Genentech, Inc. y ATCC, que asegura la disponibilidad permanente y de libre acceso de la progenie del cultivo del depósito al público tras la concesión de la patente de EE.UU. pertinente o tras la apertura a consulta por el público de cualquier solicitud de patente de EE.UU. o extranjera, sea cual sea la que venga primero, y asegura la disponibilidad de la progenie a una determinada por el Comisionado de EE.UU. de patentes y marcas que tienen derecho al mismo según la sección 122 del título 35 del USC y las reglas del Comisionado con arreglo al mismo (incluyendo el artículo 37 del CFR nº 1.14, con particular referencia a 886 OG 638).

- 20 [0292] El cessionario de la presente solicitud está de acuerdo que si un cultivo de los materiales en depósito muere o se pierde o se destruye cuando se cultiva bajo condiciones adecuadas, los materiales serán inmediatamente sustituidos tras la notificación por otro igual. La disponibilidad del material depositado no debe interpretarse como una licencia para poner en práctica la invención en contravención de los derechos concedidos bajo la autoridad de cualquier gobierno según sus leyes de patentes.

- 30 [0293] La descripción anteriormente descrita se considera suficiente para permitir que un experto en la materia ponga en práctica la invención. La presente invención no va a limitarse en alcance por el ejemplo presentado en el presente documento. De hecho, diversas modificaciones de la invención, además de aquellas mostradas y descritas en el presente documento, serán evidentes para aquellos expertos en la materia a partir de la anterior descripción y se encuentran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

ES 2 388 993 T3

Lista de secuencias

[0294]

5 <110> GENENTECH, INC.
DESNOYERS, LUC
FILVAROFF, ELLEN

10 <120> Procedimientos y composiciones para modular y detectar actividad de WISP
10 <130> P1918R1P1

15 <150> US 11/105.876

15 <151> 14/04/2005

20 <160> 22

20 <210> 1
<211> 367
<212> PRT
<213> Homo sapiens

25 <400> 1

Met Arg Trp Phe Leu Pro Trp Thr Leu Ala Ala Val Thr Ala Ala
1 5 10 15

Ala Ala Ser Thr Val Leu Ala Thr Ala Leu Ser Pro Ala Pro Thr
20 25 30

Thr Met Asp Phe Thr Pro Ala Pro Leu Glu Asp Thr Ser Ser Arg
35 40 45

Pro Gln Phe Cys Lys Trp Pro Cys Glu Cys Pro Pro Ser Pro Pro
50 55 60

Arg Cys Pro Leu Gly Val Ser Leu Ile Thr Asp Gly Cys Glu Cys
65 70 75

Cys Lys Met Cys Ala Gln Gln Leu Gly Asp Asn Cys Thr Glu Ala
80 85 90

Ala Ile Cys Asp Pro His Arg Gly Leu Tyr Cys Asp Tyr Ser Gly
95 100 105

Asp Arg Pro Arg Tyr Ala Ile Gly Val Cys Ala Gln Val Val Gly
110 115 120

Val Gly Cys Val Leu Asp Gly Val Arg Tyr Asn Asn Gly Gln Ser
125 130 135

Phe Gln Pro Asn Cys Lys Tyr Asn Cys Thr Cys Ile Asp Gly Ala
140 145 150

Val Gly Cys Thr Pro Leu Cys Leu Arg Val Arg Pro Pro Arg Leu
155 160 165

Trp Cys Pro His Pro Arg Arg Val Ser Ile Pro Gly His Cys Cys
170 175 180

Glu Gln Trp Val Cys Glu Asp Asp Ala Lys Arg Pro Arg Lys Thr
185 190 195

Ala Pro Arg Asp Thr Gly Ala Phe Asp Ala Val Gly Glu Val Glu
200 205 210

Ala Trp His Arg Asn Cys Ile Ala Tyr Thr Ser Pro Trp Ser Pro
215 220 225

ES 2 388 993 T3

Cys Ser Thr Ser Cys Gly Leu Gly Val Ser Thr Arg Ile Ser Asn
230 235 240
Val Asn Ala Gln Cys Trp Pro Glu Gln Glu Ser Arg Leu Cys Asn
245 250 255
Leu Arg Pro Cys Asp Val Asp Ile His Thr Leu Ile Lys Ala Gly
260 265 270
Lys Lys Cys Leu Ala Val Tyr Gln Pro Glu Ala Ser Met Asn Phe
275 280 285
Thr Leu Ala Gly Cys Ile Ser Thr Arg Ser Tyr Gln Pro Lys Tyr
290 295 300
Cys Gly Val Cys Met Asp Asn Arg Cys Cys Ile Pro Tyr Lys Ser
305 310 315
Lys Thr Ile Asp Val Ser Phe Gln Cys Pro Asp Gly Leu Gly Phe
320 325 330
Ser Arg Gln Val Leu Trp Ile Asn Ala Cys Phe Cys Asn Leu Ser
335 340 345
Cys Arg Asn Pro Asn Asp Ile Phe Ala Asp Leu Glu Ser Tyr Pro
350 355 360
Asp Phe Ser Glu Ile Ala Asn
365

<210> 2

<211> 2830

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

cccacgcgtc cgctgggccc agctcccccg agaggtggtc ggatcctctg 50
ggctgctcggtcgtgcgttgccactgac gtccaggcat gaggtggttc 100
ctgcccctggacgcttggcagc agtgacagaca gcagccgcca gcaccgtcct 150
ggccacggcc ctctctccag cccctacgac catggacttt actccagctc 200
caactggagga caccttctca cgcccccataat tctgcaagtgc gccatgttag 250
tgccccccat cccccaccccg ctgccccgtgggttcagcc tcatacacaga 300
tggctgttag tgctgttaaga tgtgcgtca gcagcttggg gacaactgca 350
cgagggtgtc catctgtgac ccccacccggg gcctctactg tgactacagc 400
ggggaccggcc cgaggtacgc aataggagtgc tgcacagg tggtcgggtgt 450
gggctgcgtc ctggatgggg tgcgtcacaa caacggccag tccttccagc 500
ctaactgcaa gtacaactgc acgtgcacatgc acggcgccgt gggctgcaca 550
ccactgtgtcc tccgagtgcgtcccccgtgtccctgtgtcccccacccgt 600
gcgcgtgagc atacctggcc actgctgtga gcagtgggtatgtgaggacg 650
acgccaagag gccacgcag accgcacccgtgtgcacacagg agccttcgtat 700
gctgtgggtg aggtggaggc atggcacacagg aactgcatacg cctacacaag 750
ccccctggagc cttgttccca ccagctgcgg cctgggggtc tccactcgga 800

tctccaatgt taacgcccag tgctggcctg agcaagagag ccgcctctgc 850
 aacttgcggc catgcgatgt ggacatccat acactcatta aggcaggaa 900
 gaagtgtctg gctgtgtacc agccagaggc atccatgaac ttcacacttg 950
 cgggctgcat cagcacacgc tccttatcaac ccaagtactg tggagttgc 1000
 atggacaata ggtgctgcat cccctacaag tctaagacta tcgacgtgtc 1050
 cttccagtgt cctgatgggc ttggcttctc ccgccaggtc ctatggatta 1100
 atgcctgctt ctgtaacctg agctgttagga atcccaatga catctttgct 1150
 gacttggaat cctaccctga cttctcagaa attgccaact aggcaggcac 1200
 aaatcttggg tcttggggac taacccaatg cctgtgaagc agtcagccct 1250
 tatggccaat aactttcac caatgagcct tagttaccct gatctggacc 1300
 cttggcctcc atttctgtct ctaaccattc aaatgacgccc tgatgggtgc 1350
 gctcaggcccc atgctatgag ttttccctt gatatcattc agcatctact 1400
 ctaaagaaaa atgcctgtct ctagctgttc tggactacac ccaagcctga 1450
 tccagccttt ccaagtcact agaagtccctg ctggatcttg cctaaatccc 1500
 aagaaaatgga atcaggtaga ctttaatat cactaatttc ttcttttagat 1550
 gccaaaccac aagactcttt gggtccattc agatgaatag atggaatttg 1600
 gaacaataga ataatctatt atttggagcc tgccaagagg tactgtaatg 1650
 ggtaattctg acgtcagcgc accaaaaacta tcctgattcc aaatatgtat 1700
 gcacctcaag gtcataaac atttgcctt gtagttgaat agttgcttaa 1750
 tttgatttt taatggaaag ttgtatccat taacctggc attgttgagg 1800
 ttaagttct cttcaccctt acactgtgaa gggtacagat taggtttgtc 1850
 ccagtcagaa ataaaatttg ataaacattc ctgttgatgg gaaaagcccc 1900
 cagttataac tccagagaca gggaaaggc agcccatattc agaaggacca 1950
 attgactctc acactgaatc agctgctgac tggcagggct ttgggcagtt 2000
 ggccaggctc ttcccttgaat cttctccctt gtccctgttg ggttcatagg 2050
 aattggtaag gcctctggac tggcctgtct ggcccttgag agtggtgccc 2100
 tggAACACTC ctctactctt acagagcctt gagagaccca gctgcagacc 2150
 atGCCAGACC cactgaaatg accaagacag gttcaggtag gggtgtgggt 2200
 caaaccaaga agtgggtgcc cttggtagca gcctgggggtg acctcttag 2250
 ctggaggctg tgggactcca gggccccccg tggcaggac acatctattg 2300
 cagagactca tttcacagcc tttcggtctg ctgaccataat ggccagtttt 2350
 ctggtaggaa gatggaggtt taccagttgt ttagaaacag aaatagactt 2400
 aataaaggtt taaagctgaa gaggttgaag ctaaaaggaa aaggttttg 2450
 ttaatgaata tcaggctattt atttattgtt ttaggaaaat ataatattt 2500

ctgttagaat tcttttattt agggcctttt ctgtgccaga cattgctctc 2550
 agtgcttgc atgtattagc tcactgaatc ttcacgacaa tggtgagaag 2600
 ttcccattat tatttctgtt cttacaaatg tgaaacggaa gctcatagag 2650
 gtgagaaaaac tcaaccagag tcacccagtt ggtgactggg aaagtttagga 2700
 ttcagatcga aattggactg tctttataac ccataatttc cccctgtttt 2750
 tagagcttcc aaatgtgtca gaataggaaa acattgcaat aaatggcttg 2800
 attttttaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2830

5 <210> 3
 <211> 440
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 3

gaattcacca tgaggtggtt cctgcccggc acgctggcag cagtgacagc 50
 agcagccgcc agcaccgtcc tggccacggc cctctctcca gcccctacga 100
 ccatggactt tactccagct ccactggagg acaccccttc acgcccccaa 150
 ttctgcaagt ggccatgtga gtgcccggca tccccacccc gctgcccgt 200
 ggggtcagc ctcatcacag atggctgtga gtgctgttaag atgtgcgctc 250
 agcagcttgg ggacaactgc acggaggctg ccatctgtga ccccccacgg 300
 ggcctctact gtgactacag cggggaccgc ccgaggtacg caataggagt 350
 gtgtgcacag gccccccgac accaccatca ccatcaccat cactaagtga 400
 ggcgcatacg ataactgatc cagtgtgtc gaattaattc 440

10 <210> 4
 <211> 340
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 4

gaattcacca tgaggtggtt cctgcccggc acgctggcag cagtgacagc 50
 agcagccgcc agcaccgtcc tggccactgc agtggctcggt gtgggctgcg 100
 tcctggatgg ggtgcgctac aacaacggcc agtccttcca gcctaactgc 150
 aagtacaact gcacgtgcat cgacggcgcg gtgggctgca caccactgtg 200
 cctccagtg cgccccccgc gtctctggc ccccccacccg cggcgcgtga 250
 gcataacctgg ccactgctgt gagcagtggg tatgtgcggc cgcacaccac 300
 catcaccatc accatacta agtgaggccg catagataac 340

15 <210> 5
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 5

gaattcacca tgaggtggtt cctgcccggc acgctggcag cagtgacagc 50
 agcagccgcc agcaccgtcc tggccactgc agcatggcac aggaactgca 100

tagcctacac aagccccctgg agcccttgct ccaccagctg cggcctgggg 150
 gtctccactc gatatctccaa tgtaaacgcc cagtgcgtgc ctgagcaaga 200
 gagccgcctc tgcaacttgc ggccatgcga tgtggacatc catacaactca 250
 ttaaggcggc cgcacaccac catcaccatc accatcacta agtgaggccg 300
 catagataac tgatccagtg t 321

5 <210> 6
 <211> 442
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 6

gaattcacca tgaggtggtt cctgcccctgg acgctggcag cagtgacagc 50
 agcagccgccc agcaccgtcc tggccactgc aggaaagaag tgtctggctg 100
 tgtaccagcc agaggcatcc atgaacttca cacttgcggg ctgcatcagc 150
 acacgctcct atcaacccaa gtactgtgga gtttgcattgg acaataggtg 200
 ctgcattcccc tacaagtcta agactatcga cgtgtcccttc cagtgtccctg 250
 atgggcttgg cttctcccgcc caggcccttat ggattaatgc ctgcttctgt 300
 aacctgagct gtaggaatcc caatgacatc tttgctgact tggaatccctaa 350
 ccctgacttc tcagaaattt ccaacgcggc cgcacaccac catcaccatc 400
 accatcacta agtgaggccg catagataac tgatccagtg tg 442

10 <210> 7
 <211> 619
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 7

gaattcacca tgaggtggtt cctgcccctgg acgctggcag cagtgacagc 50
 agcagccgccc agcaccgtcc tggccacggc cctctctcca gcccctacga 100
 ccatggactt tactccagct ccactggagg acaccccttc acgcccccaa 150
 ttctgcaagt ggccatgtga gtgcccggca tccccccaccc gctgcccgt 200
 gggggtcagc ctcatcacag atggctgtga gtgctgtaaatgtgcgtc 250
 agcagcttgg ggacaactgc acggaggctg ccatctgtga cccccaccgg 300
 ggccctctact gtgactacag cggggaccgc ccgaggatgc caataggagt 350
 gtgtgcacag gtggctgggt tggtgcgtc cctggatggg gtgcgtaca 400
 acaacggcca gtccttccag cctaactgca agtacaactg cacgtgcac 450
 gagggcgcgg tgggctgcac accactgtgc ctccgagtgc gccccccgcg 500
 tctctgggtc cccccccgc ggcgcgtgag catacctggc cactgctgtg 550
 agcagtgggt atgtgcggcc gcacaccacc atcaccatca ccatcactaa 600
 gtgaggccgc atagataac 619

20 <210> 8
 <211> 885
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

25

ES 2 388 993 T3

<400> 8

gaattcacca tgaggtggtt cctgcccctgg acgctggcag cagtgacacgc 50
agcagccgcc agcaccgtcc tggccacggc cctctctcca gcccctacga 100
ccatggactt tactccagct ccactggagg acaccccttc acgcccccaa 150
ttctgcaagt ggccatgtga gtgcccggca tccccacccc gctgcccgt 200
gggggtcagc ctcatcacag atggctgtga gtgctgttaag atgtgcgctc 250
agcagcttgg ggacaactgc acggaggctg ccacatgtga ccccccacccgg 300
ggcctctact gtgactacag cggggaccgc ccgaggtacg caataggagt 350
gtgtgcacag gtggtcggtg tgggctgcgt cctggatggg gtgcgttaca 400
acaacggcca gtccttccag cctaactgca agtacaactg cacgtgcac 450
gacggcgccgg tgggctgcac accactgtgc ctccgagtgc gccccccgcg 500
tctctggtgtc cccccacccgc ggccgtgtgag catacctggc cactgtgtg 550
agcagtgggt atgtgaggac gacgccaaga ggccacgca gaccgcaccc 600
cgtgacacag gagccttcga tgctgtgggt gaggtggagg catggcacag 650
gaactgcata gcctacacaa gcccctggag cccttgcgtcc accagctgcg 700
gcctgggggt ctccactcgg atctccaatg ttaacgccc aatggctggct 750
gagcaagaga gcccgcctcg caactgtcgg ccacatgcgtg tggacatcca 800
tacactcatt aaggcggcccg cacaccacca tcaccatcac catcaactaag 850
tgaggccgca tagataactg atccagtgtg ctgga 885

5 <210> 9
<211> 1014
<212> ADN
<213> Homo sapiens

10 <400> 9

gaattcacca tgaggtggtt cctgcccctgg acgctggcag cagtgacacgc 50
agcagccgcc agcaccgtcc tggccacggc cctctctcca gcccctacga 100
ccatggactt tactccagct ccactggagg acaccccttc acgcccccaa 150
ttctgcaagt ggccatgtga gtgcccggca tccccacccc gctgcccgt 200
gggggtcagc ctcatcacag atggctgtga gtgctgttaag atgtgcgctc 250
agcagcttgg ggacaactgc acggaggctg ccacatgtga ccccccacccgg 300
ggcctctact gtgactacag cggggaccgc ccgaggtacg caataggagt 350
gtgtgcacag gtggtcggtg tgggctgcgt cctggatggg gtgcgttaca 400
acaacggcca gtccttccag cctaactgca agtacaactg cacgtgcac 450
gacggcgccgg tgggctgcac accactgtgc ctccgagtgc gccccccgcg 500
tctctggtgtc cccccacccgc ggccgtgtgag catacctggc cactgtgtg 550

agcagtgggt atgtctgcag gcagggaaaga agtgtctggc tgtgtaccag 600
 ccagaggcat ccatgaacctt cacacttgcg ggctgcataa gcacacgctc 650
 ctatcaaccc aagtactgtg gagtttgcattt ggacaatagg tgctgcatacc 700
 cctacaagtc taagactatc gacgtgtcct tccagtgtcc ttagtggctt 750
 ggcttctccc gccaggctt atggattaat gcctgcattt gtaacctgag 800
 ctgttaggaat cccaatgaca tctttgcata cttggaaatcc taccctgact 850
 tctcagaaat tgccaacgcg gcccacacc accatcacca tcaccatcac 900
 taagtgaggc cgcatagata actgatccag tgtgctggaa ttaattcgct 950
 gtctgcgagg gccagctgtt ggggtgagta ctccctctca aaagcgggca 1000
 tgacttctgc gcta 1014

5 <210> 10
 <211> 904
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 10

gaattcacca tgaggtgggtt cctgcctgg acgctggcag cagtacacgc 50
 agcagccgcc agcaccgtcc tggccacggc cctctctcca gcccctacga 100
 ccatggactt tactccagct ccactggagg acaccccttc acgcccccaa 150
 ttctgcaagt ggccatgtga gtgcccggca tccccacccc gctgcccgt 200
 ggggtcagc ctcatacacag atggctgtga gtgtgttaag atgtgcgcctc 250
 agcagcttgg ggacaactgc acggaggctg ccatctgtga ccccccacccgg 300
 ggcctctact gtgactacag cggggaccgc ccgaggtacg caataggagt 350
 gtgtgcgcgt gctgtgggtg aggtggaggc atggcacagg aactgcata 400
 cctacacaag cccctggagc cttgttccca ccacgtgcgg cctgggggtc 450
 tccactcggc tctccaatgt taacgcccag tgctggccctg agcaagagag 500
 ccgcctctgc aacttgcggc catgcgtatgt ggacatccat acactcatta 550
 aggcaaggaa gaagtgtctg gctgtgtacc agccagaggc atccatgaac 600
 ttcacacttg cgggctgcgt cagcacacgc tccttatcaac ccaagtactg 650
 tggagtttgc atggacaata ggtgtgcattt cccctacaag tctaagacta 700
 tcgacgtgtc cttccagttt cctgtatgggc ttggcttctc ccggccaggtc 750
 ctatggatta atgcctgcctt ctgttaacctg agctgttagga atcccaatga 800
 catctttgtc gacttggaaat cctaccctga cttctcagaa attgccaacgc 850
 cggccgcaca ccaccatcac catcaccatc actaagttag gcccgtataga 900
 taac 904

10 <210> 11
 <211> 922
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 11

15 <210> 11
 <211> 922
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

	gaattcacca tgaggtggtt cctgcccctgg acgctggcag cagtgacagc 50 agcagccgcc agcaccgtcc tggccactgc agtggtcggg gtgggctgcg 100 tcctggatgg ggtgcgctac aacaacggcc agtccttcca gcctaactgc 150 aagtacaact gcacgtcat cgacggcgcg gtgggctgca caccactgtg 200 cctccgagtg cgccccccgc gtctctggtg ccccccacccg cggcgctgta 250 gcataacctgg ccactgctgt gagcagtggg tatgtgagga cgacgccaag 300 aggccacgca agaccgcacc ccgtgacaca ggagccctcg atgctgtggg 350 tgaggtggag gcatggcaca ggaactgcat agcctacaca agcccttgaa 400 gcccttgctc caccagctgc ggcctggggg tctccactcg gatctccaat 450 gttaacgccc agtgctggcc tgagcaagag agccgcctct gcaacttgcg 500 gccatgcgat gtggacatcc atacactcat taaggcaggg aagaagtgtc 550 tggtctgtta ccagccagag gcatccatga acttcacact tgccggctgc 600 atcagcacac gctcctatca acccaagtac tgtggagttt gcatggacaa 650 taggtctgc atccccatac agtctaagac tatcgcacgtg tccttccagt 700 gtcctgatgg gcttggcttc tcccgccagg tcctatggat taatgcctgc 750 ttctgttaacc tgagctgttag gaatcccaat gacatcttt ctgacttggaa 800 atcctaccct gacttctcag aaattgccaa cgcggccgca caccaccatc 850 accatcacca tcactaagtg aggccgcata gataactgat ccagtgtgct 900 ggaattaatt cgctgtctgc ga 922	
5	<210> 12 <211> 19 <212> ADN <213> Mus musculus	
10	<400> 12 ggctgcccatttgtgaccca	19
15	<210> 13 <211> 21 <212> ADN <213> Mus musculus	
20	<400> 13 cataggacccgtccggagaa a	21
25	<210> 14 <211> 19 <212> ADN <213> Mus musculus	
30	<400> 14 gccgtggcagtcctgaggg <210> 15 <211> 21 <212> ADN <213> Mus musculus	19
35	<400> 15 cagcaccggg cattgacgtt a <210> 16 <211> 21	21

ES 2 388 993 T3

	<212> ADN		
	<213> Mus musculus		
5	<400> 16 tggagaaaaa tggccgctac a	21	
10	<210> 17 <211> 20 <212> ADN <213> Mus musculus		
15	<400> 17 tgggttgctc ttctcgatgg	20	
20	<210> 18 <211> 21 <212> ADN <213> Mus musculus	21	
25	<400> 18 ggacaaatcg gccacgtaca t		
30	<210> 19 <211> 19 <212> ADN <213> Mus musculus	19	
35	<400> 19 cttgctccat cgggtctgc		
40	<210> 20 <211> 42 <212> PRT <213> Homo sapiens		
45	<400> 20 Glu Gln Trp Val Cys Glu Asp Asp Ala Lys Arg Pro Arg Lys Thr 1 5 10 15 Ala Pro Arg Asp Thr Gly Ala Phe Asp Ala Val Gly Glu Val Glu 20 25 30 Ala Trp His Arg Asn Cys Ile Ala Tyr Thr Ser Pro 35 40		
	<210> 21 <211> 625 <212> ADN <213> Homo sapiens		
	<400> 21 gaattcacca tgaggtggtt cctgccctgg acgctggcag cagtgacagc 50 agcagccgcc agcaccgtcc tggccactgc agtggtcggt gtgggctgcg 100 tcctggatgg ggtgcgctac aacaacggcc agtccttcca gcctaactgc 150 aagtacaact gcacgtgcatt cgacggcgcg gtgggctgca caccactgtg 200 cctccgagtg cgccccccgc gtctctggtg cccccaccccg cggcgcgtga 250 gcataacctgg ccactgttgt gagcagtggg tatgtgagga cgacgccaag 300		

aggccacgca agaccgcacc ccgtgacaca ggagcttcg atgctgtggg 350
 ttaggtggag gcatggcaca ggaactgcat agcctacaca agccccctgga 400
 gcccttgctc caccagctgc ggcctggggg tctccactcg gatctccaat 450
 gttaacgccc agtgctggcc tgagcaagag agccgcctct gcaacttgcg 500
 gccatgcgat gtggacatcc atacactcat taaggcggcc gcacaccacc 550
 atcaccatca ccatcactaa gtgaggccgc atagataact gatccagtgt 600
 gctggaattt attcgctgtc tgcg 625

<210> 22

<211> 1131

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 22

cctcggttct atcgattgaa ttccaccatg aggtggttcc tgccctggac 50
 gctggcagca gtgacagcag cagccgccag caccgtcctg gccacggccc 100
 tctctccagc ccctacgacc atggacttta ctccagctcc actggaggac 150
 acctcctcac gcccccaatt ctgcaagtgg ccatgtgagt gcccgcac 200
 cccaccccgc tgcccgctgg gggtcagcct catcacagat ggctgtgagt 250
 gctgtaagat gtgcgctcag cagcttgggg acaaactgcac ggaggctgcc 300
 atctgtgacc cccacccgggg cctctactgt gactacagcg gggaccgccc 350
 gaggtacgca ataggagtgt gtgcacaggt ggtcggtgtg ggggtcaccg 400
 acaaaaactca cacatgcccc ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 450
 ccgtcagtct tccttctccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc 500
 ccggacccct gaggtcacat gcgtgggtt ggacgtgagc cacgaagacc 550
 ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 600
 aagacaaagc cgccggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag 650
 cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt 700
 gcaaggcttc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 750
 aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc 800
 ccggaaagag atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtaaag 850
 gtttcttatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 900
 gagaacaact acaagaccac gcctccgtg ctggactccg acggctcctt 950
 cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcagggtgg cagcagggga 1000
 acgtttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 1050
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa tgagtgcgac ggccctagag 1100
 tcgacctgca gaagcttggc cgccatggcc c 1131

REIVINDICACIONES

1. Un antagonista de WISP-1 aislado que inhibe o neutraliza la inducción por WISP-1 o la secreción de HAS2, HA, CD44 o RHAMM por el polipéptido WISP-1 nativo en al menos un tipo de célula de mamífero, en el que dicho antagonista es un polipéptido del dominio 1 de WISP-1 que consiste en un polipéptido que tiene al menos el 95% de identidad de secuencias con los aminoácidos 24 - 117 de SEQ ID NO:1, para su uso en un procedimiento para inhibir o neutralizar la inducción por WISP-1 o la secreción de HAS2, HA, CD44 o RHAMM en células de mamífero.
- 5 2. Un antagonista de WISP-1 aislado, como se define en la reivindicación 1, para su uso en un procedimiento para inhibir la motilidad de células cancerosas.
- 10 3. Uso de un antagonista de WISP-1, como se define en la reivindicación 1, en la preparación de un medicamento para inhibir o neutralizar la inducción por WISP-1 o la secreción de HAS2, HA, CD44 o RHAMM en células de mamífero.
- 15 4. Uso de un antagonista del dominio 1 de WISP-1, como se define en la reivindicación 1, en la preparación de un medicamento para inhibir la motilidad de células cancerosas.
- 20 5. El antagonista para su uso, según la reivindicación 1 ó 2, o el uso, según la reivindicación 3 ó 4, en el que dicho antagonista es un polipéptido del dominio 1 de WISP-1 que consiste en los aminoácidos 24-117 de SEQ ID NO:1.
- 25 6. El antagonista para su uso o uso, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho polipéptido del dominio 1 de WISP-1 está fusionado con una región Fc de una inmunoglobulina.
- 30 7. El antagonista para su uso o uso, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dichas células son células cancerosas pancreáticas, células de cáncer de colon o colorrectal, células de cáncer de mama, células de cáncer de pulmón o células de cáncer cerebral.
- 35 8. Un antagonista de WISP-1 aislado, como se define en la reivindicación 1 ó 5 para su uso en un procedimiento de tratamiento de cáncer.
9. Uso de un antagonista de WISP-1, como se define en la reivindicación 1 ó 5, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer.
- 40 10. El antagonista para su uso, según la reivindicación 8, o el uso, según la reivindicación 9, en el que dicho polipéptido del dominio 1 de WISP-1 está fusionado con una región Fc de una inmunoglobulina.
11. El antagonista para su uso o el uso, según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que dicho cáncer es un cáncer pancreático, cáncer de colon o colorrectal, cáncer de mama, cáncer de pulmón o cáncer cerebral.
- 45 12. El antagonista para su uso o el uso, según cualquiera de las reivindicaciones 8-11, en el que dicho antagonista inhibe o reduce el crecimiento o la metástasis de células cancerosas.
13. El antagonista para su uso o el uso, según la reivindicación 12, en el que dicho antagonista inhibe o reduce la metástasis de células de cáncer de pulmón en un sitio secundario en el mamífero o diferente del sitio del tumor pulmonar primario en el mamífero.
- 50 14. El antagonista para su uso o el uso, según cualquiera de las reivindicaciones 8-13, en el que el tratamiento comprende además administrar quimioterapia, radiación, profármaco, agente citotóxico, agente inhibidor del crecimiento o citocina.
15. Una composición que comprende un antagonista, como se define en la reivindicación 1 ó 5, y un vehículo para su uso según la reivindicación 1, 2 u 8.
- 55 16. La composición para su uso, según la reivindicación 15, en la que dicho vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable.

FIG._1A

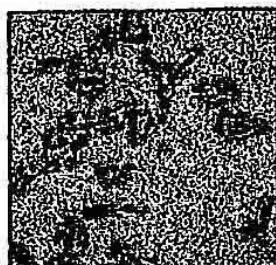


FIG._1B

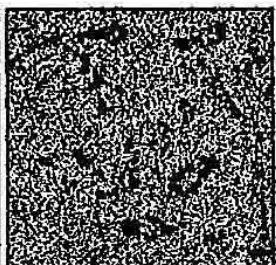


FIG._1C

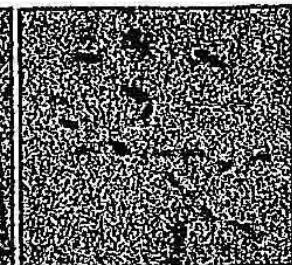


FIG._1D



FIG._1E

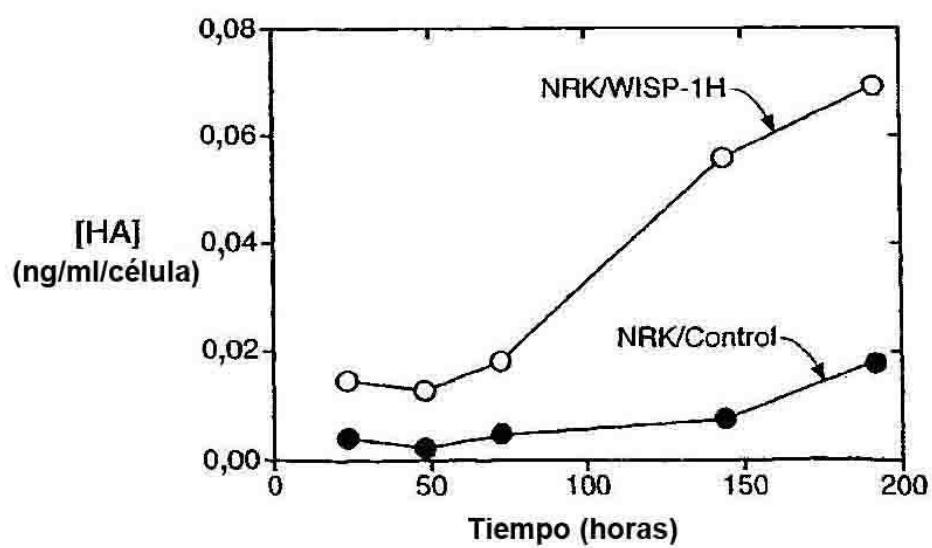


FIG._1F

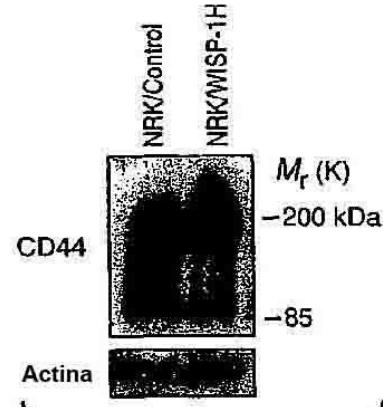
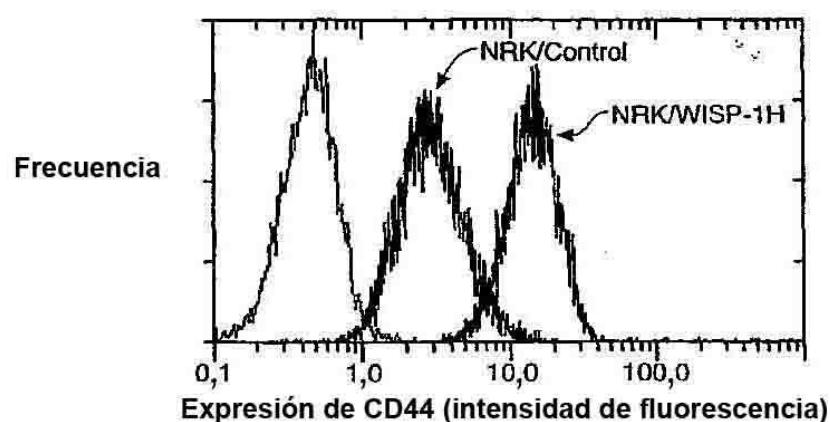
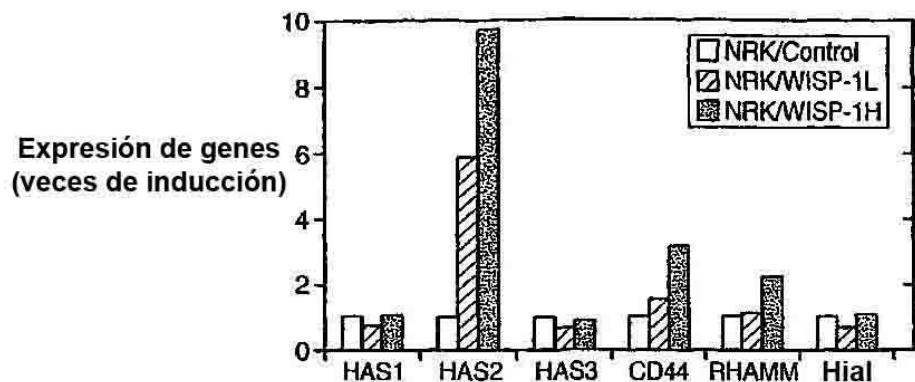


FIG._3A

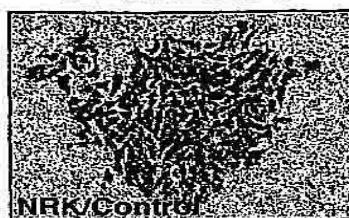


FIG._3B

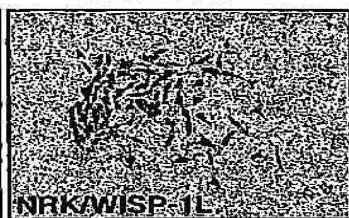


FIG._3C

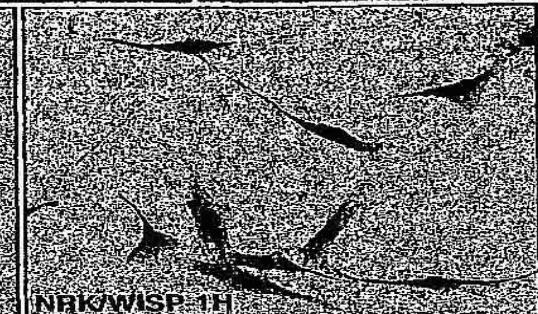
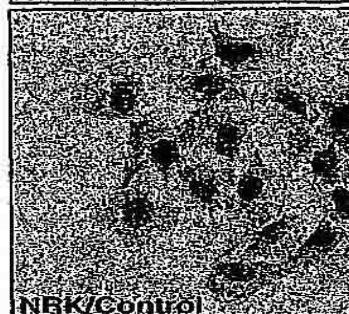
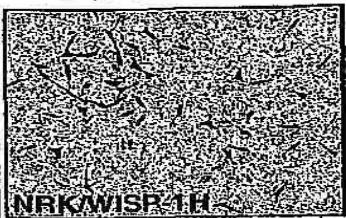


FIG._3D

FIG._3E

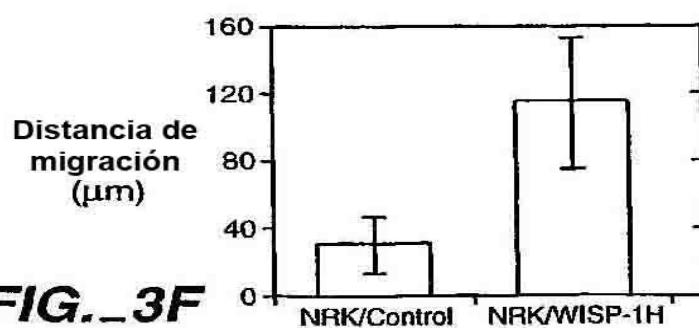


FIG._3F

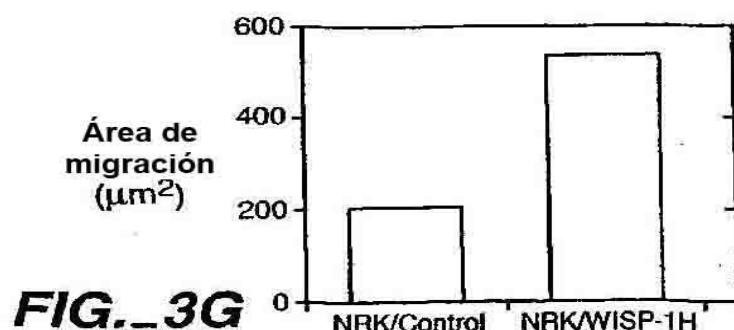
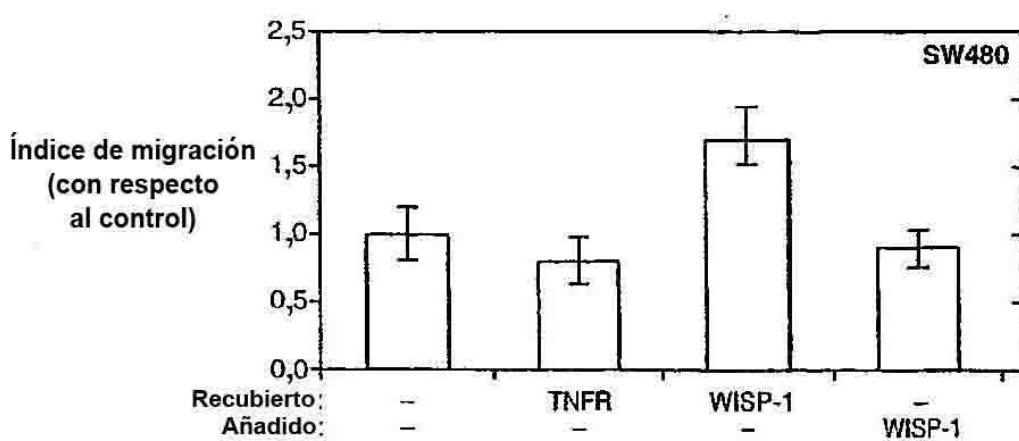
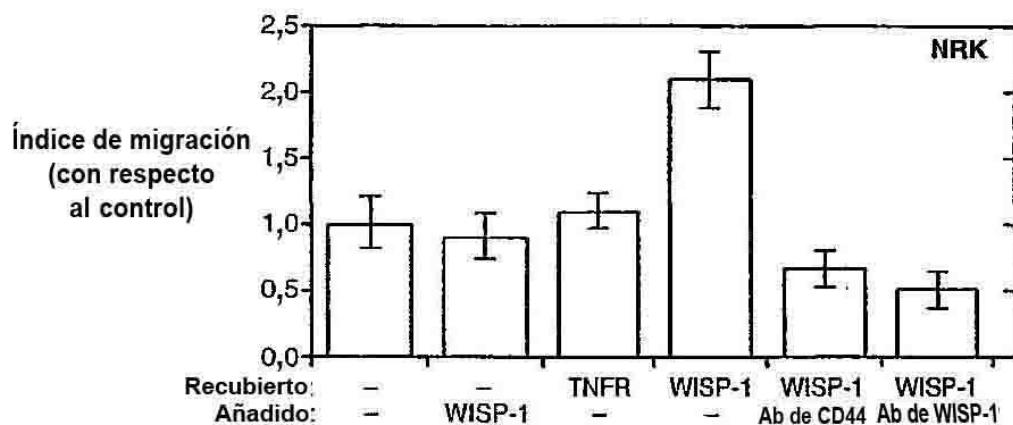
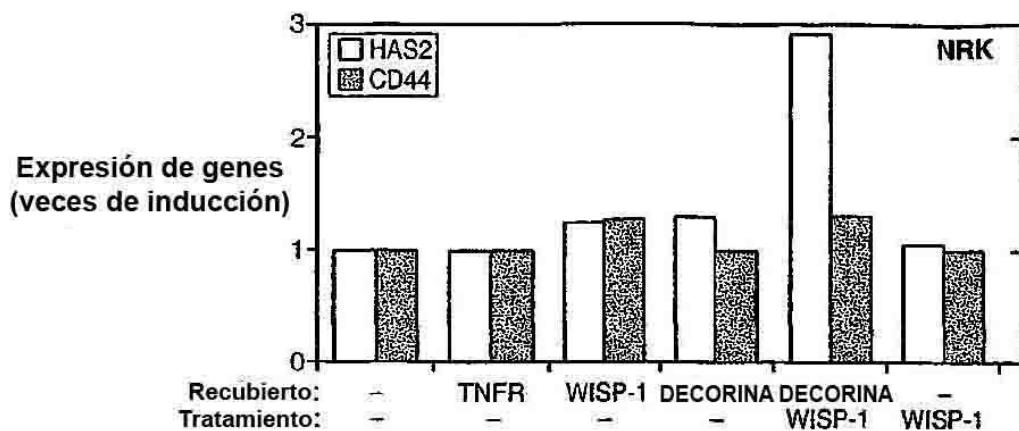


FIG._3G



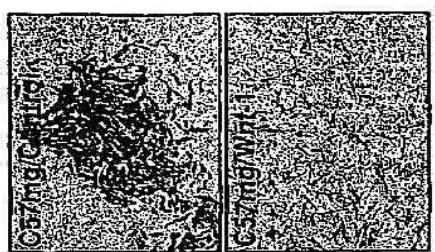


FIG. 5C

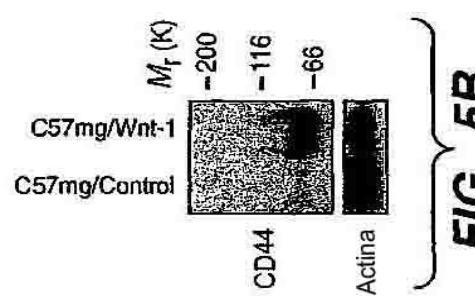


FIG. 5B

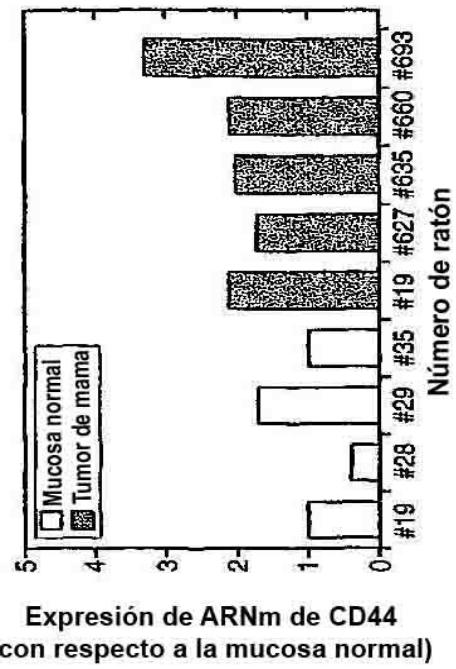


FIG. 5E

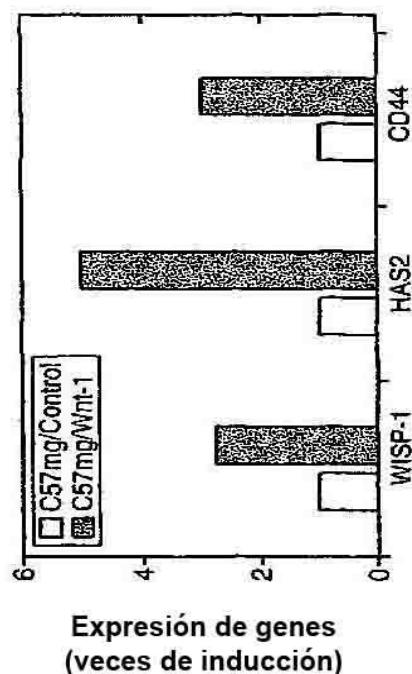


FIG. 5A

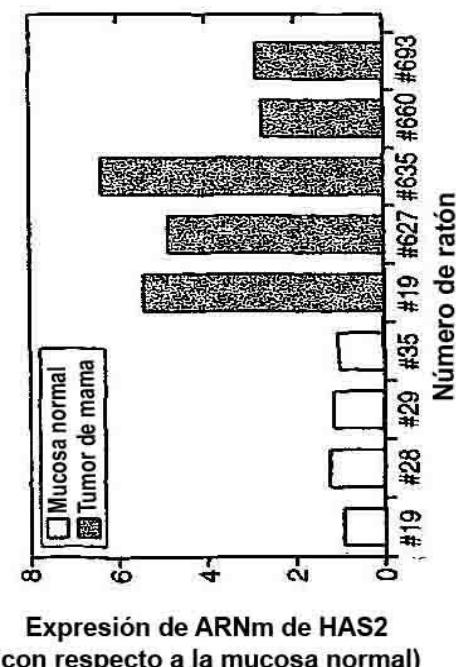


FIG. 5D

FIG._6A



FIG._6B

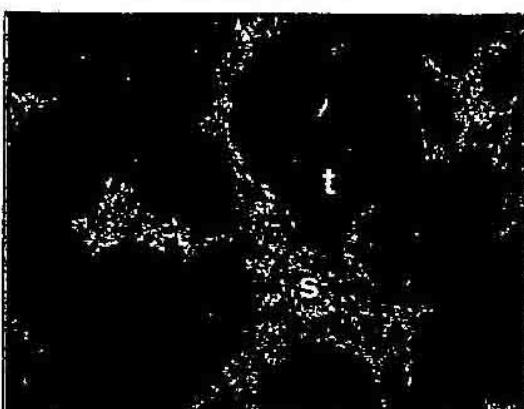


FIG._6C

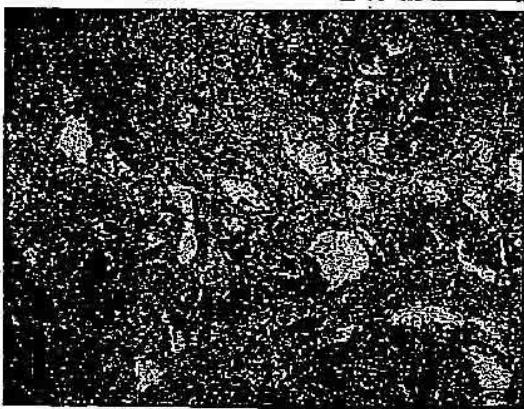


FIG._6D

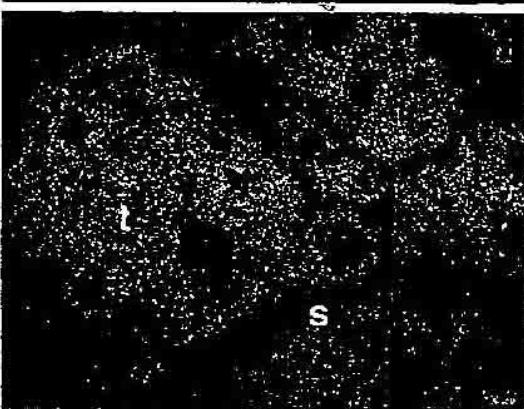


FIG._6E

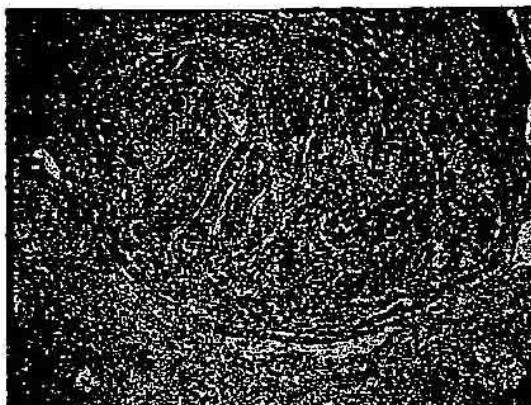


FIG._6F

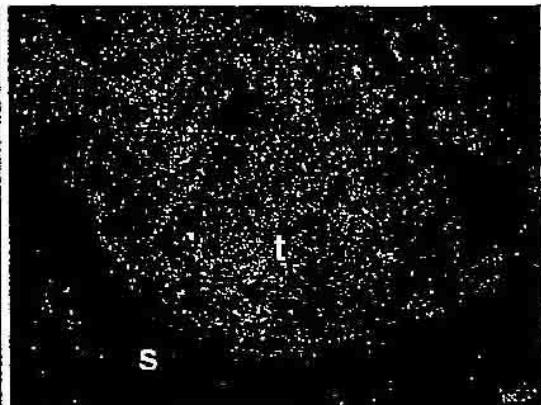
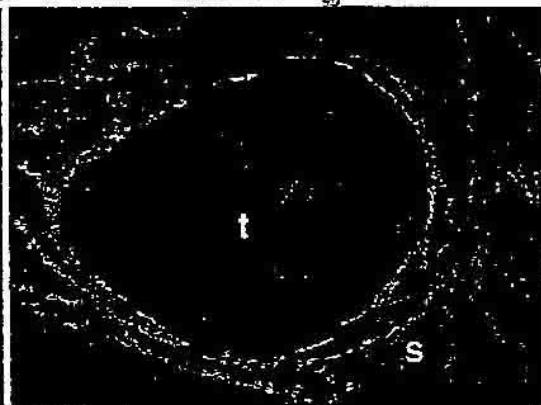


FIG._6G



FIG._6H



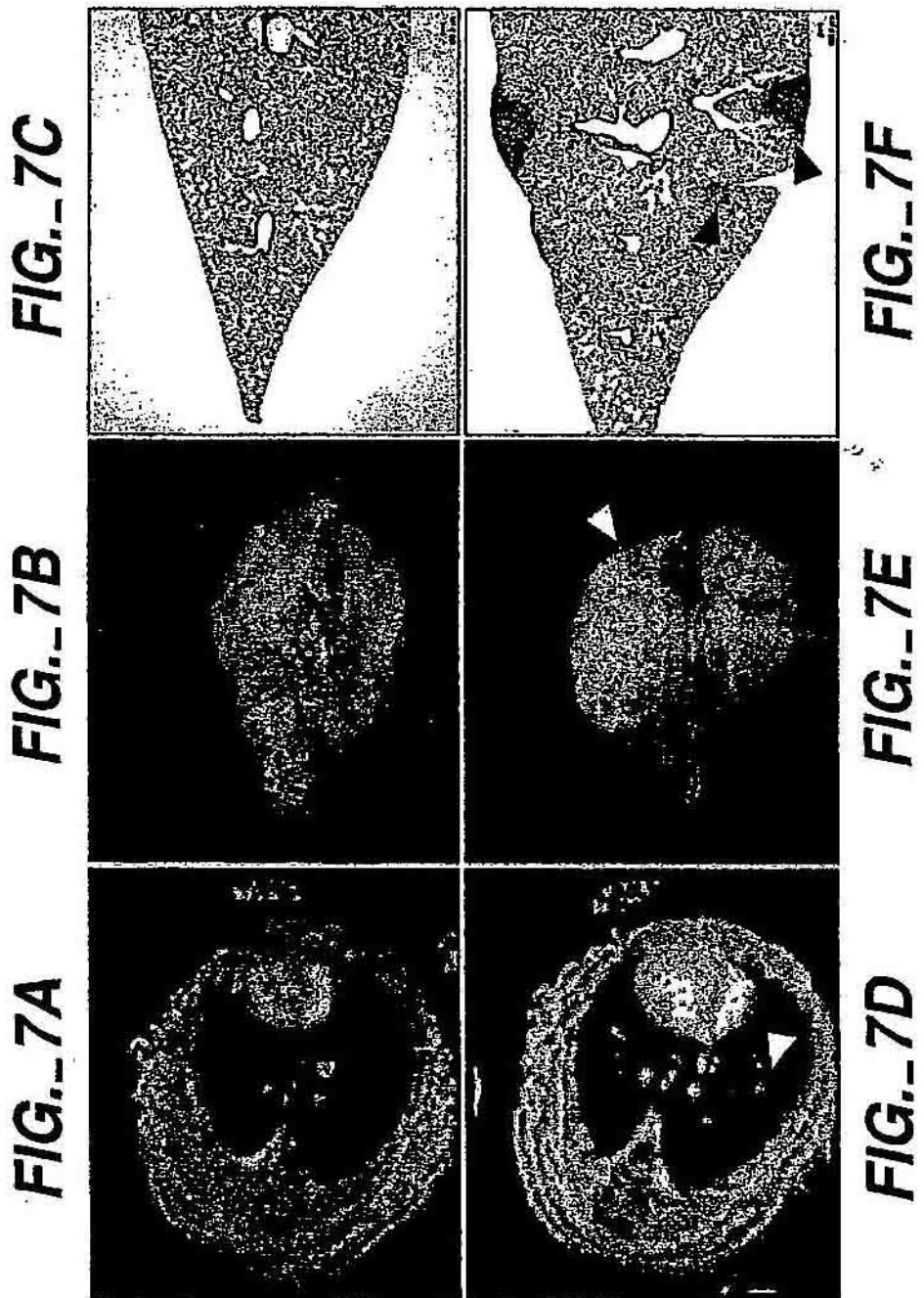


FIG._7G

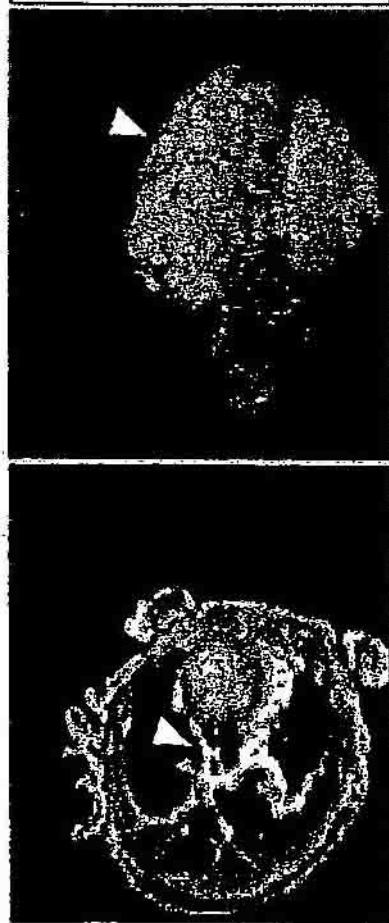


FIG._7H

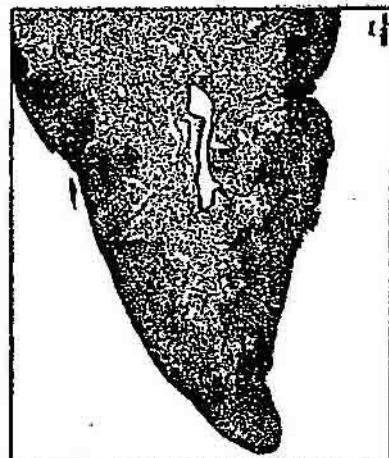


FIG._7I

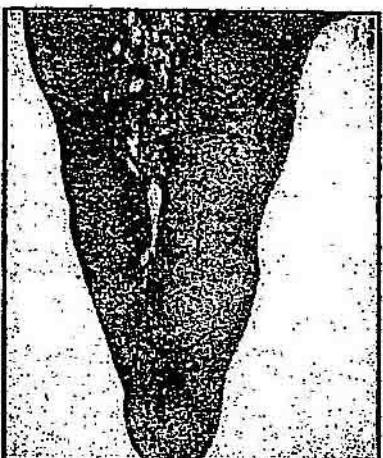


FIG._7J

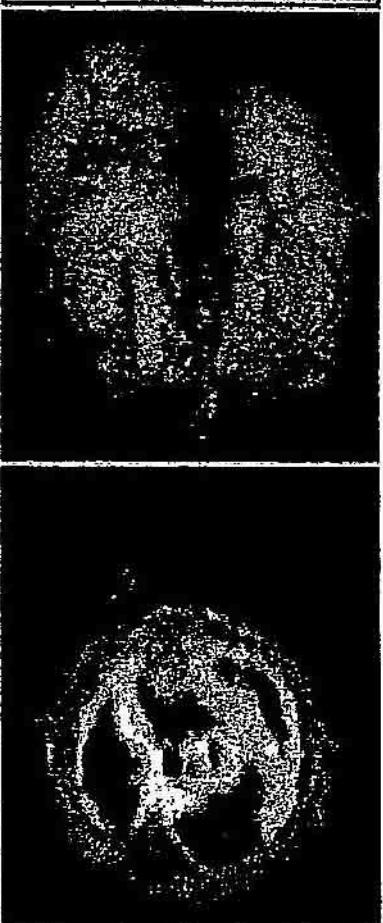


FIG._7K

FIG._7L

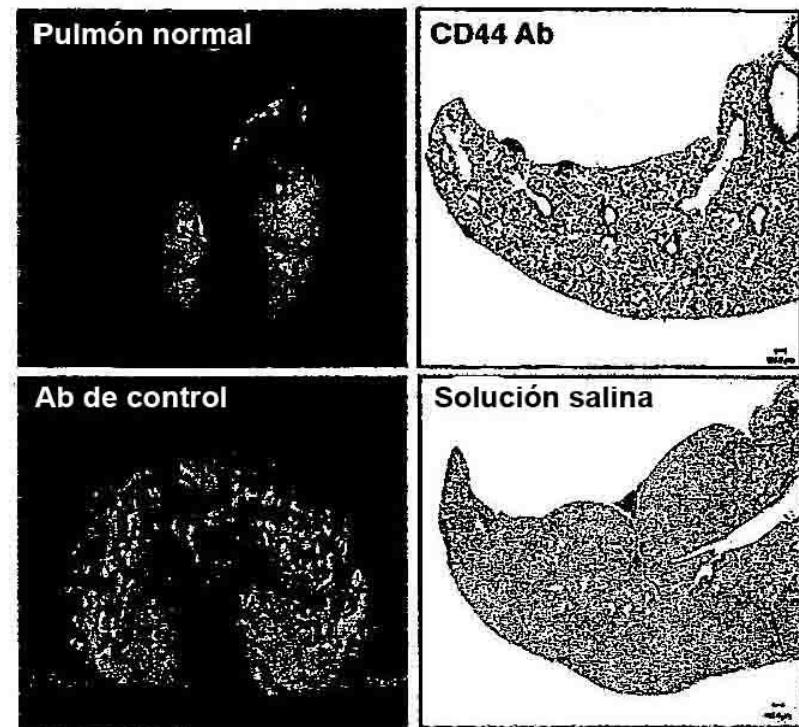


FIG._8A

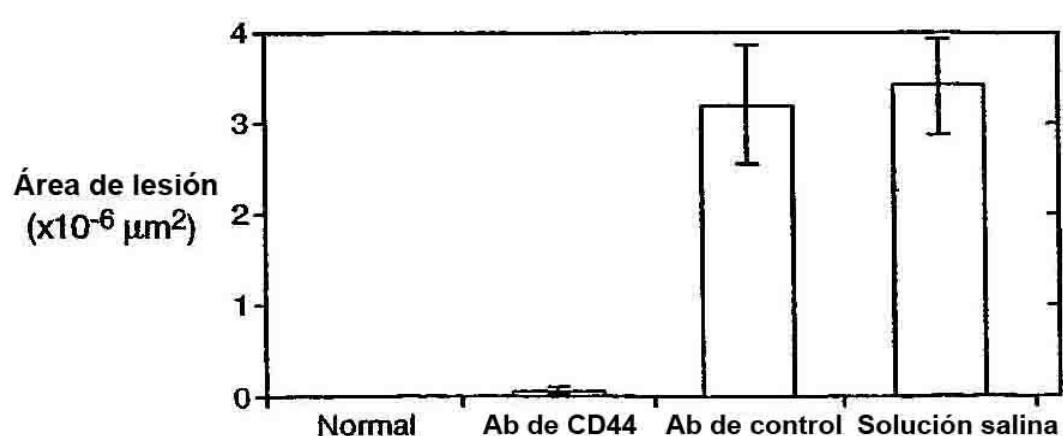


FIG._8B

1 CCCACCGGTC CGCTGGCCC AGCTCCCG AGAGGTGGTC GGATCCCTCG TCGATGCCG TGCCTACTGAC GTCCAGGCAT GAGGTGGTTC
 5 GGGTGGCAG GGGACCGG CCTAGGGAC CCTAACCAAG CCGACGGCC AGCTACCGAC ACGGTACTG CAGGTCCGTA CTCCACCGA
 101 CTGCCCTGAG CGCTGGAGC AGTACAGGA GCAGCCGCCA GCACCGTCTT GGCACAGGCC CTCCTCCAG CCCTACGAC CATGGACTT ACTCCAGCTC
 GACGGGACTT GCGACGCTCG TCACTGTCGT CGTCGGGGT CGTGGAGGA CCGGTCAGGGT GAGAGGGTC GGGATGCTG GAACTGAAA TGAGGTGGAG
 150 5 L P W T L A A V T A A A S T V L A T A L S P A P T T M D F T P A P
 201 CACTGGAGA CACCCCTCA CGCCCAAT TGTGCAAGTG GCCATSTGAG TGCCTGGCAT CCCACCCCG CTGGCGCTG GGGTCAGGC TCATCACAGA
 GTGACCTCTT GTGGGGAGT GCGGGGTTA AGACGTTCAC CGGTACACT ACGGGGATA GGGGGGGC GACCGGGAC CCCAGTCGG AGTAGTGTGT
 39 L E D T S S R P Q F C K W P C E C P P S P P R C P L G V S L I T D
 301 TGGCTTCTAG TGGCTTAAGA TGTCTGGCTCA CGAGCTTGGG GACAACGCA CGAGGTGAC CATCTGTGAC CCCACCGGG GCTCTACTG TGACTACAGC
 ACCGACACTC ACCGACTT ACAGCGAGT CGTCGAAACCC CTCGTCAGT GCTTCGAGC GTAGACACTG CCGATGGCC CCGAGATGAC ACTGATGCG
 72 G C E C C K M C A Q Q L G D N C T E A A I C D P H R G L Y C D Y S
 401 GGGGACCCC CGAGGTACGC AATAGGAGTG TGTGACACAGG TGGTGGCTT GGGCTGGCTC CTGGAGGGG TGCGCTACAA CAACGGCCAG TCCTTCAGC
 105 G D R P R Y A I G V C A Q V V G C V L D G V R Y N N G Q S F Q P
 501 CCCCTGGCG GCTCATGGC TAACTCTCAC ACACGTTCTAC ACCGGCAACA CCGAGCAAG GACCTAACCC AGGGATGTT GTGGCCGGTC AGGAAGGTG
 501 CTAACCTGAA GTACACACTGC ACGGGGCATCG ACCGGGGCGT GGGCTGCAAA CCACTGTGCC TCCGAAGCG CCCCCCGGT CTCTGGTGCC CCCACCCGGG
 139 N C K Y N C T C I D G A V G C T P L C L R V R P P R L W C P H P R
 601 GATTGACCTT CAGTGTACG TGCAGCTTACG TCCCGCGCCA CCCGACCTGT GGRGACACGG AGGCTTCAGC GGGGGGGCGCA GAGACCACGG
 172 R V S I P G H C C E Q W V C E D D A K R P R K T A P R D T G A F D
 701 GCTGTGGTG AGGTGGGG ATGGACAGG AACTGCTGAA CCTACACAGG CCCCCTGGAC CCGCTGGCTCA CCAGCTGGGG CCTGGTGGCA
 701 CGACACCCAC TCCACCTCG TACCTGTGCC TTGAGCTTACG TGGCTGGCTTC CGGTGGCTTC CGGTGGCTTC TGGGTGGGG CACTGTGCC TCGGAAGGCA
 205 A V G E V E A W H R N C I A Y T S P W S P C S T S C G L G V S T R I
 801 TCTCCATAGT TAACGGCCAG TGCTGGCTG ACCRAGAGAG CGGGCCTGCTGC ARCTGGGGC CATGGGAGT GGAACTCCAT AGACTCATTA AGGCAGGGGA
 AGAGGTAA CAATGGGGTC ACGACGGAC TGGTTCTC GGGGGAGAG TGTAGCTACA CCTGGCTAA TGTGAGTAAAT TCCGGTCCCTT
 239 S N V N A Q C W P E Q E S R L C N L R P C D V D I H T L I K A G K

FIG.-9A

901 GAAAGTGTCTG GCTGTGTACC AGCCAGGGC ATCCATGAAAC TTCAACACTTG CGGGCTGCAT CAGCACACGC TCCTATCAC CCAAGTACTG TGGAGTTTC
 CTTCAACAGAC CGAACATGG TCGGTCTCG TAGGTACTTG AAGTGTGAAAC GCGCGACGTA GTCGTGTGCG AGGATAGTG GGTTCATGAC ACCTCAAACG
 272 K C L A V Y Q P E A S M N F T L A G C I S T R S Y Q P K Y C G V C

 1001 ATGGACAATA GGUGCTGCAT CCCCTAACAG TCTAAGACTA TCGACGTGTC CTCAGTGTGCTT CCTGATGGGC TTGGCTCTC CGGCCAGGTC CTATGGATA
 TACCTGTTAT CCACGACGTA GGGGATGTC AGATTCGTAG AGCTGACAG GAGGTACACA GGACTACCG AACGAGAG GCCTGCTCAG GATACTTAAT
 305 W D N R C C C I P V K S K T I D V S F Q C P D G L Q F S R Q V L W I N

 1101 ATGCCCTGCTT CTGTAACCTG AGCTGTAGGA ATCCCCATGA CATCTTGTGCT GACTTGGAA CCTACCCCTGA CTTCCTCGAA ATGGCCAATC AGGCCAGGAC
 TACGGACGAA GACATTGGAC TCGACATCTCT TAGGGTACT GTAGAAACGA CTGAAACCTTA GGATGGGACT GAGAGCTTT TAACTGGTGA TOCGTCCGTG
 339 A C F C N L S C R N P N D I F A D L E S Y P D F S E I A N O

 1201 AAATCTCGG TCCTGGGGAC TAACCCAAATG CTCGTGAAAG AGTCAGGCCCT TATGGCCAAAT AACTTTAC CAATGAGCCT TAGTTACCCCT GATOTGGACC
 TTAGAACCC AGAACCCCTG ATTGGTTAC GGACACCTTG TCAGTGGGGAA ATACCGGTTA TTGAAAGTG GTTACTCGGA ATCAATGGGA CTAGACCTGG

 1301 CTTGGCTCC ATTCTGTCT CTAAACCATTC AAATGACGCC TGATGGTGTGCT GCTCAGGCCCT ATGCTATGAG TTTCCTCCTT GATATCATTC ACCATCTACT
 GAACCGAAGG TAAAGACAGA GATTGTTAG TTTACTGCGG ACTTACACGA CGAGTCGGG TACCATACTC AAAGAGAA CTATAGTAA TGTTAGATGA

 1401 CTTGGCTCC ATTCTGTCT CTAAACCATTC TGAGCTACAC CCAAGCTGA TCCAGGCTT CCAAGTCACT AGAGCTCTG CTGGATCTG CCTAAATCCC
 GATTTCTTT TACGGACAGA GATCGACAAAG ACCTGATGTC GGTTCGGACT AGGTGGAA GGTTCAGTGA TCTTCAGGAC GACCTAGAAC GGATTAGGG

 1501 AAGAAATGGA ATCAGGGTAGA CTTTTAAATG CACTAAATTC TTCTTTAGAT GCCAACCCAC AAGACTCTT CCAAGCTT CCAAGCTT AGATGAATAG ATGGAATTG
 TTCTTCTCT TACGCCATCT GAAAATTATA GTGATTAAG AAGAAATCTA CGGTTGGTG TTCTGAGAA CCCAGTGA AGTTCAGTAA TCTACTTAC TACCTTAAAC

 1601 GAACAAATGAA ATAATCTTATT ATTGGAGGC TGCCCAAGGG TACTGTATG OCTAATTCG ACCTOAGGCC ACCAAACTA TCTGTATCC AATATGTAT
 CTGTGTACT TATTAGATAA TAACCTCGG AGCTGTCTCC ATGACATTAC CTTAAAGAC TCTAGTCGC TGGTTGTAG AGGACTTAAAG TTATACATA

 1701 GCACCTCAAG GTCATCAAAAC ATTGGCAAG TGAGTGTGAT AGTGTGCTTAA TTGTGATT TTATGGAAAG TTGTGATCCAT TAACCTGGGC ATTGTGAGG
 CGTGGAGTTC CAGTAGTTG TAAACGTTCTC ACTCAACTTA TCAACGAAATT AAAACTTAAAT ATTACCTTC AACATAGGTA ATGGGACCCG TAACAACCTC

 1801 TTAAAGTTCT CTTCACCCCT ACACCTGAA GGGTACAGAT TAGGTGTGTC CGAGTCAGAA ATAAATTTG ATAAACATTCT CGTTGTGTTG GAAAAGCCCC
 AATTCAGAA GAAGTGGGA TTGACACTT CCCATGCTA ATCAAACAG GCTCACTTCTT TATTTAAC TATTGTAAG GACAACCTCC CTTTTGGGG

 1901 CAGTAAATAC TCAGAGAGACA GGGAAAGGGTC AGCCCAATTTC AGAAGGACCA ATTGACTCTC ACACGTGAC 'TGGCAGGGGT' TTGGCAGGTT
 GTCAATTATG AGGTCTCTGT CCCTTTCOAG TCGGGTAAAG TCTTCTGGT TAATCTGAGG TCTGACTTAG TCGACGACTG ACCGTCCGA AACCGTCAA

FIG.-9B

2001 GCCCCGGCTC TTCCCTTGAACT CTCCTCCCTT GNCCTGCTTG CGGTCAATAGG AATTGGTAGG GCCTCTGGAC TGGCTGTCT GGCCCTGAQ AGTGGTCCC
 CCGGTCCGAG AAGGAACCTA GAAGGGGAA CAGACGAAC CCAAGATTC TMAACCATT CGGAGACCTG ACCGGACAGA CGGGACAGA TCACCAAGGG

 2101 TGGAAACACTC CTCTACTCTT ACAGAGCCCTT GAGAGACCA GCTGGCAGACC ATGGCAGACC CACTGAATG ACCAAGACAG GTTCAGGTAG GGGTGTGGT
 ACCTTGTGAG GAGATGAGA TGTCMCGAA CTCTGTGGT CGACGCTGG TAGGTTCTGG GTGACTTTAC TGGTCTGTG CAAGTCCATC CCCACACCA

 2201 CAAACCAAGA AGTGGTGCC CTGGTGAAGA CCCTGGGGTG ACCTCTAGG CTGGGGCTG TGGGACTCA CGGGCCCCCG TATTCAAGGC ACATCTATG
 GTTGTGGTCTC TCACCCACGG GAACCATGTT CGGACCTCTG GACCTCGAC ACCCTGTGGT CCCGGGGGC ACAAGTCTG TGTAAGTAC

 2301 CAGAGACTCA TTTCACAGCC TTTCGTTCTG CTGACCAAAT GGCCAGTTT CTGSIAGAA GATGGAGTT TACCAAGTGT TTAGAAACAG AAADAGACT
 GTCTCTGAGT AAAGTGTGG AAAGGAGAC GACTGGTTA CGGGTCAAAA GACCATCCTT CTACCTCAA ATGTCACAAC AATCTTGGIC TTATCTGAA

 2401 AATAAAGGGT TAAAGCTGAA GAGGTGAAG CTAAAGGAA AAGGTGTG TTAATGAAAT TCAGGCTTT ATTATGTA TTAGGAAAT ATAATATTA
 TTATTTCAA ATTTCGACTT CTCCAACTTC GATTTCTT TTCCAACGAC AATTACTTAT AGTCGATAAT TAATAACAT ATCCCTTTA TATTATAAT

 2501 CTGGTAGAAAT TCTTTTATT AGGGCTTTT CTGGCCAGA CATTGGCTC AGTGTCTG AGTGTATGC TCACTGAATC TCACTGACAA TGTGGAG
 GACAATCTA AGAAATAAA TCCCGAAA GACGGGTGT GTAACGGAG TCACTGAAAG TACATATGC AGTGTCTGAG AGTGGCTGT ACAACTCTC

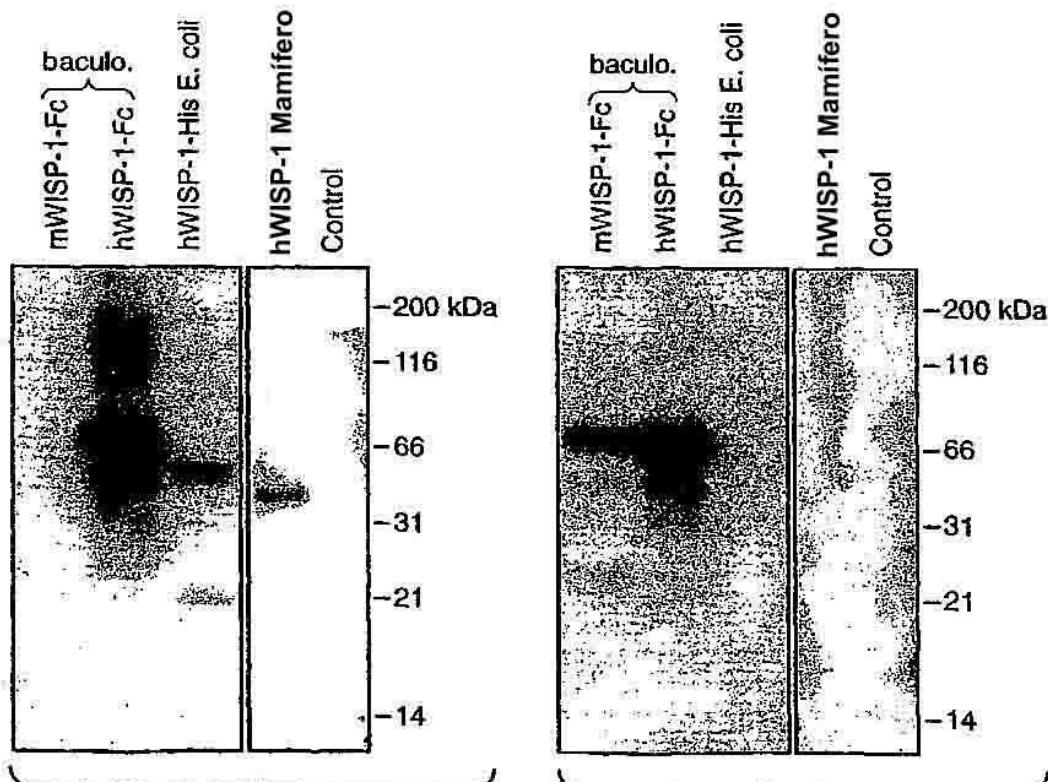
 2601 TTCCCATTTAT TATTCTGTT CTACAAATG TGAAACGGAA GCTCATAGG GTCAGAAAC TCAACCGAG TCACCGATT GTGACTGGG AAAGTAAAGA
 AAGGGTAAATA ATAAGACAA GAATGTCTAC ACTTGTCTT CGAGTGTTC CACTCTTG AGTGTCTC AGTGGTCA CCACTGACCC TTTCATCT

 2701 TTCAGATCGA AATTGGACTG TCTTATAAC CCATATTTC CCCATGTCTT TAGAGCTCC AAATGTCTCA GAATAGAAA ACATGGCAAT AAATGGCTG
 AAGTCTAGCT TPAACCTGAC AGAAATATG GTTAAAGG GGGACAAA ATTCGAAGG TTACACAGT CTATCCTT TGTAAACGTT TTACCGAAC

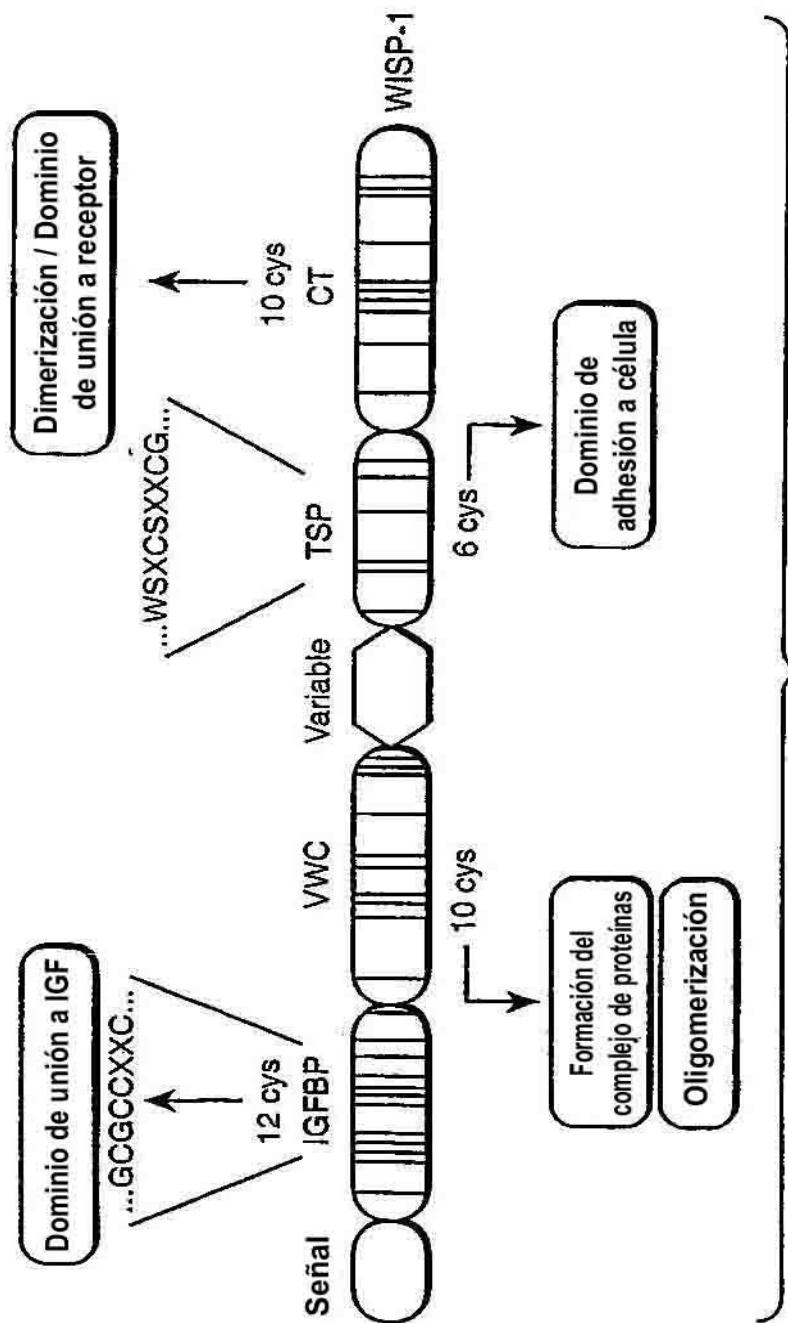
 2801 ATTTTTAA AAAAAGAA AAAAAGAAA
 TAAAGATTT TTTTTTTT TTTTTTTT

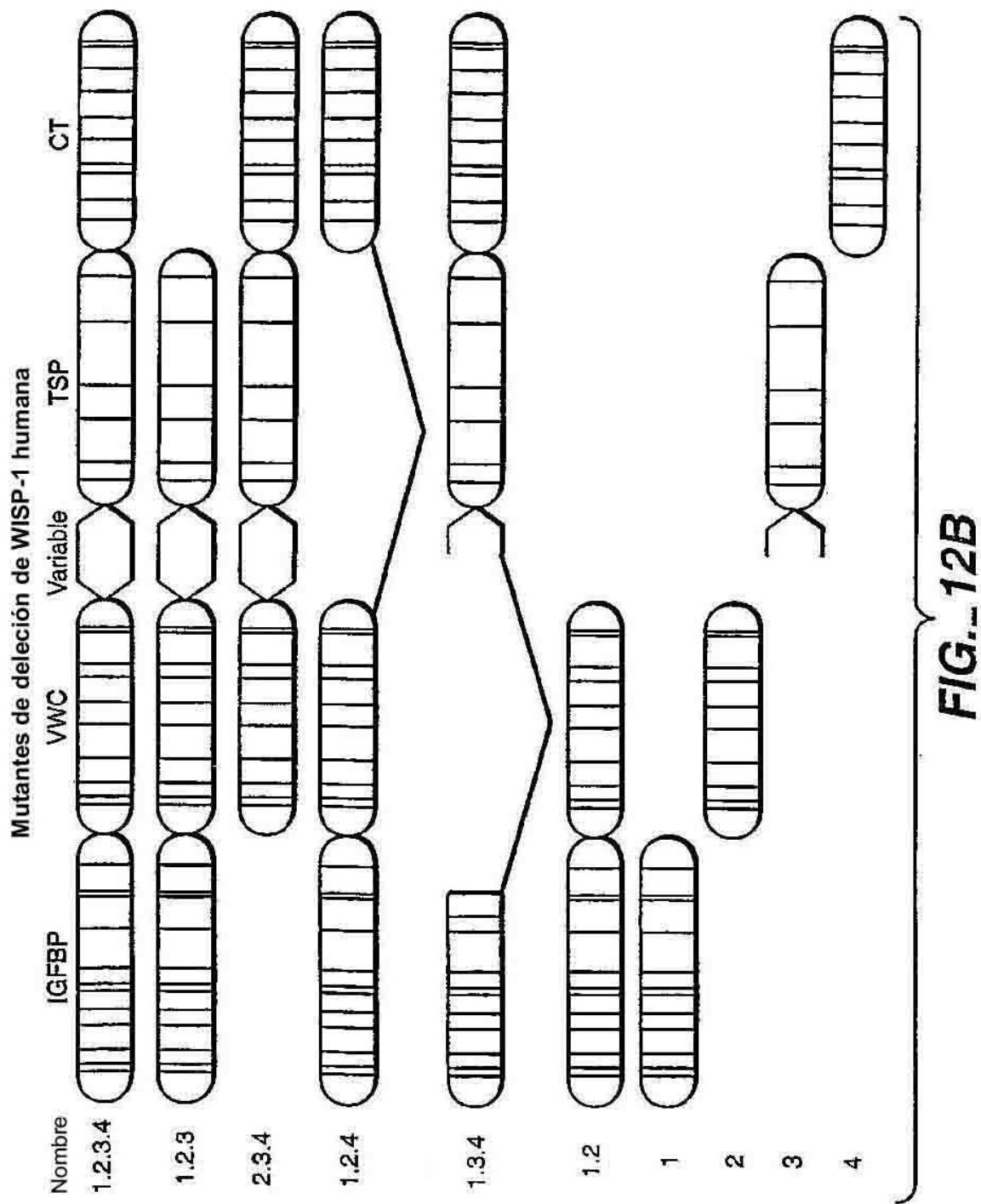
FIG._9C

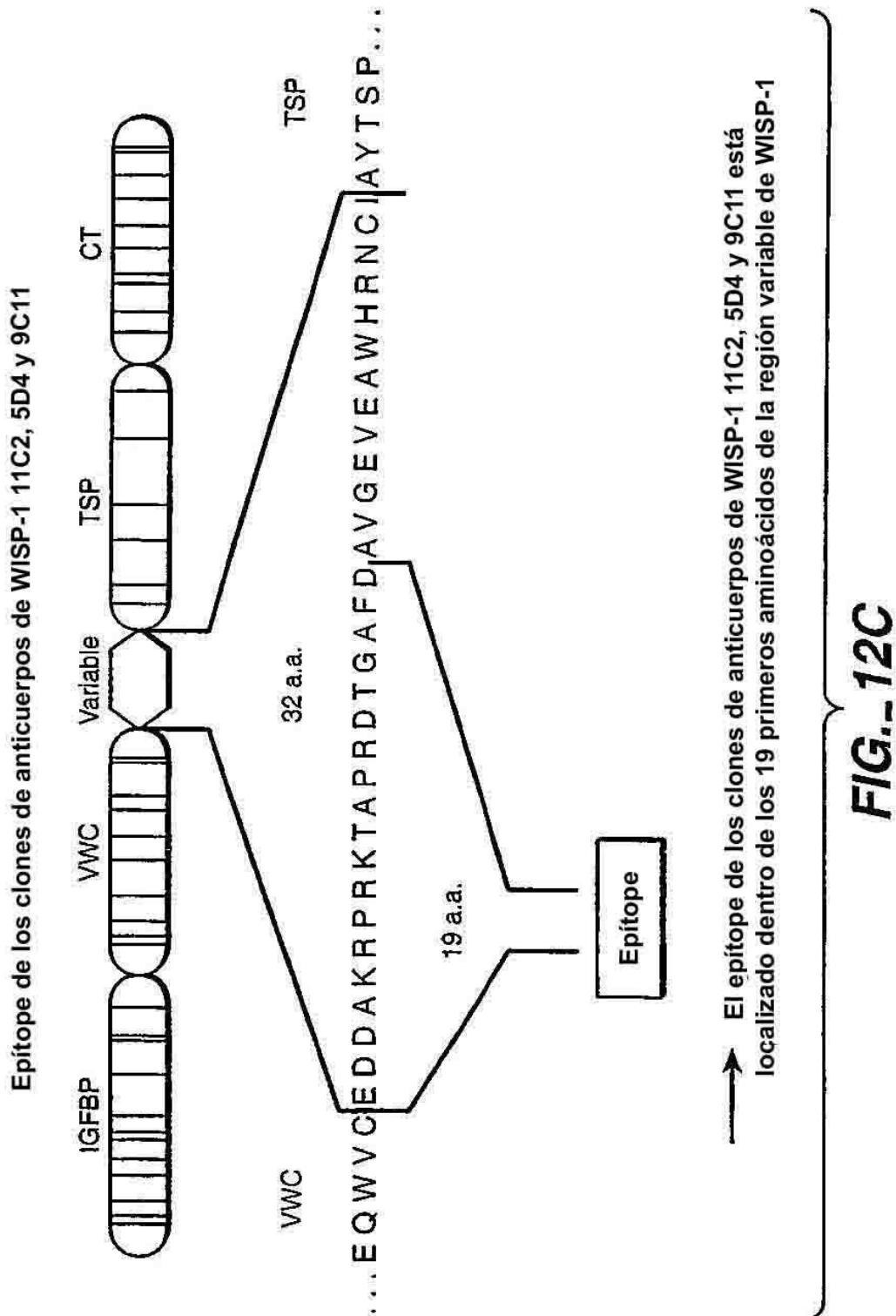
Efecto de la expresión de WISP-1 sobre el potencial metastásico de NRK				
Nº de células inyectadas	Semanas después de la inoculación	Incidencia de metástasis de pulmón		
		NRK/Control	NRK/WISP-1L	NRK/WISP-1H
$2,5 \times 10^5$	2	0/1	0/1	2/2 (Grado I)
	3	0/4	3/3 (Grado I)	4/4 (Grado I-II)
	4	0/4	4/4 (Grado I)	3/3 (Grado III)
$0,5 \times 10^5$	2	0/2	0/2	1/2 (Grado I)
	3	0/4	2/4 (Grado I)	3/4 (Grado I)
	4	0/4	4/4 (Grado I)	3/4 (Grado I-II)

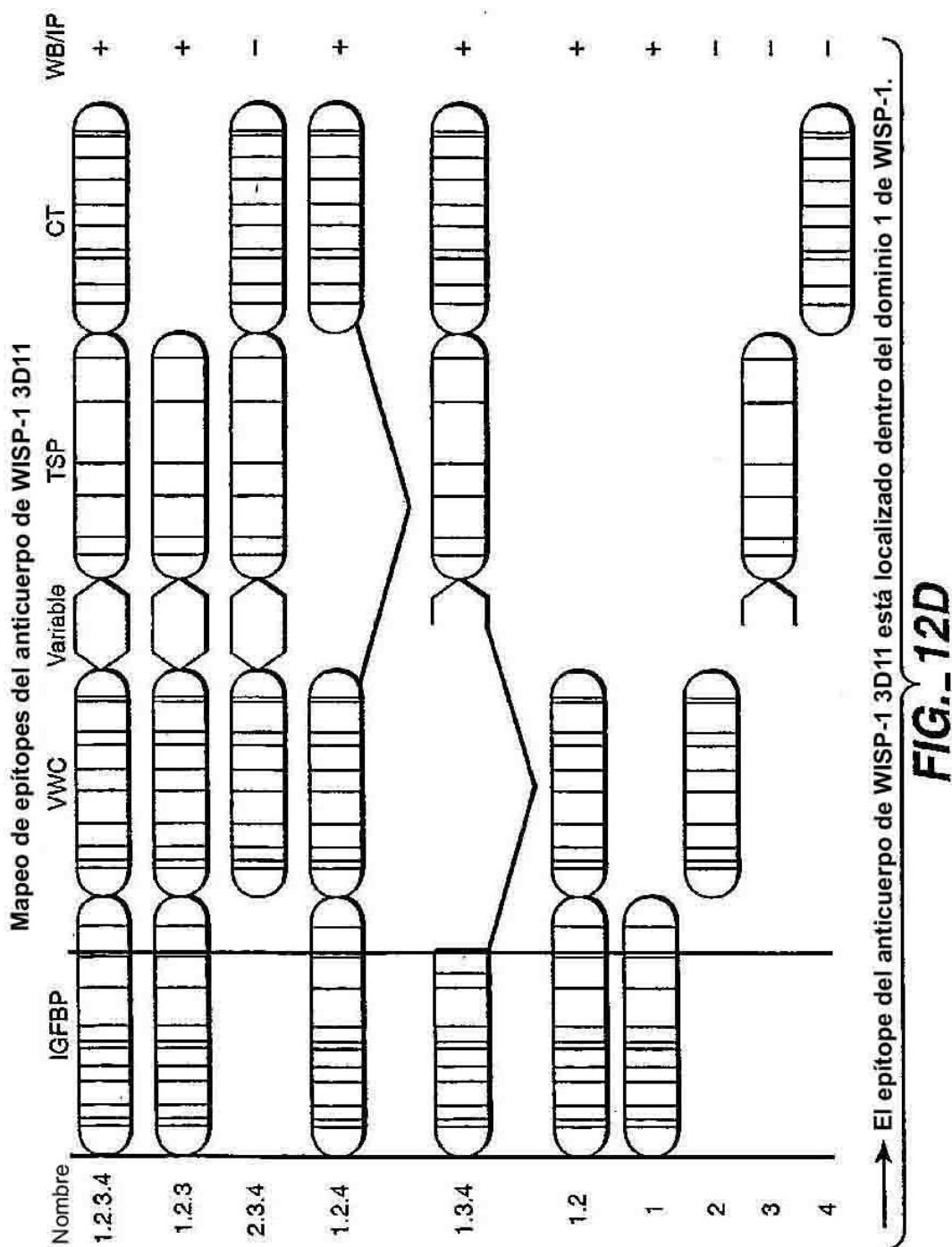
FIG.- 10**FIG.- 11A****FIG.- 11B**

WISP-1: Proteína secretada inducida por Wnt-1

**FIG.. 12A**







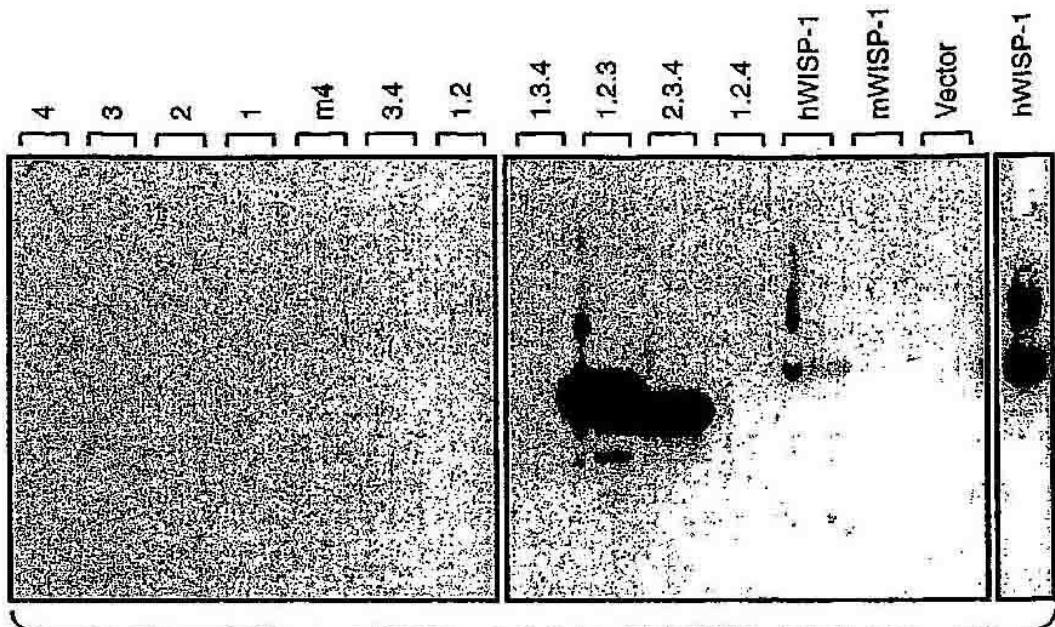


FIG._12E

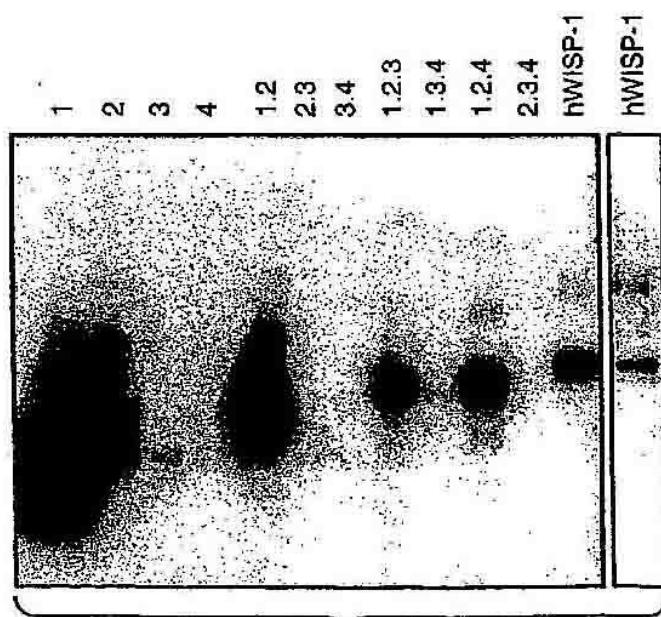
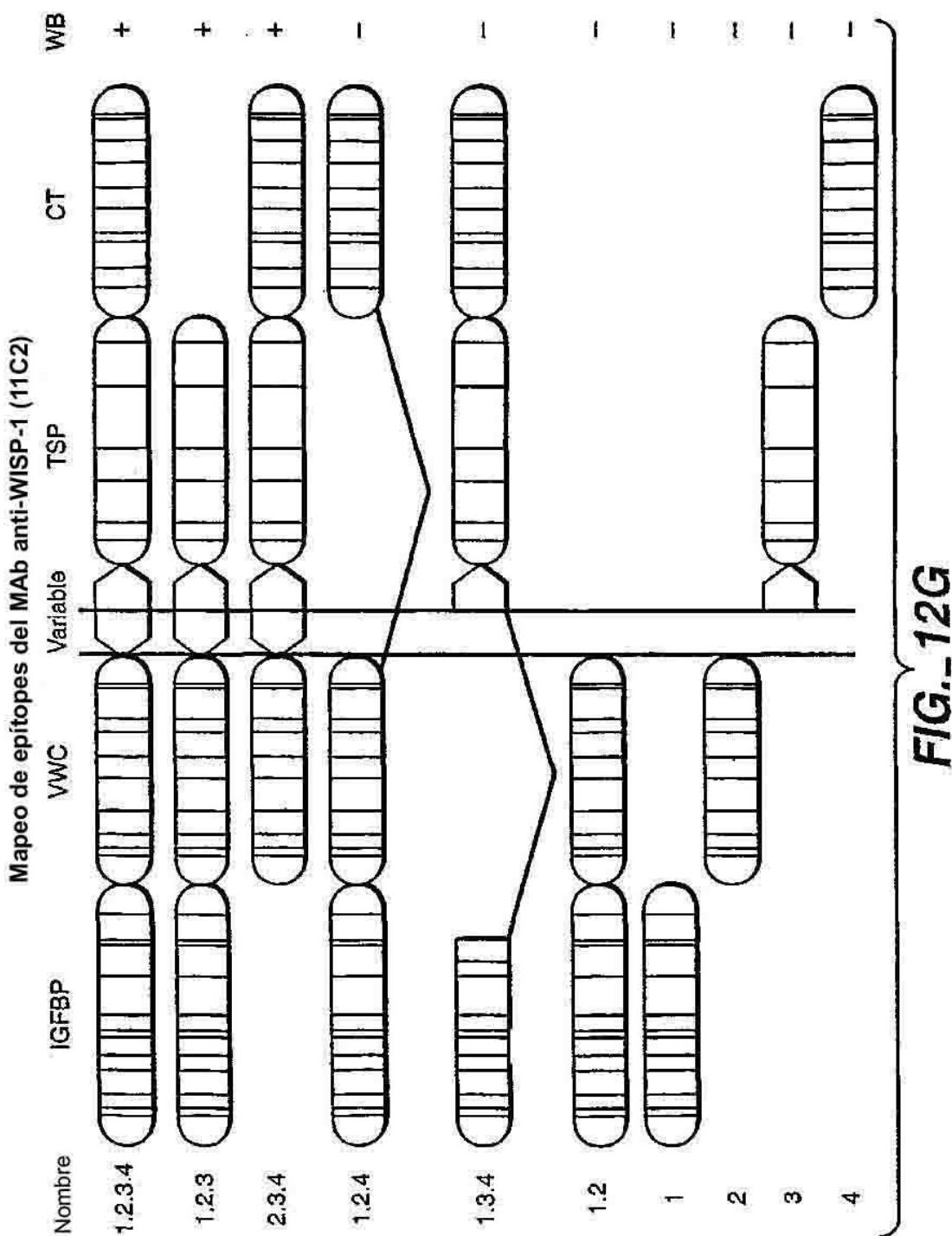


FIG._12F



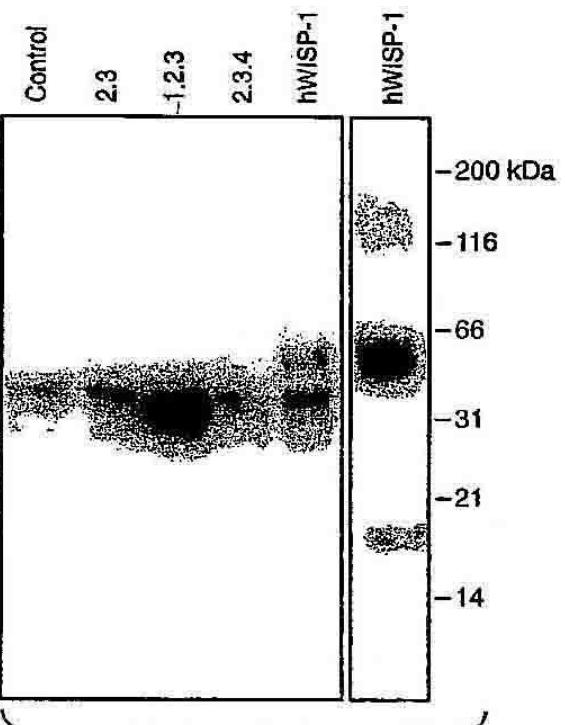


FIG. 13

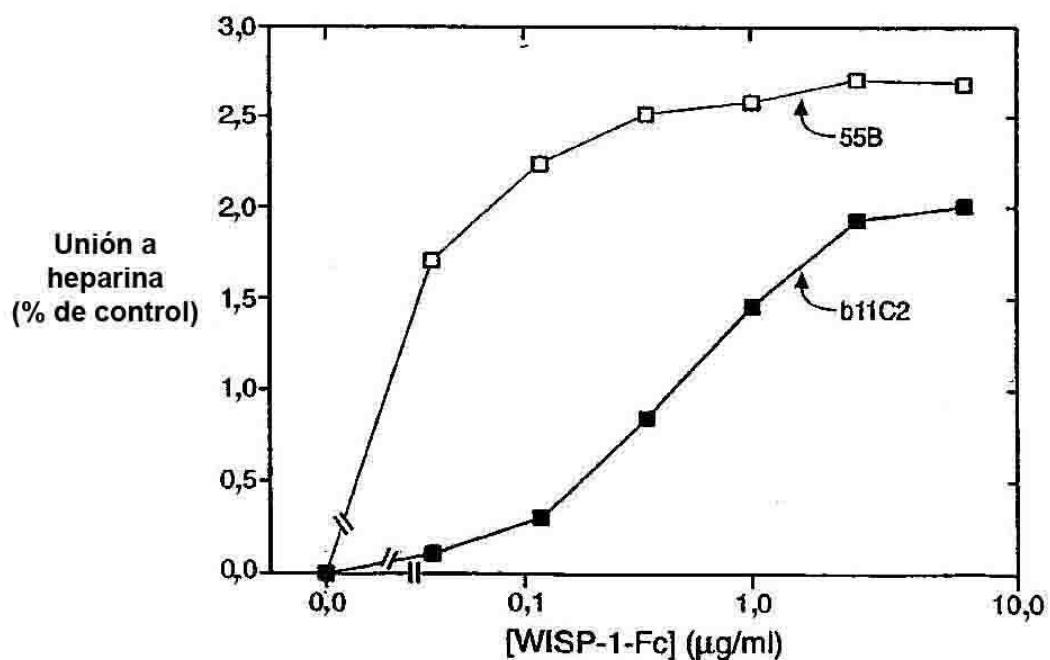
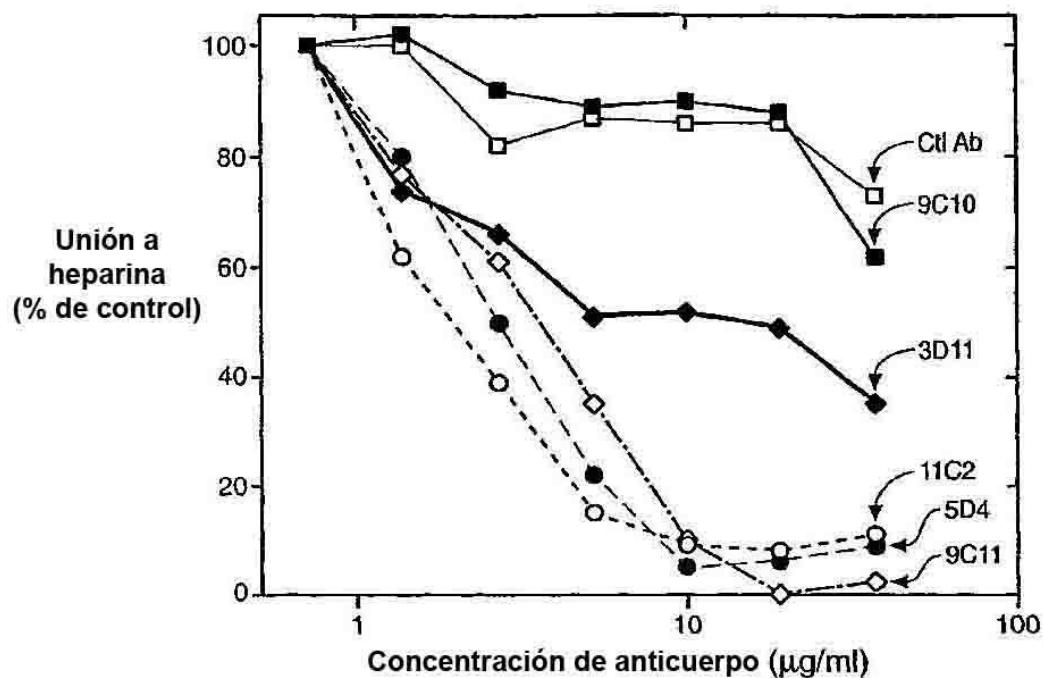
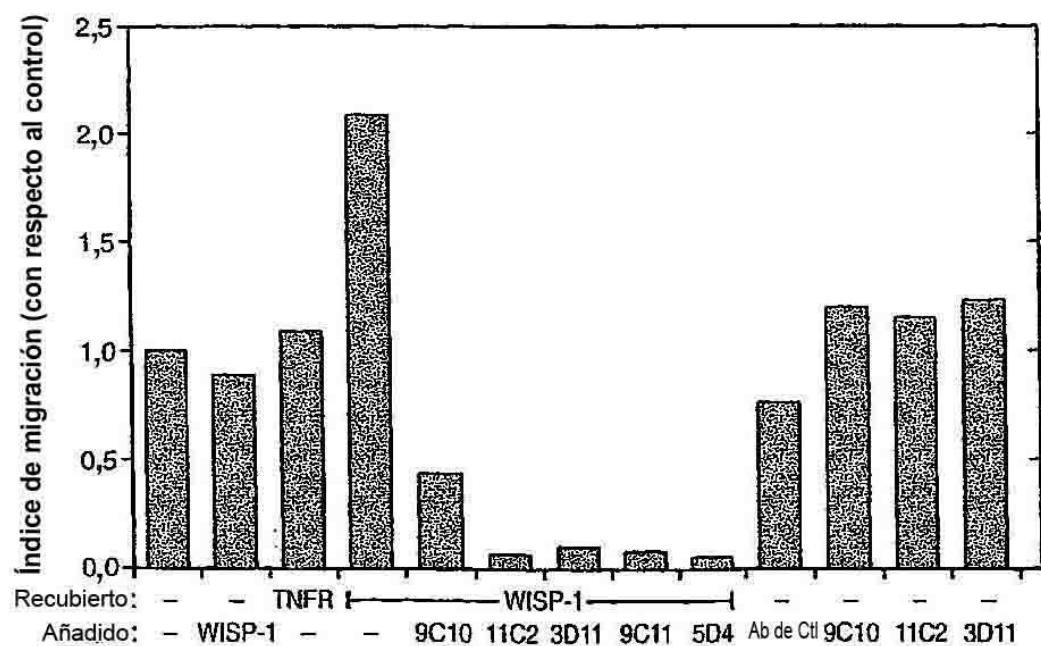
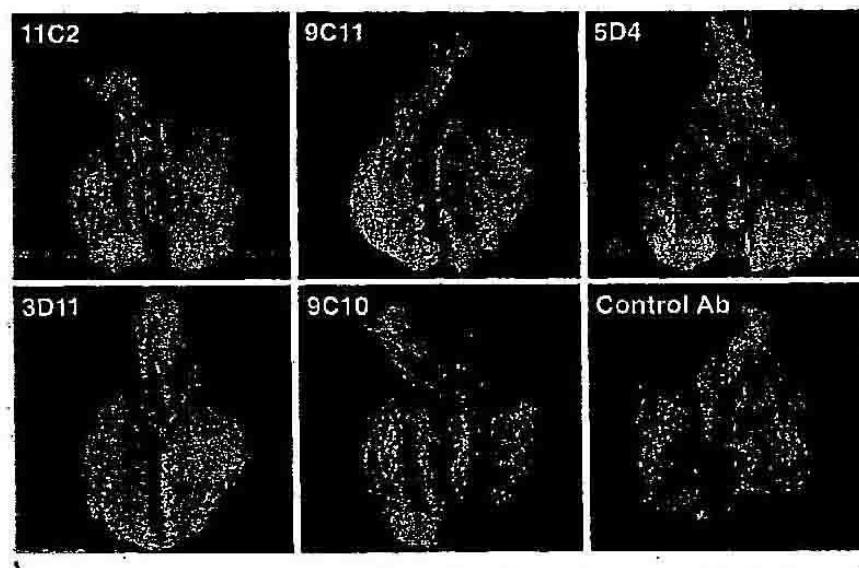
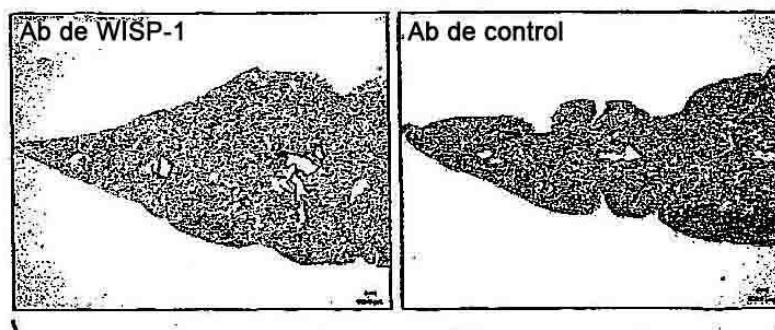


FIG. 14

**FIG.- 15****FIG.- 16A**

Caracterización de anticuerpos de WISP-1								
Clones	Isotipo	Epitope		IP	WB	Actividad de bloqueo		
		Estruct.	Competencia cruzada			Unión a heparina	Migración de células	Metástasis de pulmón
3D11	2b	Dominio 1	A	-	+	+/-	+	+
9C10	2b	Dominio 1	B	+	-	-	+	+
11C2	2b	Región variable	C	+	+	+	+	+
5D4	2a	Región variable	C	+	+	+	+	+
9C11	2a	Región variable	C	+	+	+	+	+

FIG._16B**FIG._17A****FIG._17B**

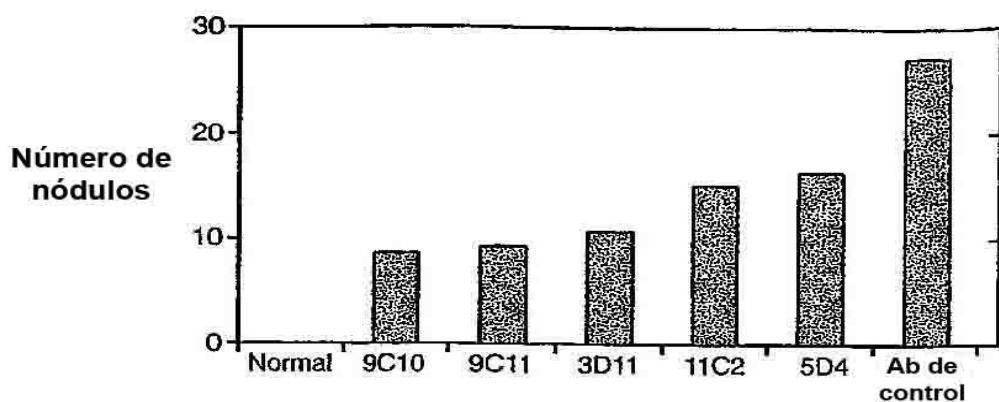


FIG.- 17C

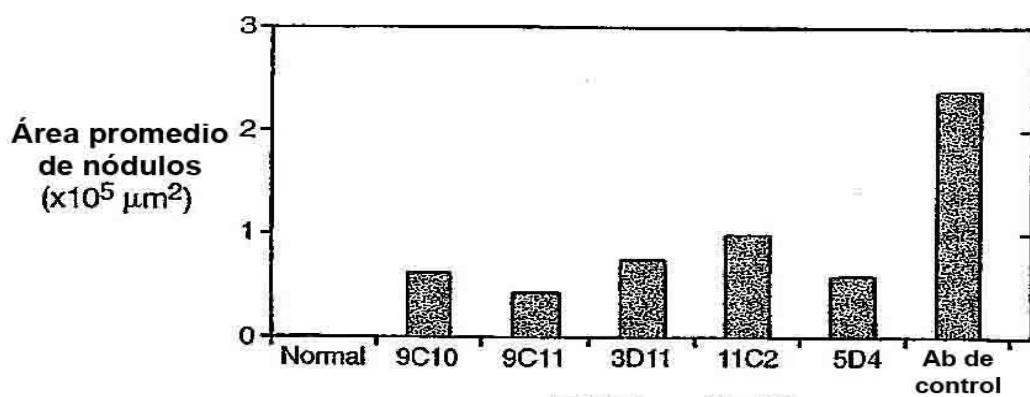


FIG.- 17D

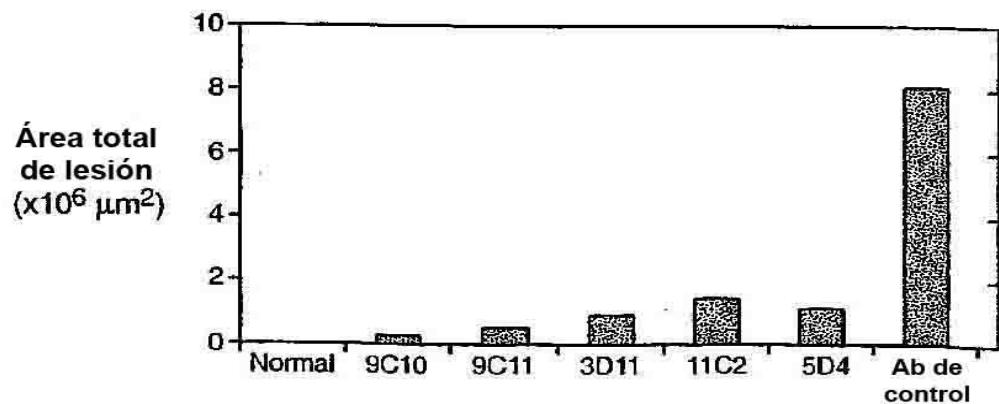


FIG.- 17E

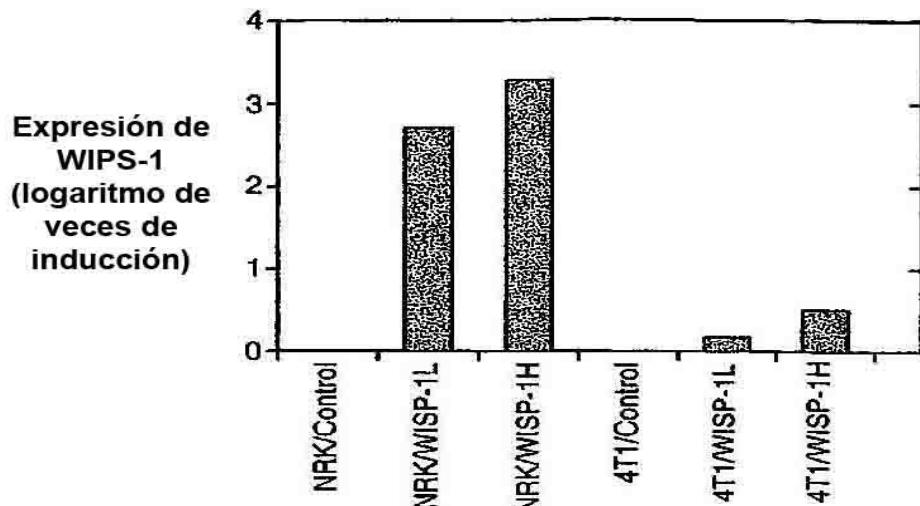


FIG._ 18

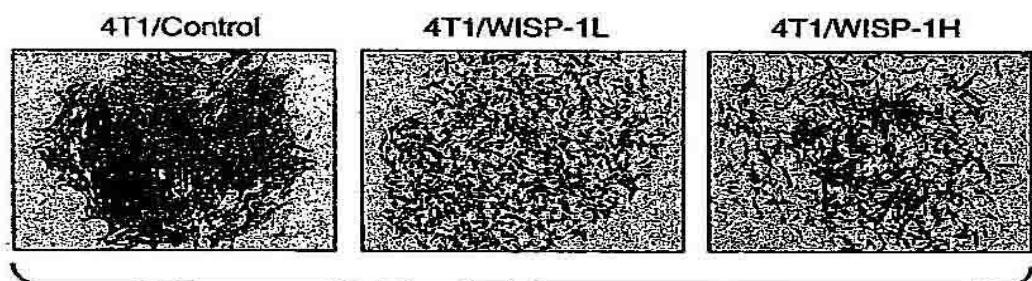


FIG._ 19

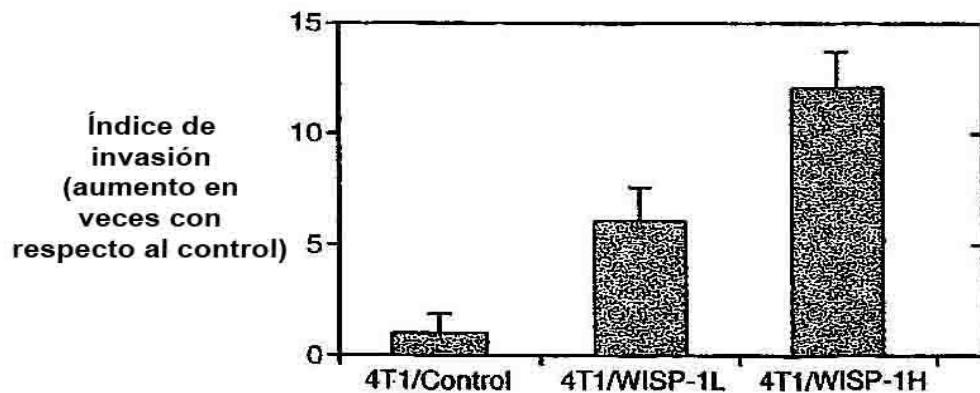


FIG._ 20

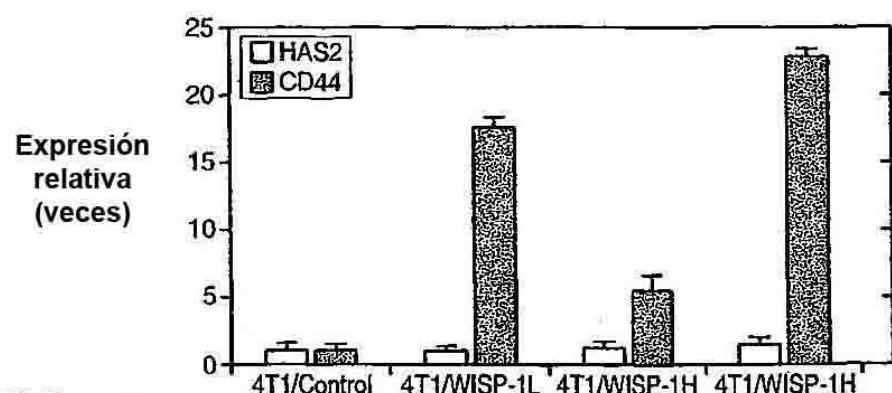
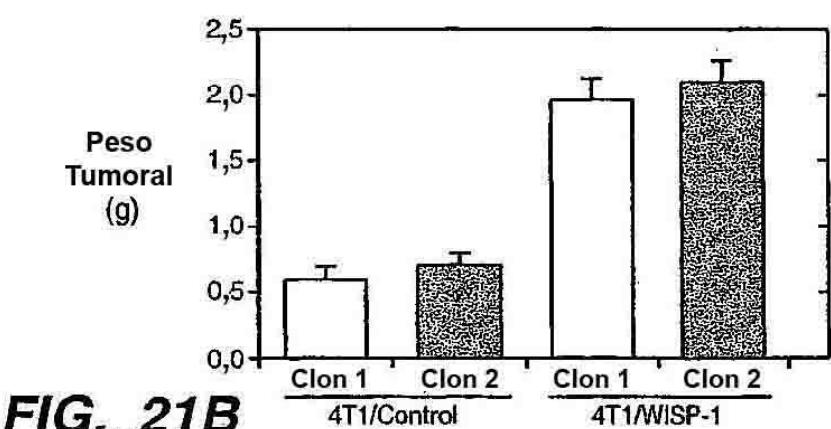
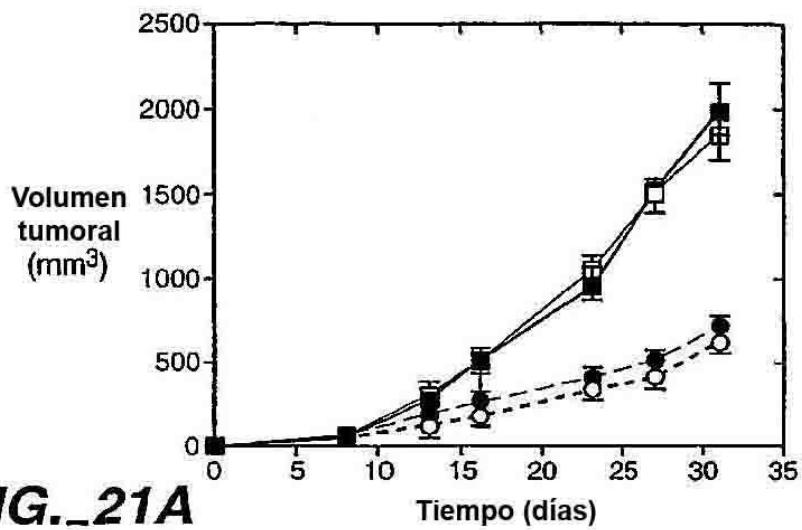


FIG._23A

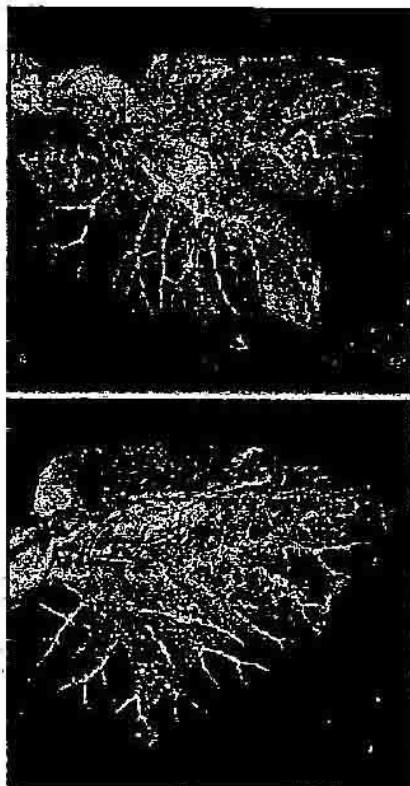


FIG._23B



FIG._23C

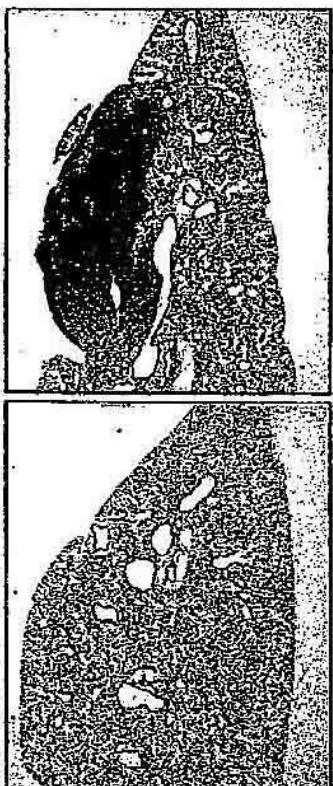


FIG._23D



FIG._23E



FIG._23F



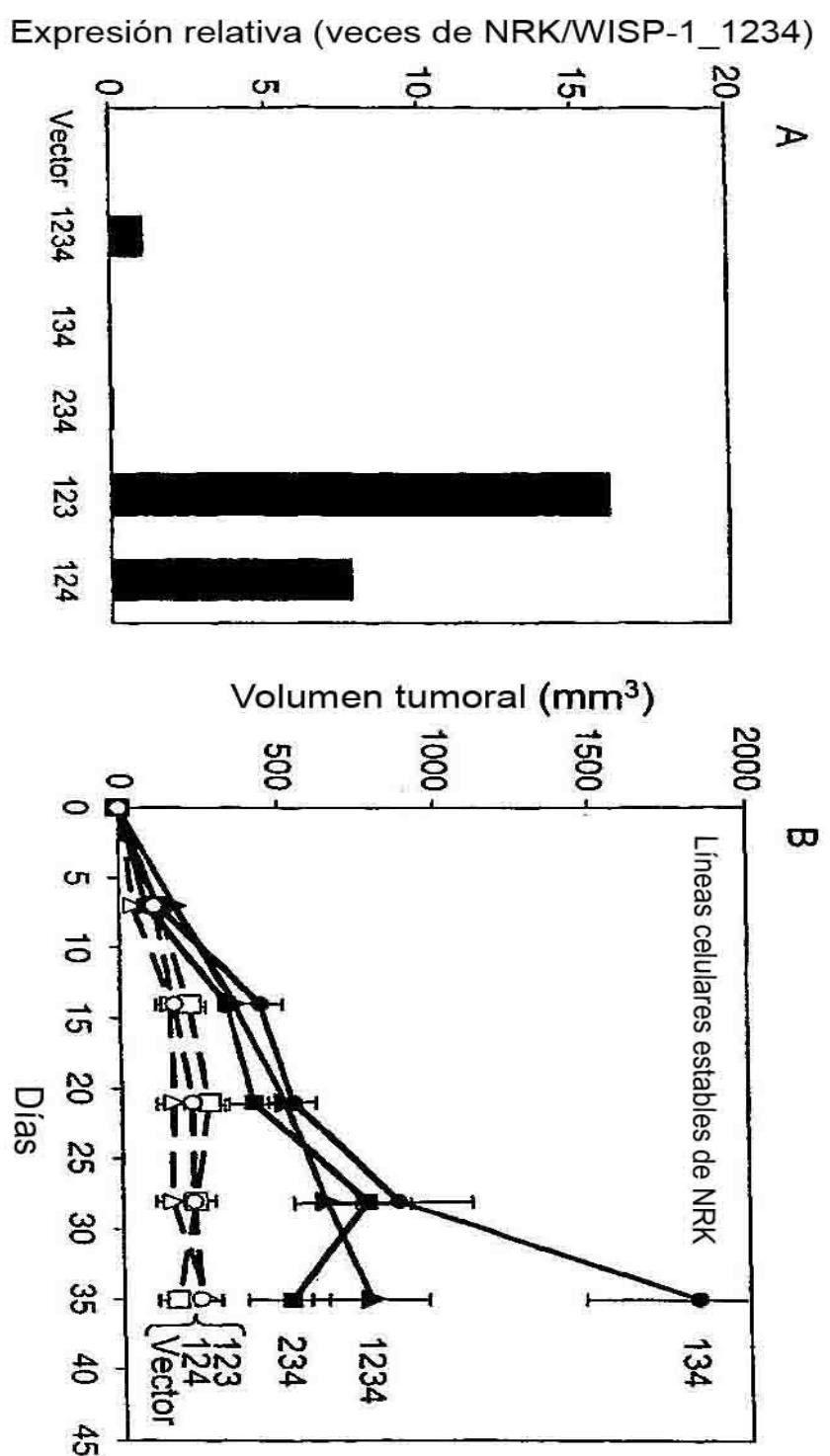


Figura 24

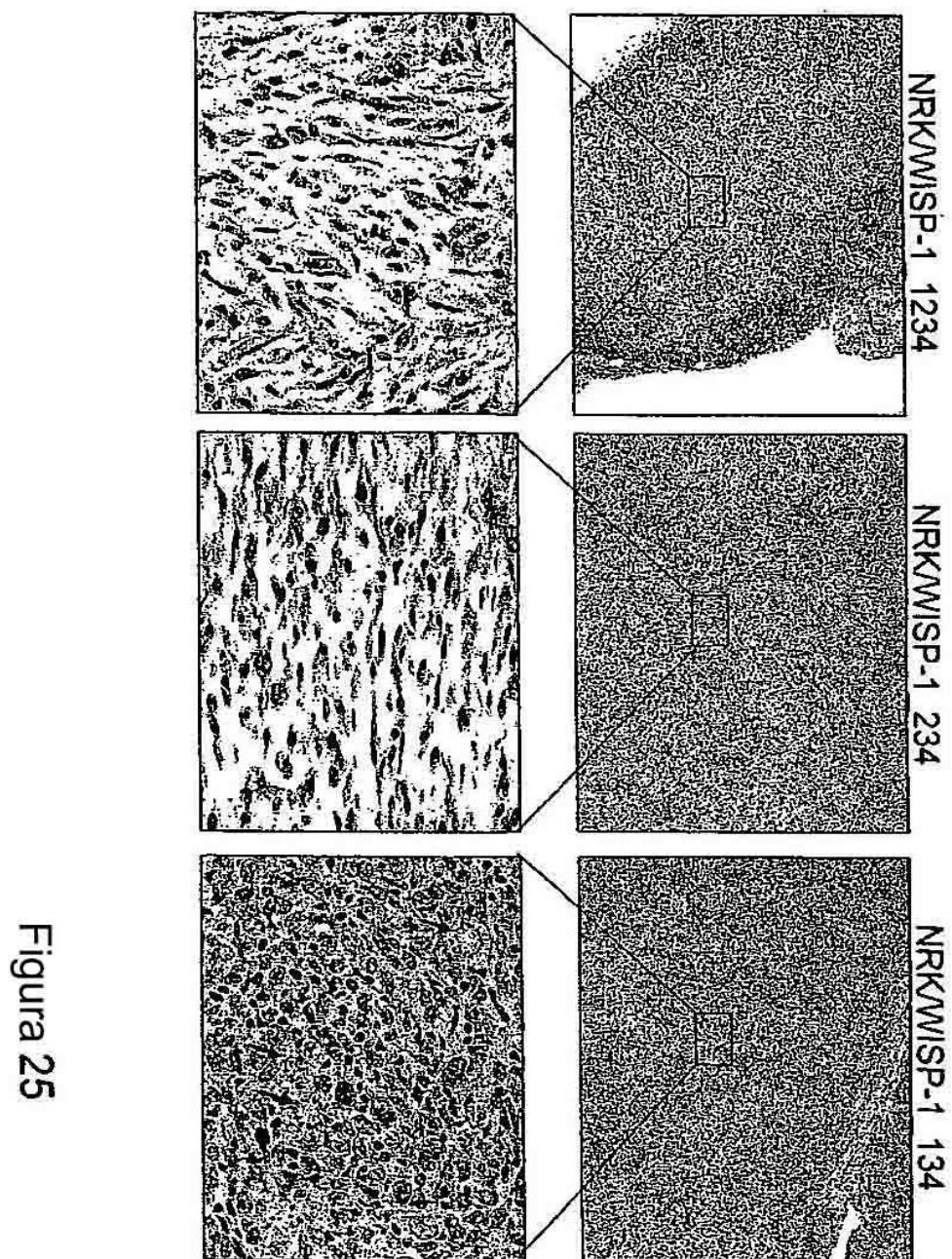


Figura 25

Invasión vascular en xenoinjerto de NRK/WISP-1_134

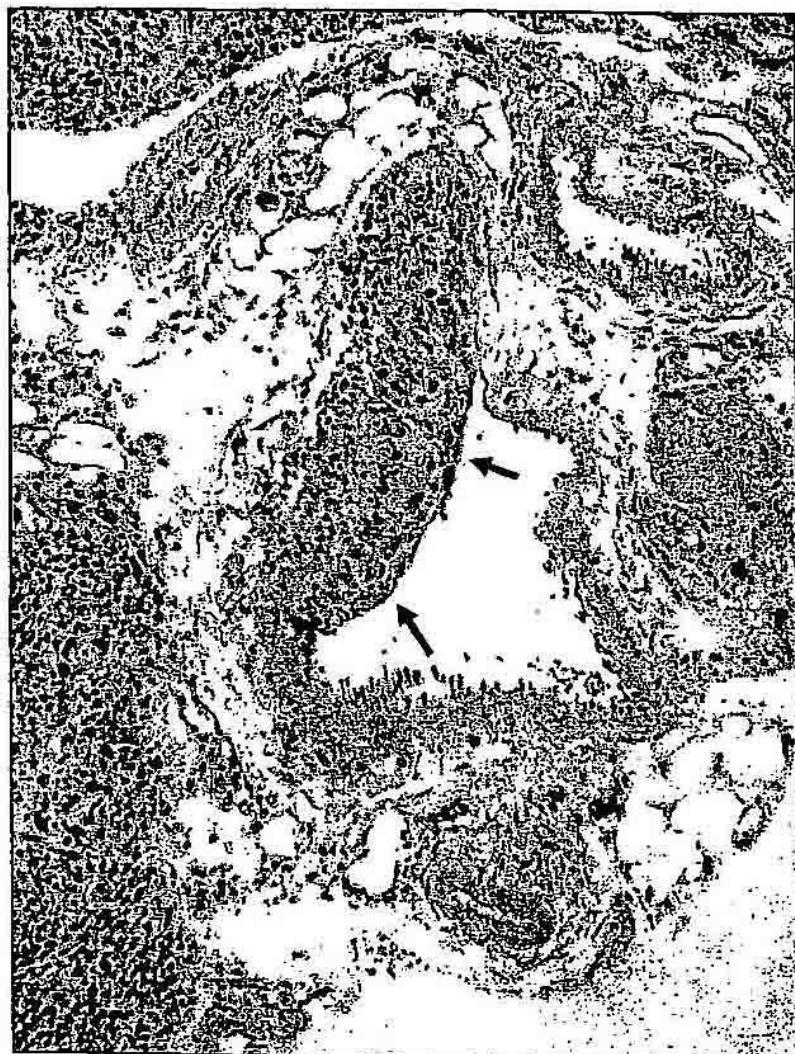
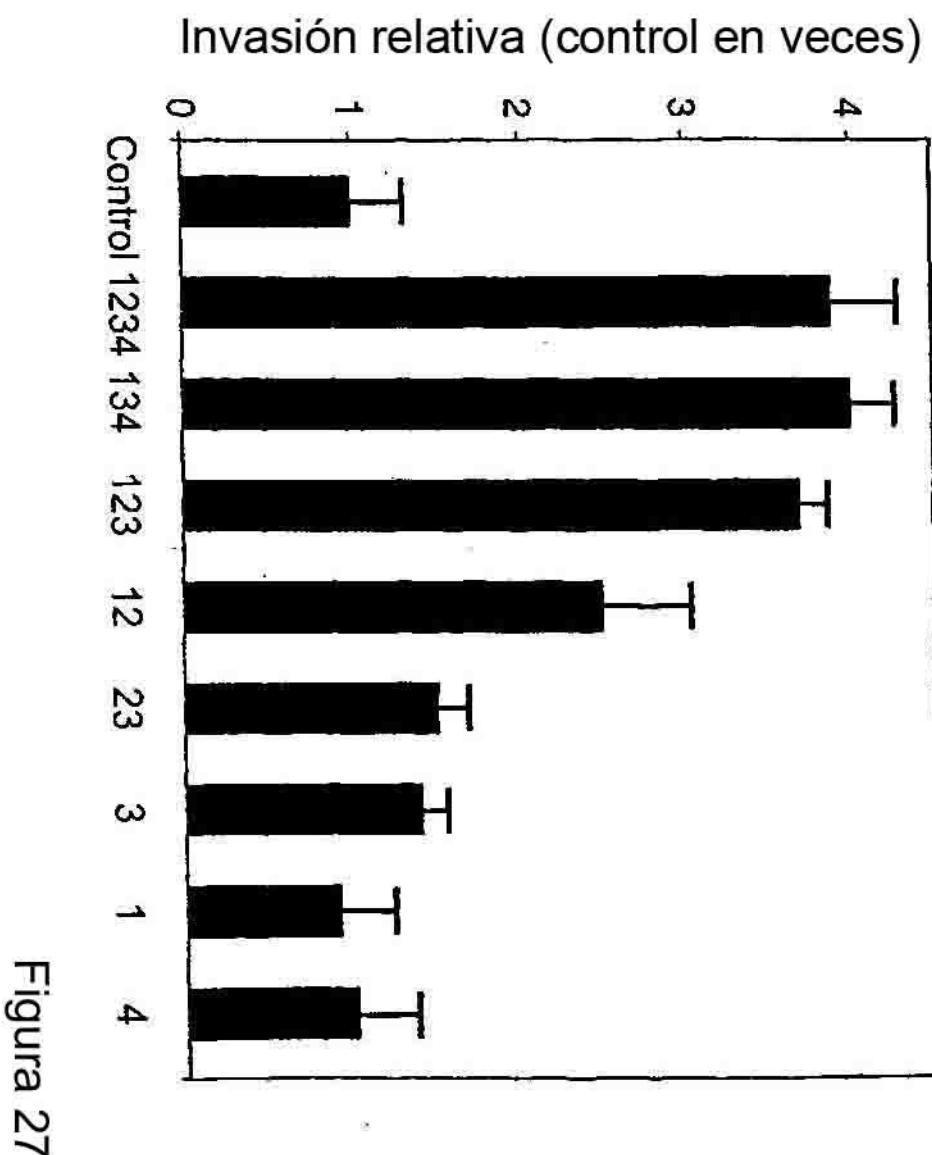


Figura 26



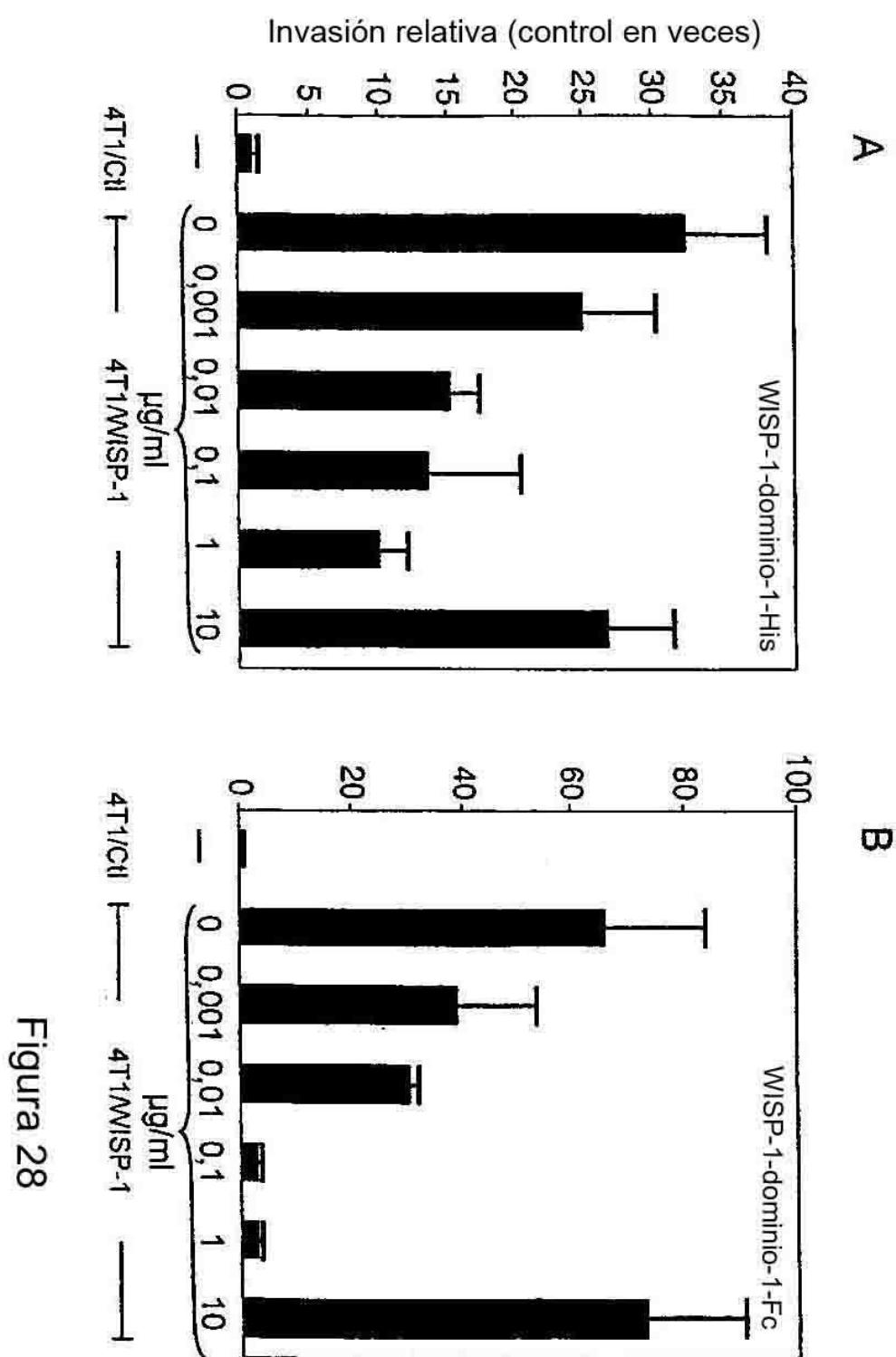
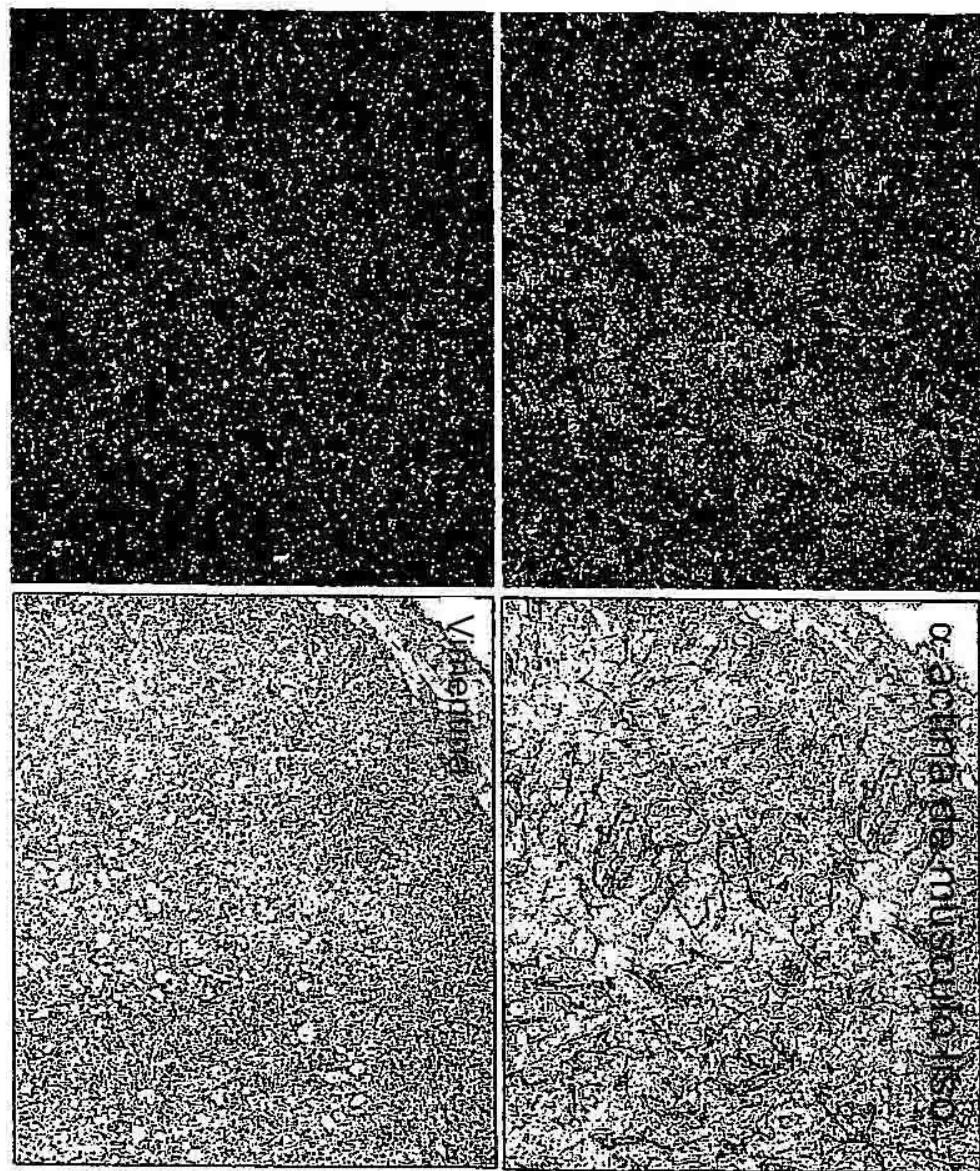


Figura 28

Figura 29



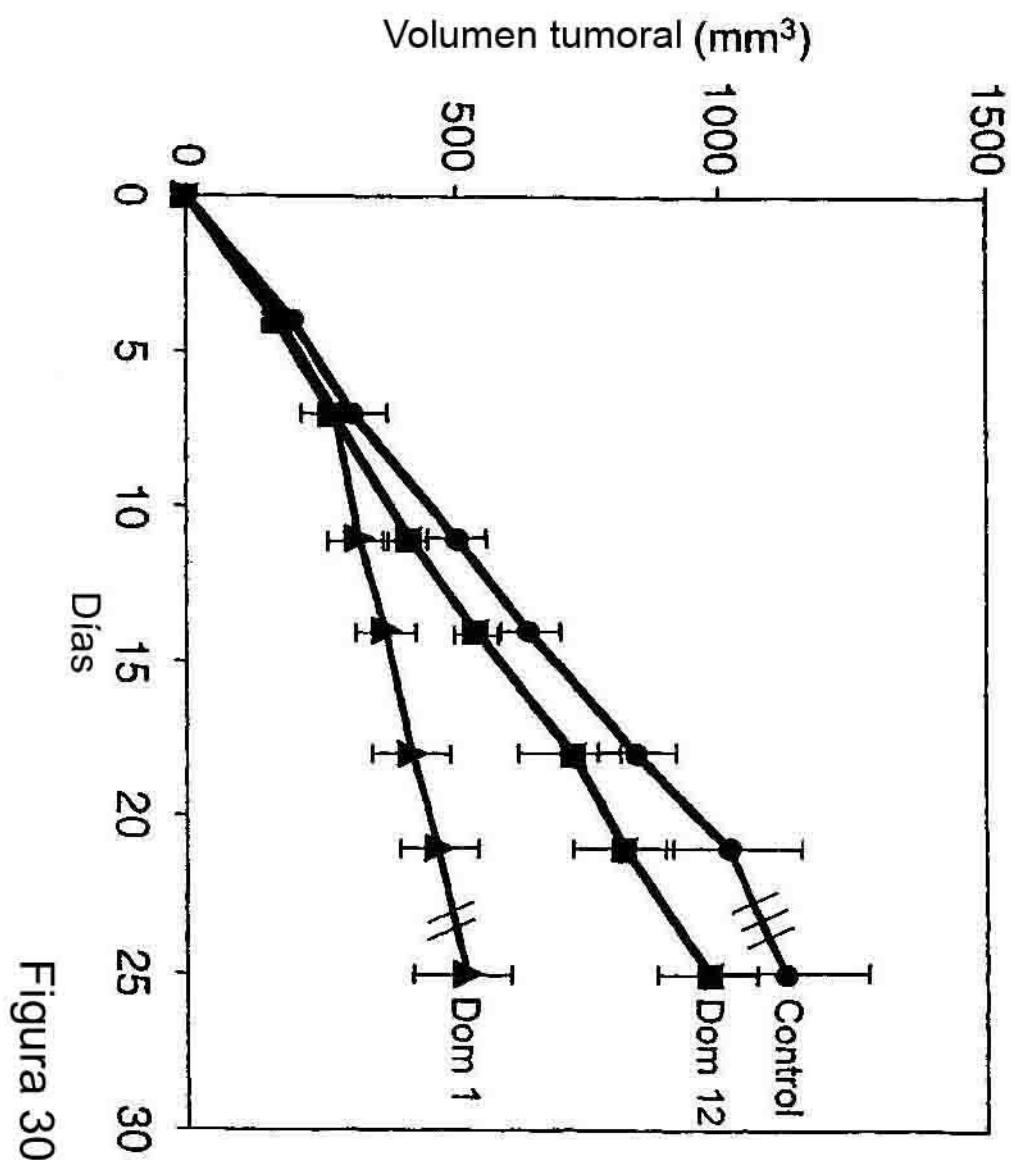


Figura 30

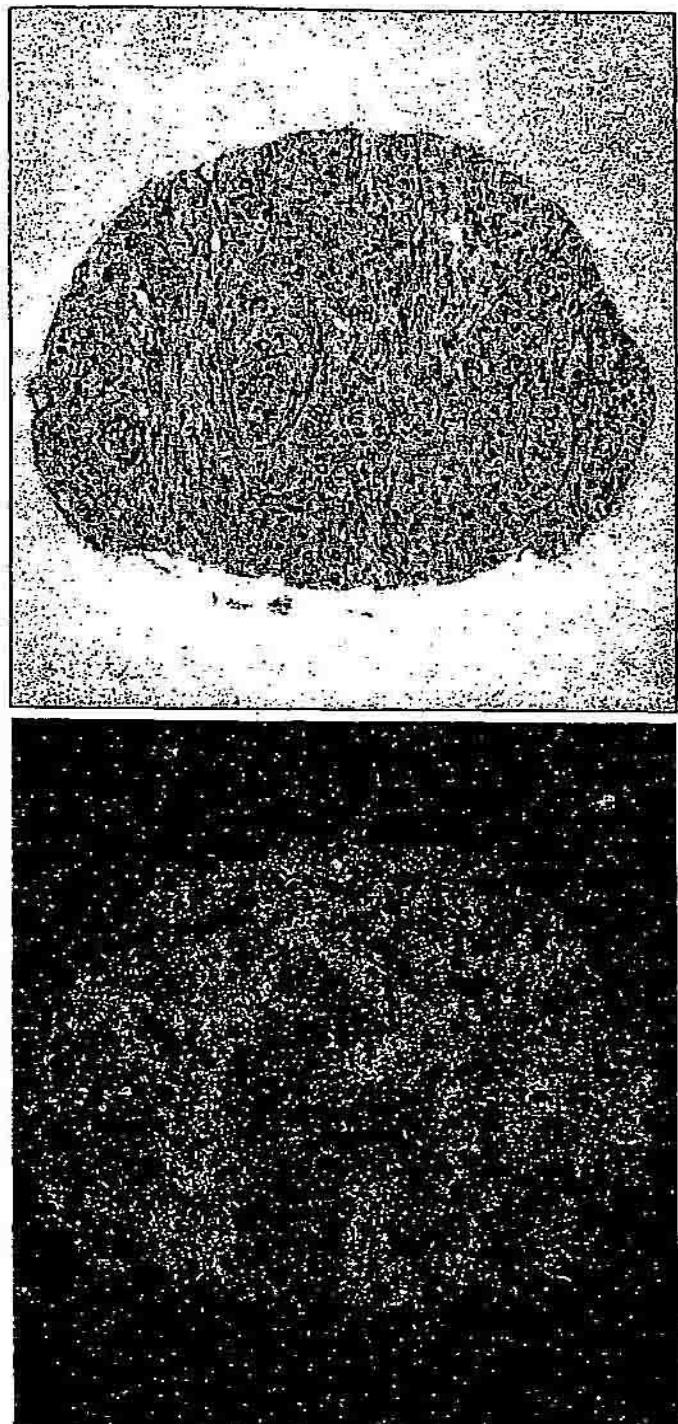
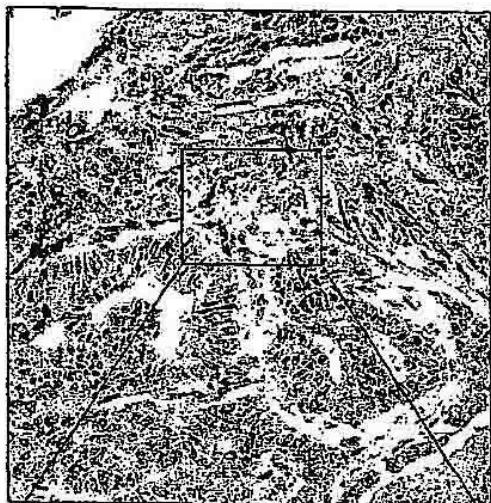


Figura 31

HP9278



HP9300

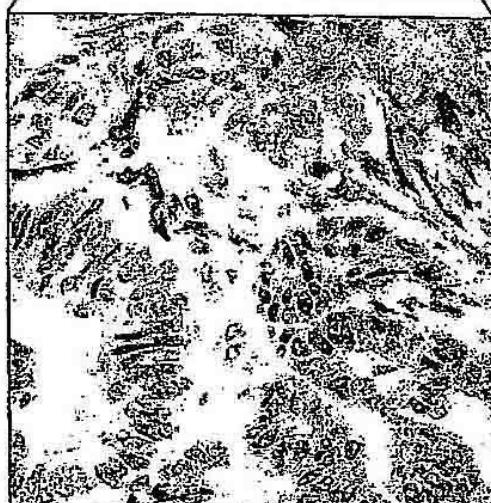


Figura 32