

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 808 529**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.01.2012** **PCT/US2012/020782**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.07.2012** **WO12096960**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.01.2012** **E 12734690 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020** **EP 2663333**

54 Título: **Inhibidor del factor de células madre**

30 Prioridad:

10.01.2011 US 201161431246 P

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

01.03.2021

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
MICHIGAN (100.0%)
1600 Huron Parkway 2nd Floor
Ann Arbor, Michigan 48109, US**

72 Inventor/es:

**LUKACS, NICHOLAS W.;
DOLGACHEV, VLADISLAV A.;
KUNKEL, STEVEN L.;
HOGABOAM, CORY M. y
PHAN, SEM H.**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 808 529 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

Inhibidor del factor de células madre

La presente solicitud reivindica la prioridad a la Solicitud de Patente de EE. UU. con el Número de Serie 61/431.246 presentada el 10 de enero de 2011.

5 Declaración respecto a la investigación o desarrollo patrocinados de manera federal

La presente invención se hizo con la financiación del gobierno con el HL059178 adjudicado por los Institutos Nacionales de Salud. El Gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

Campo de la invención

10 Se proporcionan en el presente documento procedimientos, composiciones, y usos relativos a los inhibidores del factor de células madre. Por ejemplo, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que se dirigen contra el factor de células madre y procedimientos para el tratamiento de las enfermedades fibróticas.

Antecedentes

15 Las enfermedades que implican la remodelación y fibrosis son una causa principal de muerte en todo el mundo. Casi el 45 por ciento de todas las muertes naturales en el mundo occidental se atribuyen a algún tipo de enfermedad crónica fibroproliferativa y los costes sanitarios asociados son de miles de millones de dólares. La remodelación tisular es la reorganización o renovación de tejidos existentes, que puede cambiar las características de un tejido (por ejemplo, remodelación de vasos sanguíneos) o participa en el establecimiento del equilibrio dinámico de un tejido (por ejemplo, la remodelación ósea). La fibrosis es la formación o desarrollo de un tejido conjuntivo excesivamente fibroso en un órgano o tejido como un proceso reactivo o reparador, al contrario que la formación de tejido fibroso como

20 constituyente normal de un órgano o tejido. La fibrosis afecta a casi todos los tejidos y sistemas orgánicos, y la remodelación tisular fibrótica puede tener influencia sobre la metástasis cancerosa y acelerar el rechazo crónico de injertos en receptores de trasplantes. Las enfermedades en las que la fibrosis es la causa principal de morbilidad y mortalidad incluyen las enfermedades pulmonares intersticiales, cirrosis hepática, enfermedad renal, enfermedad cardíaca, y esclerosis sistémica, entre otros.

25 El factor de células madre (SCF) y su receptor c-Kit se han implicado en las enfermedades de remodelación tisular y fibrótica (El-Koraie, y col., Kidney Int. 60: 167 (2001); Powell, y col., Am. J. Physiol. 289: G2 (2005); El Kossi, y col., Am. J. Kidney Dis. 41: 785 (2003); Powell, y col., Am. J. Physiol. 277: C183 (1999)). El c-Kit es un receptor tirosina cinasa tipo III que está presente en muchos tipos celulares (Orr-Urtreger y col., Development 109: 911 (1990)). También se expresa en los estadios tempranos de diferenciación (Andre y col., Oncogene 4: 1047 (1989)) y ciertos tumores presentan una expresión elevada de c-kit. El SCF es un receptor cinasa específico para el c-Kit. La unión produce la dimerización del c-Kit y la activación de su actividad cinasa. El SCF se aisló por primera vez en el sobrenadante de fibroblastos murinos. En aquel tiempo, el SCF se llamó factor de crecimiento de mastocitos (MCF) (Williams y col., Cell 63: 167 (1990)) o factor de crecimiento hematopoyético KL (ligando Kit) (Huang y col., Cell 63: 225 (1990)). Posteriormente se aisló un homólogo de las células hepáticas de rata y se denominó factor de células

30 madre (SCF) (Zsebo y col., Cell 63: 195 (1990)). La proteína humana correspondientes se denomina de manera variable SCF, MGF o Factor Steel (SF) (Cell 63: 203 (1990)).

35 Los estudios anteriores sugerían que un inhibidor del receptor tirosina cinasa c-Kit podía inhibir significativamente la fibrosis tisular aberrante (véase, por ejemplo, Aono, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 171: 1279 (2005); Vuorinen, y col., Exp. Lung Res. 33: 357 (2007); Vittal, y col., J. Pharmacol. Exp. Ther. 321: 35 (2007); Distler, y col., Arthritis Rheum 56: 311 (2007)). Sin embargo, este inhibidor tiene varias desventajas. Necesita que se administre sistémicamente mediante administración oral, tiene algo de toxicidad asociada con su uso, y el compuesto se debe suministrar intracelularmente para que sea eficaz. En consecuencia, se necesitan terapias alternativas.

Sumario

45 La presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal o un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno que se une específicamente al péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En realizaciones adicionales se proporciona un anticuerpo monoclonal o un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno de acuerdo con la invención para su uso como un medicamento. En realizaciones adicionales se proporciona un anticuerpo monoclonal o un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad fibrótica en un sujeto, en el que la enfermedad fibrótica se selecciona de entre fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, síndrome de dificultad respiratoria aguda, fibrosis quística, fibrosis peribronquial, neumonitis por hipersensibilidad, asma, escleroderma, inflamación, cirrosis hepática, fibrosis renal, fibrosis parenquimatosa, fibrosis endomiocárdica, fibrosis mediastínica, fibrosis retiniana, fibrosis nodular subepidérmica, histiocitoma fibroso, fibrotórax, fibrosis hepática, fibromialgia, fibrosis gingival, o fibrosis inducida por radiación.

55 La divulgación proporciona además procedimientos, composiciones, y usos relativos a los inhibidores del factor de

células madre. Por ejemplo, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que se dirigen contra el factor de células madre y procedimientos para el tratamiento de las enfermedades de remodelación tisular y fibróticas, así como para usos diagnósticos y de investigación.

En algunos aspectos, las composiciones, procedimientos y usos del presente documento proporcionan terapias relativas a la inhibición del factor de células madre (SCF). Algunos aspectos proporcionan un anticuerpo aislado que se dirige contra el SCF. En algunos aspectos, la inhibición del SCF afecta a la actividad de c-Kit. Las composiciones, procedimientos, y usos desvelados en el presente documento son útiles en el tratamiento de enfermedades fibróticas y enfermedades asociadas con la remodelación tisular. A diferencia de otras terapias que producen efectos secundarios indeseables debido a la interferencia con las rutas generales de señalización intracelular, los aspectos desvelados en el presente documento eliminan o minimizan dichos efectos secundarios modulando la actividad del SCF. En consecuencia, se minimiza la toxicidad. Además, al dirigirse a un ligando extracelular se elimina la necesidad de suministrar una composición dentro de la célula para que interactúe con una diana intracelular. En algunos aspectos, las composiciones se suministran por las vías respiratorias, proporcionando de esta manera una ventaja sobre las tecnologías anteriores que necesitaban la administración oral y, por lo tanto, dando como resultado una biodisponibilidad sistémica.

En algunos aspectos, se desvelan en el presente documento procedimientos que comprenden la provisión de un inhibidor del factor de células madre y la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz del inhibidor a un sujeto. En algunos aspectos, el inhibidor es un anticuerpo aislado o un fragmento de unión al antígeno del mismo (por ejemplo, fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv, etc.). En algunos aspectos el inhibidor es un ARN de interferencia pequeño. En aspectos más específicos, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal. Algunos aspectos desvelan que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se une específicamente al factor de células madre. Algunas realizaciones proporcionan que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se une específicamente a un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Algunos aspectos proporcionan que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se une específicamente a un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8.

En algunas realizaciones de los procedimientos proporcionados en el presente documento, el sujeto tiene una enfermedad. En consecuencia, algunas realizaciones proporcionan que la administración del inhibidor evita o reduce la gravedad de al menos un signo o síntoma de la enfermedad. En algunas realizaciones, el sujeto tiene una actividad anormal del factor de células madre o el sujeto tiene una producción anormal de colágeno. En algunas realizaciones, el sujeto tiene fibrosis. En algunos aspectos de la divulgación, el sujeto tiene una enfermedad que incluye, pero no se limita a, una enfermedad de remodelación. En realizaciones adicionales, la enfermedad es una enfermedad pulmonar. Algunas realizaciones proporcionan que un sujeto tiene una enfermedad pulmonar que incluye, pero no se limita a, fibrosis pulmonar idiopática, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, síndrome de dificultad respiratoria aguda, fibrosis quística, fibrosis peribronquial, neumonitis por hipersensibilidad, o asma. Además, algunas realizaciones proporcionan que un sujeto tiene una enfermedad que incluye, pero no se limita a, escleroderma, inflamación, cirrosis hepática, fibrosis renal, fibrosis parenquimatosa, fibrosis endomiocárdica, fibrosis mediastínica, fibrosis nodular subepidérmica, histiocitoma fibroso, fibrotórax, fibrosis hepática, fibromialgia, fibrosis gingival, o fibrosis inducida por radiación.

Aunque no se limita el modo de administración, en algunas realizaciones del procedimiento, el anticuerpo se suministra por las vías respiratorias del sujeto, por ejemplo, mediante administración intranasal.

En algunas realizaciones, la administración del inhibidor reduce la actividad de un receptor. Algunas realizaciones proporcionan que la administración del inhibidor reduce una interacción del factor de células madre con un receptor. En realizaciones más específicas, el receptor es un receptor tirosina cinasa, y en realizaciones más específicas, el receptor es c-Kit. De manera importante, los procedimientos no están limitados en la localización del receptor direccionado o el origen del factor de células madre. Por ejemplo, en algunas realizaciones el receptor se encuentra en una célula progenitora hematopoyética, un melanocito, una célula germinal, un eosinófilo, un linfocito, un fibroblasto, un miofibroblasto, o un mastocito. De manera adicional, en algunas realizaciones, el factor de células madre se origina en una célula de la médula ósea, una célula hepática, una célula epitelial, una célula de músculo liso, o un fibroblasto. En algunas realizaciones, la administración del inhibidor a un sujeto da como resultado la inhibición directa de la activación de fibroblastos.

Algunas realizaciones proporcionan una composición que comprende un anticuerpo aislado o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente al factor de células madre (por ejemplo, una proteína o un fragmento peptídico de la misma (por ejemplo, un epítipo)). Por ejemplo, algunas realizaciones proporcionan una composición que comprende un anticuerpo aislado o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a un péptido con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1. Aspectos adicionales de la divulgación proporcionan un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une al precursor de la isoforma b del SCF (por ejemplo, una proteína o fragmento peptídico de la misma de la secuencia disponible con el número de referencia del GenBank NP_000890 (SEQ ID NO: 4)), o una variante o forma modificada del mismo, o a un precursor de la isoforma a del SCF (por ejemplo, una proteína o fragmento peptídico de la secuencia disponible con el número de referencia del GenBank NP_003985 (SEQ ID NO: 6)), o una variante o forma modificada del mismo. Algunas realizaciones proporcionan un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que se une a una proteína o péptido, o

variantes o formas modificadas de los mismos, que sean un producto de traducción de la Secuencia Genética de Referencia del NCBI para el SCF (por ejemplo, el número de referencia NG_012098 (SEQ ID NO: 7)) o variantes o fragmentos de los mismos. Algunos aspectos de la divulgación proporcionan un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une a un péptido que comprende los primeros 11 aminoácidos de la forma madura del SCF (por ejemplo, EGICRNRVTNN (SEQ ID NO: 8)).

Algunos aspectos de la divulgación proporcionan un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que se une al producto de traducción (por ejemplo, una proteína o péptido), o una variante o forma modificada del mismo, de un ácido nucleico que codifica el SCF o una variante o forma modificada del mismo. Por ejemplo, hay aspectos que proporcionan un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que se une al producto de traducción (por ejemplo, una proteína o péptido), o una variante o forma modificada del mismo, de los ácidos nucleicos que tienen secuencias que comprenden una secuencia como se define en los números de referencia de GenBank NM_000899 (SEQ ID NO: 3), NM_003994 (SEQ ID NO: 5) y NG_012098 (SEQ ID NO: 7), o fragmentos o variantes de los mismos (por ejemplo, mutantes, los ADNc, variantes de expresión optimizada, unidos operativamente a un elemento regulador (por ejemplo, un promotor, amplificador, sitio de unión a la polimerasa, etc.), etc.). En algunos aspectos, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se une a una proteína o péptido, o una variante o forma modificada de los mismos, que es el producto de traducción de una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia peptídica EGICRNRVTNN (SEQ ID NO: 8). Los péptidos y proteínas (y los fragmentos y variantes de los mismos) y los ácidos nucleicos (y los fragmentos y variantes de los mismos) que codifican los péptidos y proteínas (y los fragmentos y variantes de los mismos) se utilizan en algunos aspectos para producir anticuerpos. También se contemplan vectores, plásmidos, construcciones de expresión, células, líneas celulares, hibridomas, y organismos que se utilizan para producir los anticuerpos como se proporcionan en el presente documento.

Algunas realizaciones proporcionan un anticuerpo monoclonal y algunas realizaciones proporcionan un anticuerpo humanizado. En algunas realizaciones, la composición se utiliza para un medicamento o se utiliza para la fabricación de un medicamento. En algunas realizaciones, el medicamento se utiliza para tratar una enfermedad. El uso de la composición como un medicamento no está limitado en cuanto a la enfermedad que se puede tratar. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la enfermedad es fibrosis pulmonar idiopática, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, síndrome de dificultad respiratoria aguda, fibrosis quística, fibrosis peribronquial, neumonitis por hipersensibilidad, asma, escleroderma, inflamación, cirrosis hepática, fibrosis renal, fibrosis parenquimatosa, fibrosis endomiocárdica, fibrosis mediastínica, fibrosis nodular subepidérmica, histiocitoma fibroso, fibrotórax, fibrosis hepática, fibromialgia, fibrosis gingival, o fibrosis inducida por radiación. En algunas realizaciones, la composición se utiliza para estudiar la enfermedad *in vitro* o en un sistema modelo (por ejemplo, *in vivo*).

Las realizaciones proporcionan en el presente documento un procedimiento de preparación de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) que se dirige contra el factor de células madre que comprende las etapas de provisión de un péptido que comprende o consiste en una parte inmunogénica del SCF (como se proporciona mediante la SEQ ID NO: 1), la inmunización de un huésped con el péptido, el aislamiento de una célula inmunitaria del huésped, la preparación de un hibridoma utilizando la célula inmunitaria, y el aislamiento del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo. Algunas realizaciones proporcionan un procedimiento de preparación de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) que se dirige contra el factor de células madre, en el que el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se une específicamente al factor de células madre (por ejemplo, una proteína o un fragmento peptídico de la misma (por ejemplo, un epítipo)). Por ejemplo, algunas realizaciones proporcionan un procedimiento de preparación de un anticuerpo aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a un péptido con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1. Aspectos adicionales de la divulgación proporcionan un procedimiento de preparación de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une al precursor de la isoforma b del SCF (por ejemplo, una proteína o fragmento peptídico de la misma de la secuencia disponible con el número de referencia del GenBank NP_000890 (SEQ ID NO: 4)), o una variante o forma modificada del mismo, o a un precursor de la isoforma a del SCF (por ejemplo, una proteína o fragmento peptídico de la secuencia disponible con el número de referencia del GenBank NP_003985 (SEQ ID NO: 6)), o una variante o forma modificada del mismo. Algunos aspectos de la divulgación proporcionan un procedimiento de preparación de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une a una proteína o péptido, o variantes o formas modificadas de los mismos, que sean un producto de traducción de la Secuencia Genética de Referencia del NCBI para el SCF (por ejemplo, el número de referencia NG_012098 (SEQ ID NO: 7)) o variantes o fragmentos de los mismos. Algunos aspectos de la divulgación proporcionan un procedimiento de preparación de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une a un péptido que comprende los primeros 11 aminoácidos de la forma madura del SCF (por ejemplo, EGICRNRVTNN (SEQ ID NO: 8)).

Algunos aspectos proporcionan un procedimiento de preparación de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que se une al producto de traducción (por ejemplo, una proteína o péptido), o una variante o forma modificada del mismo, de un ácido nucleico que codifica el SCF o una variante o forma modificada del mismo. Por ejemplo, hay aspectos que proporcionan un procedimiento de preparación de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que se une al producto de traducción (por ejemplo, una proteína o péptido), o una variante o forma modificada del mismo, de los ácidos nucleicos que tienen secuencias que comprenden una secuencia como se define en los números de referencia de GenBank NM_000899 (SEQ ID NO: 3), NM_003994 (SEQ ID NO: 5) y NG_012098 (SEQ ID NO: 7), o fragmentos o variantes de los mismos (por ejemplo, mutantes, los ADNc, variantes de expresión optimizada, unidos operativamente a un elemento regulador (por ejemplo, un promotor, amplificador, sitio de unión a la polimerasa, etc.)),

etc.). En algunos aspectos, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se une a una proteína o péptido, o una variante o forma modificada de los mismos, que es el producto de traducción de una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia peptídica EGICRNRVTNN (SEQ ID NO: 8). Los péptidos, proteínas, y los fragmentos y variantes de los mismos; y los ácidos nucleicos, y fragmentos y variantes de los mismos, que codifican los péptidos, proteínas, y los fragmentos y variantes de los mismos, son útiles en algunas realizaciones de un procedimiento de preparación de anticuerpos como se proporciona mediante la tecnología proporcionada. También se contemplan procedimientos de producción de vectores, plásmidos, construcciones de expresión, células, líneas celulares, hibridomas, y organismos que son útiles en la producción de los anticuerpos como se proporcionan en el presente documento.

- 10 Algunas realizaciones proporcionan un procedimiento que comprende las etapas de proporcionar un inhibidor del factor de células madre y la administración del inhibidor a una célula o tejido.

Además, algunas realizaciones proporcionan un kit que comprende una composición que comprende un anticuerpo aislado o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente al factor de células madre, un medio para la administración de la composición a un sujeto, y/o instrucciones para su uso.

- 15 Las realizaciones adicionales serán evidentes para los expertos en la técnica relevante basándose en las enseñanzas contenidas en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

Estas y otras características, aspectos, y ventajas de la presente tecnología llegarán a entenderse mejor con la observación de los siguientes dibujos:

- 20 La **Figura 1** muestra una serie de gráficos que demuestran que la inhibición del SCF con un anticuerpo reduce la expresión de los mediadores de remodelación tisular. La Figura 1A muestra un gráfico que demuestra que un anticuerpo anti-SDF reduce la cantidad de hidroxiprolina en el pulmón tratado con bleomicina; la Figura 1B muestra un gráfico que demuestra que un anticuerpo anti-SCF reduce la cantidad de ARNm de IL-25; la Figura 1C muestra un gráfico que demuestra que un anticuerpo anti-SCF reduce la cantidad de ARNm de IL-13; la Figura 1D muestra un gráfico que demuestra que un anticuerpo anti-SCF reduce la cantidad de SCF soluble presente en el plasma. 25 la Figura 1E muestra un gráfico que demuestra que un anticuerpo anti-SCF reduce la cantidad del receptor de la IL-25.
- La **Figura 2** muestra un gráfico que demuestra que la IL-4 estimula la expresión de c-kit en los fibroblastos humanos.
- 30 La **Figura 3** muestra una secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos correspondiente de un péptido inmunogénico utilizado para producir anticuerpos específicos de SCF.
- La **Figura 4** muestra un gráfico que demuestra que un anticuerpo monoclonal específico para el SCF inhibe la activación de las células del HCM-1 en cuanto a la producción de MCP-1.
- 35 La **Figura 5** muestra un gráfico que demuestra que se detecta una cantidad menor de hidroxiprolina en un ratón deficiente en la producción de SCF después de una lesión por bleomicina.

Descripción detallada

- Se desvelan en el presente documento procedimientos, composiciones, y usos relativos a los inhibidores del factor de células madre. Por ejemplo, se proporcionan en el presente documento anticuerpos que se dirigen contra el factor de células madre, procedimientos de producción de anticuerpos que se dirigen contra el factor de células madre, y procedimientos para tratar las enfermedades de remodelación tisular y fibróticas, así como para usos diagnósticos y de investigación. En algunas realizaciones, las composiciones, procedimientos y usos del presente documento proporcionan terapias relativas a la inhibición del factor de células madre (SCF). Algunas realizaciones proporcionan un anticuerpo aislado que se dirige contra el SCF. En algunas realizaciones, la inhibición del SCF afecta a la actividad de c-Kit. Las composiciones, procedimientos, y usos que se proporcionan en el presente documento son útiles en el 45 tratamiento de enfermedades fibróticas y enfermedades asociadas con la remodelación tisular.

Definiciones

Para facilitar el entendimiento de las realizaciones de la presente tecnología, se definen varios términos y frases a continuación. Se exponen definiciones adicionales a lo largo de la descripción detallada.

- 50 A lo largo de toda la memoria descriptiva y las reivindicaciones, los siguientes términos tienen los significados que se asocian explícitamente en el presente documento, a menos de que el contexto dicte claramente otra cosa. La frase "en una realización" como se utiliza en el presente documento no se refiere necesariamente a la misma realización, aunque puede ser. Además, la frase "en otra realización" como se utiliza en el presente documento no se refiere necesariamente a una realización diferente, aunque puede ser. Por lo tanto, como se describe posteriormente, se pueden combinar fácilmente distintas realizaciones de la invención, sin alejarse del ámbito o el espíritu de la invención.
- 55 Además, como se utiliza en el presente documento, el término "o" es un operador "o" incluyente y es equivalente al término "y/o" a menos de que el contexto dicte claramente otra cosa. La expresión "a base de" no es excluyente y

permite que sea a base de factores adicionales no descritos, a menos de que el contexto dicte claramente otra cosa. Además, a lo largo de la memoria descriptiva, el significado de "un", "una", y "el" incluye las referencias en plural. El significado de "en" incluye "en" y "sobre".

5 Los términos "proteína" y "polipéptido" se refieren a compuestos que comprenden aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos y se utilizan de manera intercambiable. Una "proteína" o "polipéptido" codificados por un gen no se limita a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen, sino que incluye las modificaciones tras la traducción de la proteína.

10 Cuando se menciona la expresión "secuencia de aminoácidos" en el presente documento para hacer referencia a una secuencia de aminoácidos de una molécula proteica, "secuencia de aminoácidos" y expresiones similares, tales como "polipéptido" o "proteína" no significan que limiten la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos completa, nativa asociada con la molécula proteica mencionada. Además, una "secuencia de aminoácidos" puede deducirse a partir de la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína.

15 El término "naciente" cuando se utiliza en referencia a una proteína se refiere a una proteína sintetizada recientemente, que no se ha sometido a modificaciones tras la traducción, que incluyen, pero no se limitan a glicosilación y acortamiento del polipéptido. El término "madura" cuando se utiliza en referencia a una proteína se refiere a una proteína que se ha sometido a un procesamiento tras la traducción y/o que está en una localización celular (tal como dentro de una membrana o un complejo multimolecular) desde la cual puede llevar a cabo una función particular que no podría si no estuviera en esa localización.

20 El término "parte" cuando se utiliza en referencia a una proteína (como en "una parte de una proteína determinada") se refiere a un fragmento de esa proteína. Los fragmentos pueden variar en tamaño desde cuatro restos de aminoácido hasta la secuencia de aminoácidos completa menos un aminoácido (por ejemplo, la variación de tamaño incluye 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, u 11... aminoácidos hasta la secuencia de aminoácidos completa menos un aminoácido).

25 El término "homólogo" u "homólogo" cuando se utiliza en referencia a un polipéptido se refiere a un alto grado de identidad de secuencia entre dos polipéptidos, o a un alto grado de similitud entre la estructura tridimensional o a un alto grado de similitud entre el sitio activo y el mecanismo de acción. En una realización preferida, un homólogo tiene más de un 60% de identidad de secuencia, y más preferentemente más de un 75% de identidad de secuencia, y más preferentemente aún, más del 90% de identidad de secuencia, con una secuencia de referencia.

30 Los términos "variante" y "mutante" cuando se utilizan en referencia a un polipéptido se refieren a una secuencia de aminoácidos que se diferencia en uno o más aminoácidos de otro polipéptido, habitualmente relacionado. La variante puede tener cambios "conservadores", en los que un aminoácido que se sustituye tiene propiedades estructurales o químicas similares. Un tipo de sustituciones de aminoácidos conservadoras se refieren al intercambio de restos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas hidroxiladas es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina, y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina, e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Los grupos preferidos de sustitución conservadora de aminoácidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, y asparagina-glutamina. De manera más rara, una variante puede tener cambios "no conservadores" (por ejemplo, sustitución de una glicina con un triptófano). Las variaciones menores similares también pueden incluir eliminaciones o inserciones de aminoácidos (es decir, adiciones) o ambas. La guía de determinación de cuáles y cuántos restos de aminoácidos se pueden sustituir, insertar o eliminar sin anular la actividad biológica se puede encontrar utilizando programas de computadora bien conocidos en la técnica, por ejemplo, el software DNASTar. Las variantes se pueden ensayar en ensayos funcionales. Las variantes preferidas tienen menos de un 10%, y preferentemente menos de un 5%, y más preferentemente aún menos del 2% de cambios (sean sustituciones, eliminaciones, y demás).

50 El término "dominio" cuando se utiliza en referencia a un polipéptido se refiere a una subsección del polipéptido que posee una única característica estructural y/o funcional; normalmente, esta característica es similar a través de diversos polipéptidos. La subsección comprende normalmente aminoácidos contiguos, aunque también puede comprender aminoácidos que actúan en concierto o que están en estrecha proximidad debido al plegamiento u otras configuraciones. Ejemplos de un dominio proteico incluyen los dominios transmembrana, y los sitios de glicosilación.

55 El término "gen" se refiere a una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, un ADN o ARN) que comprende secuencias codificantes necesarias para la producción de un ARN o un polipéptido o su precursor (por ejemplo, la proinsulina). Un polipéptido funcional puede ser codificado por una secuencia codificante de longitud completa o mediante cualquier parte de la secuencia codificante a condición de que mantenga la actividad deseada o las propiedades funcionales (por ejemplo, actividad enzimática, unión a ligandos, transducción de señales, etc.) del polipéptido. El término "parte" cuando se utiliza en referencia a un gen se refiere a fragmentos de ese gen. Los fragmentos pueden variar de tamaño desde pocos nucleótidos a la secuencia genética completa menos un nucleótido. Por lo tanto, "un nucleótido que comprende al menos una parte de un gen" puede comprender fragmentos del gen o el gen completo.

El término "gen" también engloba las regiones codificantes de un gen estructural e incluye secuencias localizadas adyacentes a la región codificante en ambos extremos 5' y 3' con una distancia de aproximadamente 1 kb de cada extremo de manera que el gen se corresponde con la longitud del ARNm de longitud completa. Se hace referencia a las secuencias que se localizan en 5' de la región codificante y que están presentes en el ARNm como secuencias 5' no traducidas. Se hace referencia a las secuencias que se localizan en 3' o corriente abajo de la región codificante y que están presentes en el ARNm como secuencias 3' no traducidas. El término "gen" engloba las formas tanto de ADNc como genómica de un gen. Una forma genómica o clon de un gen contiene la región codificante interrumpida por secuencias no codificantes llamadas "intrones" o "regiones de intervención" o "secuencias de intervención". Los intrones son segmentos de un gen que se transcriben en un ARN nuclear (ARNhn); los intrones pueden contener elementos reguladores tales como amplificadores. Los intrones se eliminan o "se recortan" de la transcripción primaria o nuclear; por lo tanto, los intrones están ausentes en la transcripción del ARN mensajero (ARNm). El ARNm funciona durante la traducción para especificar la secuencia o el orden de los aminoácidos en un polipéptido nascente.

Además de contener los intrones, las formas genómicas de un gen pueden incluir también secuencias localizadas en ambos extremos 5' y 3' de las secuencias que están presentes en la transcripción de ARN. Se hace referencia a estas secuencias como secuencias o regiones "flanqueantes" (estas secuencias flanqueantes se localizan 5' o 3' respecto a las secuencias no traducidas presentes en la transcripción de ARNm). La región flanqueante 5' puede contener secuencias reguladoras tales como promotores y amplificadores que controlan o tienen influencia en la transcripción del gen. La región flanqueante 3' puede contener secuencias que dirigen la terminación de la transcripción, la escisión tras la transcripción y la poliadenilación.

Los términos "oligonucleótido" o "polinucleótido" o "nucleótido" o "ácido nucleico" se refieren a una molécula que comprende dos o más desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, preferentemente más de tres, y normalmente más de diez. El tamaño exacto dependerá de muchos factores, que a su vez dependen de la función o uso en último término del oligonucleótido. El oligonucleótido puede generarse de cualquier manera, incluyendo la síntesis química, replicación de ADN, transcripción inversa, o una combinación de las mismas.

Las expresiones "un oligonucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica un gen" o "una secuencia de ácido nucleico que codifica" un polipéptido especificado se refieren a una secuencia de ácido nucleico que comprende la región codificante de un gen o en otras palabras la secuencia de ácido nucleico que codifica un producto genético. La región codificante puede estar presente en forma de ADNc, ADN genómico o ARN. Cuando está presente en forma de ADN, el oligonucleótido puede ser de cadena sencilla (es decir, la cadena en sentido) o de doble cadena. Los elementos de control adecuados tales como amplificadores/promotores, uniones de corte y empalme, señales de poliadenilación, etc., se pueden situar en estrecha proximidad a la región codificante del gen si fueran necesarios para permitir el inicio apropiado de la transcripción y el procesamiento correcto de la transcripción primaria de ARN. De manera alternativa, la región codificante utilizada en los vectores de expresión de la presente invención puede contener amplificadores/promotores endógenos, uniones de corte y empalme, secuencias de intervención, señales de poliadenilación, etc., o una combinación de elementos de expresión tanto endógenos como exógenos.

El término "recombinante" cuando se hace en referencia a una molécula de ácido nucleico se refiere a una molécula de ácido nucleico que está compuesta por segmentos de ácido nucleico que se mantiene juntos por medio de técnicas de biología molecular. El término "recombinante" cuando se hace en referencia a una proteína o un polipéptido se refiere a una molécula de proteína que se expresa utilizando una molécula de ácido nucleico recombinante.

Los términos "complementario" y "complementariedad" se refieren a polinucleótidos (es decir, una secuencia de nucleótidos) relacionados por las reglas de emparejamiento de bases. Por ejemplo, la secuencia "5'-A-G-T-3'", es complementaria de la secuencia "3'-T-C-A-5'". La complementariedad puede ser "parcial", en la que solo algunas de las bases de ácido nucleico se emparejan de acuerdo con las reglas de emparejamiento de bases. O, puede ser una complementariedad "completa" o "total" entre los ácidos nucleicos. El grado de complementariedad entre las cadenas de ácido nucleico tiene efectos significativos sobre la eficacia y la resistencia de la hibridación entre las cadenas de ácidos nucleicos. Esto es de particular importancia en las reacciones de amplificación, así como los procedimientos de detección que dependen de la unión entre los ácidos nucleicos.

La expresión "de tipo silvestre" cuando se hace en referencia a un gen se refiere a un gen que tiene las características de un gen aislado de una fuente de origen natural. La expresión "de tipo silvestre" cuando se hace en referencia a un producto genético se refiere a un producto genético que tiene las características de un producto genético aislado de una fuente de origen natural. La expresión "de origen natural" como se aplica a un objeto se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de polipéptido o polinucleótido que esté presente en un organismo (incluyendo virus) que pueda aislarse de una fuente en la naturaleza y que no ha sido modificada intencionadamente por el hombre en el laboratorio es de origen natural. Un gen de tipo silvestre es frecuentemente el gen que se observa más frecuentemente en una población y por lo tanto se denomina arbitrariamente la forma "normal" o "de tipo silvestre" del gen. Por el contrario, El término "modificado" o "mutante" cuando hace referencia a un gen o a un producto genético se refiere, respectivamente, a un gen o a un producto genético que presenta modificaciones en la secuencia y/o las propiedades funcionales (es decir, características alteradas) cuando se compara con el gen o producto genético de tipo silvestre. Se señala que se pueden aislar mutantes de origen natural; estos se identifican por el hecho de que tienen características alteradas cuando se comparan con el gen o el producto genético de tipo silvestre.

El término "alelo" se refiere a diferentes variaciones en un gen; las variaciones incluyen, pero no se limitan a variantes y mutantes, loci polimórficos y loci polimórficos de un único nucleótido, cambios de fase de lectura y mutaciones de corte y empalme. Un alelo puede ser de origen natural en una población, o puede aparecer durante la vida de cualquier individuo de la población.

- 5 Por lo tanto, los términos "variante" y "mutante" cuando se utilizan en referencia a una secuencia de nucleótidos se refiere a una secuencia de ácido nucleico que se diferencia por uno o más nucleótidos de otra, secuencia de ácido nucleico normalmente relacionada. Una "variación" es una diferencia entre dos secuencias de nucleótidos diferentes; normalmente, una secuencia es la secuencia de referencia.

- 10 El término "antisentido" se refiere a una secuencia de desoxirribonucleótidos cuya secuencia de restos de desoxirribonucleótido está en orientación inversa de 5' a 3' en relación con la secuencia de restos de desoxirribonucleótido en una cadena en sentido de un dúplex de ADN. Una "cadena en sentido" de un dúplex de ADN se refiere a una cadena en un dúplex de ADN que es transcrita por una célula en su estado natural en un "ARNm en sentido". Por lo tanto, una secuencia "antisentido" es una secuencia que tiene la misma secuencia que la cadena no codificante del dúplex de ADN. La expresión "ARN antisentido" se refiere a una transcripción de ARN que es
15 complementaria a todo o parte de una transcripción primaria diana o ARNm y que bloquea la expresión de un gen diana mediante interferencia con el procesamiento, transporte y/o traducción de su transcripción primaria o ARNm. La complementariedad de un ARN antisentido puede ser con cualquier parte de la transcripción genética específica, es decir, en la secuencia no codificante 5', secuencia no codificante 3', los intrones o la secuencia codificante. Además, como se utiliza en el presente documento, el ARN antisentido puede contener regiones de secuencias de ribozima que aumentan la eficacia de el ARN antisentido para bloquear la expresión genética. "Ribozima" se refiere a un ARN catalítico e incluye endorribonucleasas específicas de secuencia. "Inhibición antisentido" se refiere a la producción de transcripciones de ARN antisentido capaces de evitar la expresión de la proteína diana.

- 25 El término "cebador" se refiere a un oligonucleótido, sea de origen natural como en una digestión de restricción purificada o producido de manera sintética, que es capaz de actuar como un punto de inicio de la síntesis cuando se coloca en condiciones en las que se induce la síntesis de un producto de extensión del cebador que es complementario de una cadena de ácido nucleico, (por ejemplo, en presencia de nucleótidos y un agente de inducción tal como una ADN polimerasa y una temperatura y pH adecuados). El cebador preferentemente es de cadena sencilla para una máxima eficacia de amplificación, pero alternativamente puede ser de cadena doble. Si es de cadena doble, el cebador se trata primero para separar sus cadenas antes de utilizarse para preparar los productos de extensión.
30 Preferentemente, el cebador es un oligodesoxirribonucleótido. El cebador debe ser lo suficientemente largo para cebar la síntesis de los productos de extensión en presencia del agente de inducción. Las longitudes exactas de los cebadores dependerán de muchos factores, que incluyen la temperatura, fuente del cebador y el uso del procedimiento.

- 35 El término "sonda" se refiere a un oligonucleótido (es decir, una secuencia de nucleótidos), sea de origen natural como en una digestión de restricción purificada o producido de manera sintética, de manera recombinante o mediante amplificación por PCR, que es capaz de hibridarse con otro oligonucleótido de interés. Una sonda puede ser de cadena sencilla o cadena doble. Las sondas son útiles en la detección, identificación y aislamiento de secuencias genéticas particulares. Se contempla que cualquier sonda utilizada en la presente invención ser marcará con cualquier "molécula indicadora", de manera que sea detectable en cualquier sistema de detección, incluyendo, pero sin limitarse a sistemas enzimáticos (por ejemplo, ELISA, así como ensayos histoquímicos basados en enzimas), fluorescentes, radiactivos, y luminiscentes. No se tiene la intención de que la presente invención se limite a cualquier sistema o marcador de detección en particular.
40

- 45 El término "aislado" cuando se utiliza en relación con un ácido nucleico, como en "un oligonucleótido aislado" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que se identifica y separa de al menos un ácido nucleico contaminante con el que se asocia habitualmente en su fuente natural. El ácido nucleico aislado está presente en una forma o conjunto que es diferente del que se encuentra en la naturaleza. Por el contrario, los ácidos nucleicos no aislados, tal como el ADN y ARN, se encuentran en el estado en que existen en la naturaleza. Ejemplos de ácidos nucleicos no aislados incluyen: una secuencia de ADN determinada (por ejemplo, un gen) que se encuentra en el cromosoma de la célula huésped en proximidad a genes vecinos; las secuencias de ARN, tales como una secuencia de ARNm específica que codifica
50 una proteína específica, que se encuentran en la célula como una mezcla con numerosos ARNm distintos que codifican una multitud de proteínas. Sin embargo, el ácido nucleico aislado que codifica una proteína en particular incluye, a modo de ejemplo, dicho ácido nucleico en células que expresan habitualmente la proteína, cuando el ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de las células naturales, o está de otra manera flanqueado por una secuencia de ácido nucleico diferente de la que se encuentra en la naturaleza. El ácido nucleico u oligonucleótido
55 aislados pueden estar presentes en forma de cadena sencilla o cadena doble. Cuando un ácido nucleico u oligonucleótido aislados se van a utilizar para expresar una proteína, el oligonucleótido contendrá al mínimo la cadena en sentido o codificante (es decir, el oligonucleótido puede ser de cadena sencilla), pero puede contener ambas cadenas en sentido y antisentido (es decir, el oligonucleótido puede ser de cadena doble).

- 60 El término "purificado" se refiere a moléculas, cualquier secuencia de ácido nucleico o aminoácidos, que se retiran de su entorno natural, se aíslan o separan. Una "secuencia de ácido nucleico aislada" puede ser, por lo tanto, una secuencia de ácido nucleico purificada. Las moléculas "sustancialmente purificadas" están al menos un 60% libres,

preferentemente al menos un 75% libres, y más preferentemente al menos un 90% libres de otros componentes con los que están asociados naturalmente. Como se utiliza en el presente documento, el término "purificado" o "purificar" también se refiere a la retirada de contaminantes de una muestra. La retirada de proteínas contaminantes da como resultado un aumento del porcentaje del polipéptido de interés en la muestra. En otro ejemplo, se expresan polipéptidos recombinantes en plantas, bacterias, levaduras, o células huésped de mamífero y los polipéptidos se purifican por la retirada de las proteínas de la célula huésped; el porcentaje de polipéptidos recombinantes está por lo tanto aumentado en la muestra.

La expresión "composición que comprende" una determinada secuencia de polinucleótido o polipéptido se refiere ampliamente a cualquier composición que contiene la secuencia de polinucleótido o polipéptido determinada. La composición puede comprender una solución acuosa. Las composiciones que comprenden secuencias de polinucleótido o fragmentos de las mismas se pueden emplear como sondas de hibridación. En algunas realizaciones, las secuencias de polinucleótido se emplean en solución acuosa que contiene sales (por ejemplo, NaCl), detergentes (por ejemplo, SDS), y otros componentes (por ejemplo, solución de Denhardt, leche en polvo, ADN de esperma de salmón, etc.).

La expresión "compuesto de ensayo" se refiere a cualquier entidad química, producto farmacéutico, fármaco, y similar que se pueda utilizar para tratar o prevenir una enfermedad, dolencia, mal estar, o trastorno de la función corporal, o de otra manera alterar el estado fisiológico o celular de una muestra. Los compuestos de ensayo comprenden compuestos terapéuticos tanto conocidos como potenciales. Puede determinarse que un compuesto de ensayo es terapéutico mediante una exploración utilizando los procedimientos de exploración de la presente invención. Un "compuesto terapéutico conocido" se refiere a un compuesto terapéutico que ha demostrado (por ejemplo, mediante ensayos con animales o experiencias anteriores con la administración a seres humanos) que es eficaz en dicho tratamiento o prevención.

Como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo" se utiliza en su más amplio sentido para referirse a anticuerpos completos, anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos humanos, humanizados, o quiméricos), anticuerpos policlonales, y fragmentos de anticuerpo que se puedan unir al antígeno (por ejemplo, Fab', F'(ab)₂, Fv, anticuerpos de cadena sencilla), que comprenden regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de los anteriores a condición de que presenten la actividad biológica deseada.

Como se utiliza en el presente documento, los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una parte de un anticuerpo intacto, preferentemente la región variable o de unión al antígeno del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, y fragmentos Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (Zapata y col., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 (1995)); moléculas de anticuerpo de cadena sencilla; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

Un anticuerpo que se "une específicamente a" o es "específico para" un polipéptido en particular es el que se une a un polipéptido en particular o un epítipo sobre un polipéptido en particular sin unirse sustancialmente a ningún otro polipéptido o epítipo polipeptídico.

Como se utiliza en el presente documento, "activo" o "actividad" se refiere a una actividad biológica y/o inmunológica nativa o de origen natural.

Como se usa en el presente documento, la expresión, "*in vitro*" se refiere a un entorno artificial y a procesos o reacciones que se producen dentro de un entorno artificial. Los entornos *in vitro* pueden incluir, pero no se limitan a, tubos de ensayo y cultivos celulares. La expresión "*in vivo*" se refiere al entorno natural (por ejemplo, un animal o una célula) y a los procesos o reacciones que se producen dentro de un entorno natural.

Como se utiliza en el presente documento, "inhibidor" se refiere a una molécula que elimina, minimiza, o disminuye la actividad, por ejemplo, la actividad biológica, enzimática, química, o inmunológica, de una diana.

Como se utiliza en el presente documento, el término "enfermedad" se refiere a una desviación de la condición considerada como normal o media para los miembros de una especie, y que es perjudicial para un individuo afectado en condiciones que no son adversas para la mayoría de los individuos de esa especie (por ejemplo, diarrea, náuseas, fiebre, dolor, inflamación, etc.).

Como se utiliza en el presente documento, el término "administración" se refiere al acto de dar un fármaco, profármaco, anticuerpo, u otro agente, o tratamiento terapéutico a un sistema fisiológico (por ejemplo, un sujeto o células *in vivo*, *in vitro*, o *ex vivo*, tejidos, y órganos). Las vías de administración ejemplares en el cuerpo humano pueden ser a través de los ojos (oftálmica), boca (oral), piel (transdérmica), nariz (nasal), pulmones (inhalación), mucosa oral (bucal), oído, mediante inyección (por ejemplo, por vía intravenosa, vía subcutánea, vía intratumoral, vía intraperitoneal, etc.) y similares. "Coadministración" se refiere a la administración de más de un agente químico o tratamiento terapéutico (por ejemplo, radioterapia) a un sistema fisiológico (por ejemplo, un sujeto o célula *in vivo*, *in vitro*, o *ex vivo*, tejidos, y órganos). Como se utiliza en el presente documento, la administración "en combinación con" uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden. La "coadministración" de tratamientos terapéuticos puede ser concurrente o en cualquier orden temporal o combinación física.

Como se utiliza en el presente documento, el término "tratamiento" incluye la reducción o el alivio de al menos un efecto adverso o síntoma de una enfermedad o trastorno mediante la introducción en cualquier vía de una composición terapéutica de la presente tecnología dentro o sobre el cuerpo de un sujeto. "Tratamiento" se refiere al tratamiento tanto terapéutico como profiláctico o medidas preventivas, en el que el objeto es prevenir o enlentecer (aminorar) la afección o trastorno patológicos que se trata. Los que necesitan el tratamiento incluyen los que tienen el trastorno, así como los que tienen propensión a tener el trastorno o en los que se va a prevenir el trastorno.

Como se utiliza en el presente documento, "dosis terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un agente terapéutico suficiente para alcanzar un efecto clínico beneficioso o deseado. Dicha dosis se puede administrar en una o más administraciones. Sin embargo, la determinación precisa de que se consideraría una dosis eficaz puede basarse en factores individuales para cada paciente, incluyendo, pero no se limitan a, la edad del paciente, tamaño, tipo o extensión de la enfermedad, la etapa de la enfermedad, la vía de administración, tipo o extensión de la terapia suplementaria utilizada, curso del proceso de enfermedad, y tipo de tratamiento deseado (por ejemplo, tratamiento agresivo vs. convencional).

Como se utiliza en el presente documento, La expresión "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad eficaz de una composición suficiente para efectuar los resultados beneficiosos o deseados. Una cantidad eficaz se puede administrar en una o más administraciones, aplicaciones, o dosificaciones y no se tiene la intención de limitarla a una formulación o vía de administración en particular.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "composición farmacéutica" se refiere a la combinación de un agente activo con, según se desee, un vehículo, inerte o activo, que hace que la composición sea especialmente adecuada para el uso diagnóstico o terapéutico *in vitro*, *in vivo*, o *ex vivo*.

Como se utiliza en el presente documento, las expresiones "farmacéuticamente aceptable" o "farmacológicamente aceptable" se refiere a composiciones que no producen sustancialmente reacciones adversas, por ejemplo, reacciones tóxicas, alérgicas, o inmunológicas, cuando se administran a un sujeto.

Como se utiliza en el presente documento, los "vehículos" incluyen vehículos farmacéuticamente aceptables, excipientes, o estabilizantes que sean no tóxicos para la célula o el mamífero que se va a exponer a ellos a las dosis y concentraciones empleadas. A menudo, el vehículo fisiológicamente aceptable es una solución acuosa tampón de pH. Ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen los tampones tales como de fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo el ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (de menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como albúmina del suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como la glicina, glutamina, asparagina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono incluyendo la glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes azúcares tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos.

Como se utiliza en el presente documento, los términos "paciente" o "sujeto" se refieren a organismos que se van a tratar con las composiciones de la presente tecnología o se van a someter a distintos ensayos proporcionados por la tecnología. El término "sujeto" incluye animales, preferentemente mamíferos, incluyendo los seres humanos. En una realización preferida, el sujeto es un primate. En una realización más preferida, el sujeto es un ser humano.

Como se utiliza en el presente documento, el término "muestra" se utiliza en su sentido más amplio. En un sentido se puede referir a células o tejidos animales. En otro sentido, quiere decir que incluye un espécimen o cultivo obtenido de cualquier fuente, tal como muestras biológicas o ambientales. Las muestras biológicas se pueden obtener de plantas o animales (incluyendo los seres humanos) y engloban los líquidos, sólidos, tejidos, y gases. Las muestras ambientales incluyen material ambiental tal como materia superficial, suelo, agua y muestras industriales. Estos ejemplos no se tienen que considerar como limitantes de los tipos de muestra aplicables a la presente tecnología.

Realizaciones de la tecnología

Aunque la divulgación del presente documento se refiere a ciertas realizaciones ilustradas, se tiene que entender que estas realizaciones se presentan a modo de ejemplo y no a modo de limitación.

1. Inhibidores del SCF

El factor de células madre (SCF) es un ligando que es específico para el receptor cinasa c-Kit. La unión del SCF al c-Kit produce una dimerización del c-Kit y la activación de su actividad cinasa, que es importante para la hematopoyesis, melanogénesis, y la fertilidad. Mediante el c-Kit, el SCF actúa para promover la supervivencia celular, la proliferación, diferenciación, adhesión, y activación funcional. La activación aberrante del c-Kit puede dar como resultado una enfermedad, que incluye fibrosis y defectos de la remodelación de tejidos. En particular, hay múltiples enfermedades pulmonares con defectos de remodelación conocidos, así como otras enfermedades crónicas de remodelación tisular que afectan a otros órganos y tejidos. Los ejemplos específicos de enfermedades que implican fibrosis o defectos de remodelación tisular son la fibrosis pulmonar idiopática, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, síndrome de dificultad respiratoria aguda, fibrosis quística, fibrosis peribronquial, neumonitis por hipersensibilidad, asma, escleroderma, inflamación, cirrosis hepática, fibrosis renal, fibrosis parenquimatosa, fibrosis endomiocárdica, fibrosis

mediastínica, fibrosis nodular subepidérmica, histiocitoma fibroso, fibrotórax, fibrosis hepática, fibromialgia, fibrosis gingival, y fibrosis inducida por radiación.

En consecuencia, se puede utilizar la interferencia en la interacción entre el SCF y el c-Kit para tratar o estudiar las enfermedades que implican una activación aberrante del c-Kit que produzca fibrosis y defectos de remodelación tisular. El receptor de c-Kit se encuentra en las células progenitoras hematopoyéticas, melanocitos, células germinales, eosinófilos, linfocitos, y mastocitos. Por lo tanto, evitando la interacción del SCF con el c-Kit se puede alterar la activación de varias poblaciones celulares asociadas con la enfermedad que se han implicado en fibrosis y fenotipos de enfermedad de remodelación tisular.

De manera adicional, el SCF induce los mediadores clave en la respuesta fibrótica, IL-25 e IL-13. Los datos sugieren que la IL-25 puede dirigir la expresión de IL-13 en un linfocito T y de manera dependiente de antigenina. Por lo tanto, estos procesos pueden progresar sin una respuesta específica de antígeno y en consecuencia se perpetúa crónicamente la enfermedad fibrótica y de remodelación. Se contempla que se establece una cascada compleja en la que el SCF induce a la IL-25, que a su vez induce la producción de IL-13, la diferenciación de miofibroblastos, y la producción de colágeno. También se ha identificado a la IL-4 como una citocina asociada con fibrosis.

2. Anticuerpos

En algunas realizaciones, la inhibición de la capacidad del SCF para interactuar con el c-Kit se consigue por medio de un anticuerpo que reconoce al SCF. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal, y puede ser, por ejemplo, un anticuerpo humano, humanizado, o quimérico. Los anticuerpos monoclonales contra antígenos diana se producen mediante una variedad de técnicas que incluyen las metodologías de anticuerpo monoclonal convencionales tales como las técnicas de hibridación de células somáticas de Kohler y Milstein (Nature, 256:495 (1975)). Aunque en algunas realizaciones, se prefieren los procedimientos de hibridación de células somáticas, también se contemplan otras técnicas para la producción de anticuerpos monoclonales (por ejemplo, transformación vírica u oncogénica de linfocitos B).

Se contempla que los anticuerpos contra el SCF son útiles en los procedimientos experimentales, diagnósticos, y terapéuticos descritos en el presente documento. En determinadas realizaciones, los anticuerpos que se proporcionan en el presente documento se utilizan para detectar la expresión de SCF en muestras biológicas. Por ejemplo, se puede seccionar una muestra que comprende un tejido de biopsia y detectar la proteína utilizando, por ejemplo, la inmunofluorescencia o inmunohistoquímica. De manera alternativa, se pueden aislar las células individuales de una muestra y detectar la expresión proteica en células vivas o fijadas mediante un análisis FACS. Además, se pueden utilizar los anticuerpos en matrices proteicas para detectar la expresión del SCF. En otras realizaciones, los anticuerpos proporcionados en el presente documento se utilizan para disminuir la actividad de las células que expresan c-Kit inhibiendo el SCF sea en un ensayo basado en células *in vitro* o en un modelo animal *in vivo*. En algunas realizaciones, se utilizan los anticuerpos para tratar un paciente humano administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo contra el SCF.

Para la producción de anticuerpos, se pueden inmunizar distintos animales huésped mediante una inyección con el péptido correspondiente al epítipo deseado (por ejemplo, un fragmento de SCF, por ejemplo, un fragmento que comprenda la secuencia proporcionada por SEQ ID NO: 1 u 8 o partes inmunogénicas de la misma) que incluye, pero no se limitan a, conejos, ratones, ratas, ovejas, cabras, etc. Los anticuerpos contra el SCF se pueden generar mediante inmunización (por ejemplo, mediante una inyección) con un antígeno que comprende un péptido, una parte, o la proteína completa del precursor de la isoforma b del SCF (por ejemplo, una proteína o fragmento peptídico de la secuencia disponible con el número de referencia del GenBank NP_000890 (SEQ ID NO: 4)), o una variante o versión modificada de la misma, o un péptido, una parte, o la proteína completa del precursor de la isoforma a del SCF (por ejemplo, una proteína o fragmento peptídico de la secuencia disponible con el número de referencia del GenBank NP_003985 (SEQ ID NO: 6)), o una variante o versión modificada de la misma. Los anticuerpos también se pueden producir mediante inmunización con un producto de traducción de la Secuencia Genética de Referencia del NCBI para el SCF (por ejemplo, el número de referencia NG_012098 (SEQ ID NO: 7)) o variantes o fragmentos del mismo.

En algunas realizaciones, el péptido se conjuga con un vehículo inmunogénico (por ejemplo, toxoide diftérico, albúmina de suero bovino (BSA), o hemocianina de lapa californiana (KLH)). Se utilizan distintos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie del huésped, incluyendo, pero no se limitan a, adyuvante de Freund (completo o incompleto), geles minerales tales como el hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianinas de lapa californiana, dinitrofenil, y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (Bacilo de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*.

Los anticuerpos policlonales se pueden preparar por cualquier procedimiento conocido. Los anticuerpos policlonales se pueden producir inmunizando un animal (por ejemplo, un conejo, una rata, ratón, burro, etc.) mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales del antígeno relevante (un fragmento peptídico purificado, proteína recombinante de longitud completa, proteína de fusión, etc.) conjugados opcionalmente con KLH, albúmina del suero, etc., diluidos en solución salina estéril, y combinados con un adyuvante para formar una emulsión estable. El anticuerpo policlonal se recupera entonces de la sangre, ascitis, y similares, de un animal inmunizado de esa manera.

La sangre extraída se deja coagular, y se decanta el suero, se clarifica por centrifugación, y se ensaya en cuanto al título de anticuerpos. Los anticuerpos policlonales se pueden purificar del suero o ascitis de acuerdo con procedimientos convencionales en la técnica incluyendo la cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, electroforesis en gel, diálisis, etc.

Para la preparación de anticuerpos monoclonales, se puede utilizar cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante cultivo continuo de líneas celulares (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Estos incluyen, pero no se limitan a, la técnica del hibridoma desarrollado originalmente por Kohler y Milstein y la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de linfocitos B humanos (Véase, por ejemplo, Kozbor y col., *Immunol. Today*, 4:72 (1983)), y la técnica del hibridoma de EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole y col., en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96 (1985)).

En algunas realizaciones proporcionados en el presente documento, los anticuerpos se preparan a partir de un hibridoma. Al utilizar el procedimiento del hibridoma, se inmuniza un ratón, hámster, u otro huésped animal apropiado, como se ha descrito anteriormente para dar lugar a la producción por los linfocitos de anticuerpos que se unirán específicamente a un antígeno inmunizante. De manera alternativa, se pueden inmunizar los linfocitos *in vitro*. Después de la inmunización, se aíslan los linfocitos y se fusionan con una línea celular de mieloma adecuada utilizando, por ejemplo, polietilenglicol, para formar las células de hibridoma que se pueden entresacar de entre los linfocitos y las células de mieloma no fusionados. Los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales dirigidos específicamente contra un antígeno escogido como se determina por inmunoprecipitación, inmunotransferencia, o mediante un ensayo de unión *in vitro* tal como un radioinmunoensayo (RIA) o un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) se pueden propagar entonces *in vitro* (por ejemplo, en un cultivo) utilizando procedimientos convencionales (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, 1986) o *in vivo* como en tumores ascíticos en un animal. Los anticuerpos monoclonales se pueden purificar entonces a partir del medio de cultivo o el líquido ascítico como se ha descrito para los anticuerpos policlonales anteriormente.

El sistema animal preferido para preparar los hibridomas es el sistema murino. La producción de hibridomas en el ratón es un procedimiento bien establecido. Los protocolos de inmunización y las técnicas para el aislamiento de los esplenocitos inmunizados para la fusión se conocen en la técnica. Las parejas de fusión (por ejemplo, células de mieloma murino) y los procedimientos de fusión también son conocidos. Las realizaciones de la tecnología del presente documento proporcionan anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales) producidos a partir de un hibridoma que se prepara inmunizando ratones con un péptido que es una parte o fragmento del SCF proteico. Por ejemplo, algunos aspectos de la divulgación proporcionan un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que se une al SCF inmunizando con, por ejemplo, una proteína o fragmento peptídico de la secuencia disponible con el número de referencia del GenBank NP_000890 (SEQ ID NO: 4)), o una variante o versión modificada de la misma, o inmunizando con, por ejemplo, una proteína o fragmento peptídico de la secuencia disponible con el número de referencia del GenBank NP_003985 (SEQ ID NO: 6)), o una variante o versión modificada de la misma. Algunos aspectos de la divulgación proporcionan un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que se une a una proteína o péptido, o variantes o formas modificadas de los mismos, que sean un producto de traducción de la Secuencia Genética de Referencia del NCBI para el SCF (por ejemplo, el número de referencia NG_012098 (SEQ ID NO: 7)) o variantes o fragmentos de los mismos.

Por ejemplo, hay realizaciones de la tecnología del presente documento que proporcionan anticuerpos monoclonales producidos a partir de un hibridoma que se prepara inmunizando ratones con un péptido de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, hay aspectos de la divulgación que proporcionan anticuerpos monoclonales producidos a partir de un hibridoma que se prepara inmunizando ratones con un péptido de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8. También se desvelan procedimientos y composiciones relacionadas con anticuerpos que se preparan utilizando una variante de la SEQ ID NO: 1 u 8 que comprenden una o más sustituciones, eliminaciones, inserciones u otros cambios, a condición de que dicha variante produzca un anticuerpo específico para el SCF. La producción de polipéptidos de SEQ ID NO: 1 u 8 y secuencias similares a estas se puede conseguir de acuerdo con distintas técnicas bien conocidas en la materia. Por ejemplo, se puede producir un polipéptido de SEQ ID NO: 1 u 8 o una variante del mismo utilizando un sistema de expresión bacteriano y un ácido nucleico que codifique un polipéptido de SEQ ID NO: 1 u 8 o una variante del mismo. A modo de ejemplo, se puede producir un polipéptido de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 utilizando la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 2.

Además, los anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra las proteínas humanas se pueden generar utilizando ratones transgénicos que lleven el sistema inmunitario humano completo más que el sistema del ratón. Los esplenocitos de los ratones transgénicos se inmunizan con el antígeno de interés, que se utilizó para producir los hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales humanos con afinidades específicas por los epítomos de una proteína humana.

También se pueden generar los anticuerpos monoclonales mediante otros procedimientos conocidos por los expertos en la técnica de la tecnología del ADN recombinante. Por ejemplo, se ha utilizado la presentación combinatoria de anticuerpos para producir anticuerpos monoclonales (véase, por ejemplo, Sastry y col., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 86: 5728 (1989); Huse y col., *Science*, 246: 1275 (1989); Orlandi y col., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 86:3833 (1989)). Después de la inmunización de un animal con el inmunogen como se ha descrito anteriormente, el repertorio de

anticuerpos del agrupamiento de linfocitos B resultante se clona. Se conocen en general procedimientos para la obtención de la secuencia de ADN de las regiones variables de una población diversa de moléculas de inmunoglobulina utilizando una mezcla de cebadores oligoméricos y PCR. Por ejemplo, se mezclan cebadores oligonucleotídicos que se correspondan con las secuencias líder 5' (péptido de señal) y/o secuencias de la región marco conservada 1 (FR1), así como se pueden utilizar cebadores de una región conservada 3' para amplificar y aislar las regiones variables de cadena pesada y ligera de varios anticuerpos murinos (véase, por ejemplo, Larrick y col., *Biotechniques*, 11: 152 (1991)). También se ha utilizado una estrategia similar para amplificar regiones variables de cadena pesada y ligera humanas a partir de anticuerpos humanos (véase, por ejemplo, Larrick y col., *Methods: Companion to Methods in Enzymology*, 2: 106 (1991)).

De manera alternativa, también se pueden hacer anticuerpos monoclonales utilizando procedimientos de ADN recombinante como se describe en la Patente de los EE. UU. 4.816.567. Los polinucleótidos que codifican un anticuerpo monoclonal se aíslan (por ejemplo, de los linfocitos B maduros o células de hibridoma), mediante, por ejemplo, RT-PCR utilizando cebadores oligonucleotídicos que amplifiquen específicamente los genes que codifican las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo, y sus secuencias se determinan utilizando procedimientos convencionales. Los polinucleótidos aislados que codifican las cadenas pesada y ligera se clonan entonces en vectores de expresión adecuados, que, cuando transfectan en células huésped tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células del ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que no producen de otra manera inmunoglobulinas proteicas, dan lugar a que se generen anticuerpos monoclonales por las células huésped. También, se pueden aislar anticuerpos monoclonales recombinantes o fragmentos de los mismos de especies deseadas a partir de bibliotecas de fagos de presentación como se ha descrito (McCafferty y col., 1990, *Nature*, 348:552-554; Clackson y col., 1991, *Nature*, 352:624-628; y Marks y col., 1991, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597).

El polinucleótido que codifica un anticuerpo monoclonal puede modificarse adicionalmente de varias maneras diferentes utilizando la tecnología de ADN recombinante para generar anticuerpos alternativos. En una realización, los dominios constantes de las cadenas pesada y ligera de, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal de ratón se puede sustituir por 1) las regiones de, por ejemplo, un anticuerpo humano para generar un anticuerpo quimérico o 2) un polipéptido no inmunoglobulina para generar un anticuerpo de fusión. En otras realizaciones, las regiones constantes se truncan o eliminan para generar el fragmento de anticuerpo deseado de un anticuerpo monoclonal. Además, se puede utilizar una mutagénesis dirigida al sitio o de alta densidad de la región variable para optimizar la especificidad, la afinidad, etc., de un anticuerpo monoclonal.

Por ejemplo, también se contemplan anticuerpos monoclonales quiméricos ratón-humano, que pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica. Por ejemplo, un gen que codifique la región constante de una molécula de anticuerpo monoclonal murino (o de otra especie) se digiere con enzimas de restricción para retirar la región que codifica la región constante murina, y se sustituye por la parte equivalente de un gen que codifique una región constante humana (véase, por ejemplo, Robinson y col., PCT/US86/02269; Solicitud de Patente Europea 184.187; Solicitud de Patente Europea 171.496; Solicitud de Patente Europea 173.494; documento WO 86/01533; documento US 4.816.567; Solicitud de Patente Europea 125.023; Better y col., *Science*, 240:1041-1043 (1988); Liu y col., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 84:3439-3443 (1987); Liu y col., *J. Immunol.*, 139:3521-3526 (1987); Sun y col., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 84:214-218 (1987); Nishimura y col., *Canc. Res.*, 47:999-1005 (1987); Wood y col., *Nature*, 314:446-449 (1985); y Shaw y col., *J. Natl. Cancer Inst.*, 80:1553-1559 (1988)).

El anticuerpo quimérico se puede humanizar adicionalmente reemplazando secuencias de la región variable que no estén directamente implicadas en la unión al antígeno con secuencias equivalentes de las regiones variables humanas. Una revisión general de anticuerpos quiméricos humanizados se proporciona por S.L. Morrison, *Science*, 229:1202-1207 (1985) y por Oi y col., *Bio Techniques*, 4:214 (1986). Los procedimientos incluyen el aislamiento, manipulación, y expresión de las secuencias de ácido nucleico que codifican todo o parte de regiones variables de inmunoglobulina a partir al menos de una cadena pesada o ligera. Las fuentes de dicho ácido nucleico son bien conocido por los expertos en la técnica. El ADN recombinante que codifica el anticuerpo quimérico, o fragmentos del mismo, se puede clonar entonces en un vector de expresión adecuado.

Los anticuerpos humanizados adecuados se pueden producir de manera alternativa mediante sustitución de una CDR (véase, por ejemplo, el documento US 5.225.539; Jones y col., *Nature*, 321:552-525 (1986); Verhoeven y col., *Science*, 239:1534 (1988); y Beidler y col., *J. Immunol.*, 141:4053 (1988)). Se pueden reemplazar todas las CDR de un anticuerpo humano en particular con al menos una parte de una CDR no humana o se pueden reemplazar solo algunas CDR con CDR no humanas. Solamente es necesario reemplazar el número de CDR importantes para la unión del anticuerpo humanizado al receptor Fc.

Un anticuerpo se puede humanizar por cualquier procedimiento que sea capaz de reemplazar al menos una parte de una CDR de un anticuerpo humano con una CDR derivada de un anticuerpo no humano. Las CDR humanas se pueden reemplazar con CDR no humanas utilizando mutagénesis dirigida al sitio.

También se contemplan anticuerpos quiméricos y humanizados en los que se han sustituido, eliminado, o añadido aminoácidos específicos. En particular, los anticuerpos humanizados preferidos tienen sustituciones de aminoácidos en la región marco conservada, tal como para mejorar la unión al antígeno. Por ejemplo, En un anticuerpo humanizado que tenga unas CDR de ratón, los aminoácidos localizados en la región marco conservada humana se pueden

remplazar con los aminoácidos localizados en las posiciones correspondientes del anticuerpo de ratón. Se sabe que dichas sustituciones mejoran la unión de los anticuerpos humanizados al antígeno en algunos casos.

En ciertas realizaciones proporcionadas en el presente documento, es deseable el uso de un fragmento de anticuerpo. Se conocen distintas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivan mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (por ejemplo, Morimoto y col., 1993, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 y Brennan y col., 1985, *Science*, 229:81). Por ejemplo, la digestión de anticuerpos con papaína produce dos fragmentos de unión al antígeno idénticos, llamados fragmentos Fab, cada uno con un único sitio de unión al antígeno, y un fragmento Fc residual. El tratamiento con pepsina da lugar a un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación con el antígeno y sigue siendo capaz de entrecruzarse con el antígeno.

Sin embargo, estos fragmentos normalmente ahora se producen directamente por células huésped recombinantes como se ha descrito anteriormente. Por lo tanto, los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y scFv se pueden expresar todos en y secretarse a partir de *E. coli* u otras células huésped, permitiendo así la producción de grandes cantidades de estos fragmentos. De manera alternativa, dichos fragmentos de anticuerpo se pueden aislar de las bibliotecas de anticuerpos de fagos expuestas anteriormente. El fragmento de anticuerpo también puede ser de anticuerpos lineales como se describe en la Patente de los EE. UU. 5.641.870, por ejemplo, y puede ser mono-específico o bio-específico. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para el experto en la técnica.

Fv es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento del antígeno y de unión al antígeno completo. Esta región consiste en un dímero de un dominio variable de cadena pesada y cadena ligera en estrecha, asociación no covalente. Es en esta configuración en la que las tres CDR de cada dominio variable interactúan para definir un sitio de unión al antígeno sobre la superficie del dímero V_H-V_L. Colectivamente, las seis CDR confieren especificidad de unión al antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprenda solo tres CDR específicas de un antígeno) tiene la capacidad para reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab se diferencian de los fragmentos Fab' por la adición de unos cuantos restos en el extremo carboxilo de dominio de cadena pesada CH1 incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Los fragmentos F(ab')₂, se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' los cuales tienen cisteínas de la bisagra entre ellos. Otros acoplamiento químicos de fragmentos de anticuerpo también son conocidos por el experto en la técnica.

La tecnología del presente documento que se proporciona también contempla la modificación de un anticuerpo para aumentar su semivida sérica. Esto se puede lograr, por ejemplo, incorporando un epítipo de unión al receptor silvestre en el fragmento de anticuerpo mediante mutación de la región apropiada en el fragmento de anticuerpo o incorporando el epítipo en un marcador peptídico que se fusiona entonces al fragmento de anticuerpo en cualquier extremo o en el medio (por ejemplo, mediante síntesis de ADN o peptídica).

La tecnología abarca variantes y equivalentes que son sustancialmente homólogos a los anticuerpos quiméricos, humanizados, y humanos, o fragmentos de anticuerpo de los mismos, se proporcionan en el presente documento. Estos pueden contener, por ejemplo, mutaciones de sustitución conservadora, es decir, la sustitución de uno o más aminoácidos por aminoácidos similares. Por ejemplo, una sustitución conservadora se refiere a la sustitución de un aminoácido con otro dentro de la misma clase general tal como, por ejemplo, un aminoácido ácido con otro aminoácido ácido, un aminoácido básico con otro aminoácido básico, o un aminoácido neutro con otro aminoácido neutro. Lo que se pretende mediante una sustitución conservadora de aminoácidos se conoce bien en la técnica.

Una realización adicional utiliza la tecnología conocida en la técnica para la construcción de bibliotecas de expresión de Fab (Huse y col., *Science*, 246:1275-1281 (1989)) para permitir la identificación rápida y fácil de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada.

También, esta tecnología engloba los anticuerpos bio-específicos que reconozcan específicamente el SCF. Los anticuerpos bio-específicos son anticuerpos que son capaces de reconocer y unirse específicamente al menos a dos epítopos diferentes. Los anticuerpos bio-específicos pueden ser anticuerpos intactos o fragmentos de anticuerpo. Las técnicas para la producción de anticuerpos bio-específicos son comunes en la técnica (Millstein y col., 1983, *Nature* 305:537-539; Brennan y col., 1985, *Science* 229:81; Suresh y col., 1986, *Methods in Enzymol.* 121:120; Traunecker y col., 1991, *EMBO J.* 10:3655-3659; Shalaby y col., 1992, *J. Exp. Med.* 175:217-225; Kostelny y col., 1992, *J. Immunol.* 148:1547-1553; Gruber y col., 1994, *J. Immunol.* 152:5368; y la Patente de los EE. UU. 5.731.168).

Las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (documento U.S. 4.946.778) se pueden adaptar para producir anticuerpos específicos de cadena sencilla según se desee. Los fragmentos de anticuerpo Fv de cadena sencilla comprenden los dominios V_H y V_L de un anticuerpo, en el que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. Preferentemente, el polipéptido comprende adicionalmente un engarce polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que hace posible que los fragmentos Fv de cadena sencilla formen la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de los fragmentos de anticuerpo Fv de cadena sencilla, véase Pluckthun

en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, New York, páginas 269-315 (1994).

3. Otros inhibidores del SCF

También se desvela en el presente documento que la inhibición del SCF puede conseguirse mediante una variedad de otros tipos de inhibidores. Por ejemplo, en algunos aspectos de la divulgación, se puede diseñar un ARN de interferencia pequeño (ARNip) para que se dirija y degrade el ARNm del SCF, los ARNip son moléculas de ARN de doble cadena de 20-25 nucleótidos de longitud. Aunque no se limite en sus características, normalmente el ARNip tiene 21 nucleótidos de largo y tiene protuberancias de 2-nt 3' en ambos extremos. Cada cadena tiene un grupo fosfato 5' y un grupo hidroxilo 3'. *in vivo*, esta estructura es el resultado del procesamiento con Dicer, una enzima que convierte los ARNs largos o los ARN ahorquillados pequeños en los ARNip. Sin embargo, los ARNip también se pueden sintetizar e introducir de manera exógena en las células para llevar a cabo la inactivación específica de un gen de interés. Esencialmente cualquier gen del que se conozca la secuencia se puede direccionar basándose en la complementariedad de secuencia con un ARNip hecho a medida apropiadamente. Por ejemplo, los expertos en la técnica pueden sintetizar un ARNip (véase, por ejemplo, Elbashir, y col., Nature 411: 494 (2001); Elbashir, y col. Genes Dev 15: 188 (2001); Tuschl T, y col., Genes Dev 13: 3191 (1999)).

En algunos aspectos de la divulgación, se utiliza un ARNi para inhibir el SCF. El ARNi representa una defensa celular conservada de manera evolutiva para controlar la expresión de genes ajenos en la mayoría de los eucariotas, incluyendo los seres humanos. El ARNi normalmente se desencadena mediante un ARN de doble cadena (ARNds) y produce la degradación específica de secuencia de los ARN de cadena sencilla diana (por ejemplo, un ARNm). Los mediadores de la degradación del ARNm son los ARN de interferencia pequeños (ARNip), que se producen normalmente a partir de largos ARNs mediante escisión enzimática en la célula. Los ARNip tienen aproximadamente veintiún nucleótidos de longitud (por ejemplo, de 21-23 nucleótidos de longitud) y tienen una estructura de bases emparejadas que se caracteriza por dos protuberancias nucleotídicas 3'. Después de la introducción de un ARN pequeño o un ARNi, en la célula, se cree que se suministra la secuencia a un complejo enzimático llamado RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN). El RISC reconoce la diana y la escinde con una endonucleasa. Se señala que, si se suministran secuencias de ARN más grandes a una célula, una enzima RNasa III (por ejemplo, Dicer) convierte el ARNs más largo en fragmentos de ARNip de cadena doble de 21-23 nt. En algunos aspectos, los oligonucleótidos ARNi se diseñan para dirigirse a la región de unión de las proteínas de fusión. Los ARNip sintetizados químicamente se han convertido en potentes reactivos para el análisis genómico amplio de la función genética de mamíferos en células somáticas cultivadas. Más allá de su valor para la validación de la función genética, los ARNip también tienen un gran potencial como agentes terapéuticos específicos genéticos (véase, por ejemplo, Tuschl y Borkhardt, Molecular Intervent. 2002; 2 (3): 158-67).

La transfección de los ARNip en las células animales da como resultado el silenciamiento, potente, postranscripcional de larga duración de genes específicos (Caplen y col., Proc Natl Acad Sci U.S.A. 2001; 98: 9742-47; Elbashir y col., Nature. 2001; 411:4 94-98; Elbashir y col., Genes Dev. 2001; 15: 188-200; y Elbashir y col., EMBO J. 2001; 20: 6877-88). Se han descrito los procedimientos y composiciones para llevar a cabo el ARNi con los ARNip, por ejemplo, en la Patente de los EE. UU. 6.506.559.

Los ARNip son extraordinariamente eficaces en la disminución de las cantidades de ARN direccionado y sus productos proteicos, frecuentemente hasta niveles indetectables. El efecto del silenciamiento puede durar meses, y es extraordinariamente específico - una falta de coincidencia entre el ARN diana y la región central del ARNip es suficiente frecuentemente para evitar el silenciamiento (Brummelkamp y col., Science 2002; 296: 550-53; y Holen y col., Nucleic Acids Res. 2002; 30: 1757-66).

Un factor importante en el diseño de los ARNip es la presencia de sitios accesibles para la unión del ARNip. Bahoia y col., (J. Biol. Chem., 2003; 278: 15991-97) describen el uso de un tipo de matriz de ADN llamada matriz de exploración para encontrar sitios accesibles en los ARNm para el diseño de ARNip eficaces. Estas matrices comprenden oligonucleótidos que varían en tamaño desde monómeros hasta cierto máximo, habitualmente Co-meros, que se sintetizan utilizando una barrera física (una máscara) mediante la adición paso a paso de cada base en la secuencia. Por lo tanto, las matrices representan un oligonucleótido complementario completo de una región del gen diana. La hibridación del ARNm diana a estas matrices proporciona un perfil de accesibilidad exhaustivo de esta región del ARNm diana. Dichos datos son útiles en el diseño de oligonucleótidos antisentido (que varían desde 7meros a 25meros), cuando es importante conseguir un compromiso entre la longitud del oligonucleótido y la afinidad de unión, por ejemplo, para mantener la eficacia y la especificidad de la diana (Sohail y col., Nucleic Acids Res., 2001; 29 (10): 2041-45). Los procedimientos adicionales y los problemas para la selección de los ARNip se describen, por ejemplo, en los documentos WO 05054270, WO05038054A1, WO03070966A2, J Mol Biol. 13 Mayo 2005;348(4):883-93, J Mol Biol. 13 Mayo 2005;348(4):871-81 y Nucleic Acids Res. 1 Agosto 2003;31(15):4417-24. Además, hay software (por ejemplo, la herramienta de diseño de ARNip siMAX en línea de MWG) que está disponible comercial o públicamente para su uso en la selección y diseño de los reactivos ARNip y ARNi.

En algunos aspectos de la divulgación, la presente invención utiliza un ARNip que incluye extremos romos (véase, por ejemplo, el documento US20080200420), protuberancias (véase, por ejemplo, el documento US20080269147A1), ácidos nucleicos bloqueados (véase, por ejemplo, los documentos WO2008/006369, WO2008/043753, y

WO2008/051306). En algunos aspectos, los ARNip se suministran mediante la expresión genética o utilizando bacterias (véase, por ejemplo, Xiang y col., Nature 24: 6 (2006) y el documento WO06066048).

En otros aspectos de la divulgación, Se utilizan técnicas de ARNhc (véase, por ejemplo, el documento 20080025958). Un ARN pequeño horquillado o ARN corto horquillado (ARNhc) es una secuencia de ARN que hace una estrecha vuelta de horquilla que se puede utilizar para silenciar la expresión genética mediante interferencia del ARN. El ARNhc utiliza un vector introducido en las células y utiliza el promotor U6 para asegurarse de que el ARNhc siempre esté presente. Este vector se pasa habitualmente a las células hijas, permitiendo que el silenciamiento genético se herede. La estructura en horquilla del ARNhc se escinde mediante la maquinaria celular en ARNip, que se une entonces al complejo de silenciamiento inducido por el ARN (RISC). Este complejo se une y escinde los ARNm que coinciden con el ARNip que se une a él. El ARNhc se transcribe mediante la polimerasa III.

La presente divulgación también incluye composiciones y formulaciones farmacéuticas que incluyen compuestos de ARNi de la presente invención como se describe posteriormente.

El SCF existe en ambas formas transmembrana y soluble. Al escindir el dominio soluble del SCF de la forma transmembrana, se libera el SCF de la superficie celular para funcionar como el ligando del c-Kit. Por lo tanto, se contempla que la actividad del SCF se puede alterar inhibiendo la liberación del SCF soluble de la forma unida a la membrana, por ejemplo, inhibiendo o reduciendo de otra manera la actividad de una proteasa que escinde el dominio soluble de la forma unida a la membrana.

Además, se contempla como parte de la divulgación que el SCF puede inhibirse mediante productos químicos (por ejemplo, una molécula pequeña, por ejemplo, un agente farmacológico) u otros agentes biológicos que se unan o modifiquen el SCF. Por ejemplo, un experto habituado en la técnica puede diseñar y producir aptámeros de ARN u otros ácidos nucleicos que reconozcan específicamente y se unan al SCF, por ejemplo, utilizando SELEX u otros procedimientos de evolución *in vitro* conocidos en la técnica. Además, La actividad del SCF se puede inhibir mediante la degradación específica del SCF o induciendo una conformación alterada del SCF, de manera que sea menos eficaz en la interacción con el c-Kit. En algunas realizaciones, el inhibidor del SCF es una proteína "diseñada con repeticiones de anquirina" (DARPin) (véase, por ejemplo, Stumpp MT y Amstutz P, "DARPin: a true alternative to antibodies", Curr Opin Drug Discov Devel 2007, 10(2): 153-59). En algunas realizaciones, el SCF se inhibe mediante una molécula pequeña, por ejemplo, una molécula pequeña que se una al SCF y bloquee su función (por ejemplo, que inhiba su unión y/u otra interacción (por ejemplo, una interacción activadora) con el receptor c-Kit).

Se contemplados como parte de la divulgación que la alteración de la actividad del SCF puede efectuarse inhibiendo la expresión del SCF, por ejemplo, inhibiendo la transcripción del SCF, inhibiendo la traducción del SCF, inhibiendo el procesamiento del ARNm del SCF, inhibiendo el procesamiento del polipéptido del SCF, inhibiendo el plegamiento del polipéptido del SCF, inhibiendo el tráfico de SCF dentro de una célula, o inhibiendo la inserción del SCF en la membrana plasmática. La actividad del SCF se puede alterar mediante cambios en la estructura de la cromatina u otros medios de regulación epigenética del SCF (por ejemplo, cambios en la metilación del ADN). También, se puede alterar la actividad del SCF secuestrando el SCF específicamente en una vesícula u otro compartimento celular que oculte su acción con el c-Kit.

4. Terapias que utilizan los inhibidores del SCF

La inhibición del SCF es útil en terapias para tratar enfermedades. En consecuencia, se proporcionan en el presente documento terapias que comprenden la inhibición del SCF para beneficiar individuos que padecen una enfermedad. En particular, como se muestra en el presente documento, los estados de enfermedad que implican fibrosis y remodelación tisular demuestran una actividad aberrante del SCF. Por ejemplo, los fibroblastos aislados de los individuos enfermos con fenotipos fibróticos o remodelación tisular responden directamente al SCF, lo que da como resultado la generación de un fenotipo más grave que incluye el aumento de la producción de colágeno. Por lo tanto, como se muestra en el presente documento, la inhibición del SCF puede afectar significativamente la generación de consecuencias graves de la enfermedad que incluyen la inflamación y la remodelación del tejido diana. También se contemplan terapias que direccionan el SCF durante la generación de fibrosis asociada con trastornos agudos y crónicos que tienen un curso de enfermedad dinámico o un curso de enfermedad más predecible. Las indicaciones que pueden beneficiarse de la terapia de inhibición del SCF incluyen, pero no se limitan a, fibrosis pulmonar idiopática, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, síndrome de dificultad respiratoria aguda, fibrosis quística, fibrosis peribronquial, neumonitis por hipersensibilidad, asma, escleroderma, inflamación, cirrosis hepática, fibrosis renal, fibrosis parenquimatosa, fibrosis endomiocárdica, fibrosis mediastínica, fibrosis nodular subepidérmica, histiocitoma fibroso, fibrotórax, fibrosis hepática, fibromialgia, fibrosis gingival, y fibrosis inducida por radiación.

De manera importante, las terapias que se dirigen al SCF reducen o eliminan los efectos tóxicos asociados con otras terapias similares, por ejemplo, las que se dirigen al c-Kit. Estos efectos tóxicos no deseables se asocian con el direccionamiento de una diana intracelular, más que extracelular, y con la mayor diseminación y cambios generales en la señalización celular que resulta. Aunque las terapias no se limitan en cuanto a su vía de administración, las realizaciones de la tecnología proporcionadas en el presente documento suministran el inhibidor del SCF por las vías respiratorias mediante administración intranasal. Dicha administración permite el suministro directo del agente terapéutico a los tejidos diana en las enfermedades pulmonares que implican fibrosis y remodelación tisular, más que

basarse en un suministro sistémico mediante una composición administrada por vía oral.

En determinadas realizaciones, se puede administrar una solución fisiológicamente apropiada que contenga una concentración eficaz de un anticuerpo específico del SCF por vía tópica, intraocular, parenteral, oral, intranasal, por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, o mediante cualquier otro medio eficaz. En particular, el anticuerpo puede suministrarse en las vías respiratorias de un sujeto mediante administración intranasal. De manera alternativa, un tejido puede recibir una composición fisiológicamente apropiada (por ejemplo, una solución tal como una solución salina o tampón de fosfato, una suspensión, o una emulsión, que sea estéril) que contenga una concentración eficaz de un anticuerpo específico del SCF mediante inyección directa con una aguja o mediante un catéter u otro tubo de suministro. Se puede utilizar cualquier dispositivo de creación de imágenes tal como los rayos-X, un sonograma, o sistema de visualización por fibra óptica para localizar el tejido diana y guiar la administración. En otra alternativa, se puede administrar sistémicamente una solución fisiológicamente apropiada que contenga una concentración eficaz de un anticuerpo específico del SCF en la circulación sanguínea para tratar el tejido que no se puede alcanzar directamente o aislado anatómicamente. Dichas manipulaciones tienen el objetivo común de colocar una concentración eficaz de un anticuerpo específico del SCF en contacto suficiente con el tejido diana para permitir que el anticuerpo específico del SCF entre en contacto con el tejido.

Con respecto a la administración de un inhibidor del SCF (por ejemplo, un anticuerpo específico del SCF) a un sujeto, se contempla que el inhibidor del SCF se administra en una cantidad farmacéuticamente eficaz. Un experto en la técnica reconoce que una cantidad farmacéuticamente eficaz varía dependiendo del agente terapéutico utilizado, la edad del sujeto, el estado físico, y el sexo, y de la extensión de la enfermedad en el sujeto. En general, la dosificación no debería ser tan grande como para que produzca efectos secundarios adversos, tal como síndromes de hiperviscosidad, edema pulmonar, fallo cardíaco congestivo, y similares. La dosificación también se puede ajustar por el médico o el veterinario individual hasta alcanzar el objetivo terapéutico deseado.

Como se utiliza en el presente documento, la cantidad actual que engloba la expresión "cantidad farmacéuticamente eficaz" dependerá de la vía de administración, el tipo de sujeto que se va a tratar, y las características físicas del sujeto específico en consideración. Estos factores y sus relaciones para determinar esta cantidad se conocen bien por los facultativos expertos en las técnicas médicas, veterinarias, y otras técnicas relacionadas. Esta cantidad y el procedimiento de administración se puede hacer a medida para conseguir una eficacia óptima, pero dependerá de factores tales como el peso, la dieta, la medicación concurrente, y otros factores que reconocerán los expertos en la técnica.

En algunas realizaciones, se administra un inhibidor del SCF (por ejemplo, un anticuerpo específico del SCF) de acuerdo con la tecnología proporcionada en el presente documento en una cantidad farmacéuticamente eficaz. En algunas realizaciones, se administra un inhibidor de SCF (por ejemplo, un anticuerpo específico del SCF) en una dosis terapéuticamente eficaz. La cantidad y la frecuencia de dosificación se seleccionan para crear un nivel eficaz del inhibidor del SCF sin efectos sustancialmente perjudiciales. Cuando se administra, la dosificación de un inhibidor del SCF (por ejemplo, un anticuerpo específico del SCF) generalmente variará desde 0,001 a 10.000 mg/kg/día o dosis (por ejemplo, 0,01 a 1000 mg/kg/día o dosis; 0,1 a 100 mg/kg/día o dosis).

Las composiciones farmacéuticas comprenden preferentemente uno o más compuestos de la presente invención asociados con uno o más vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticamente aceptables. Los vehículos farmacéuticamente aceptables se conocen en la técnica tal como los que se describen en, por ejemplo, Remingtons Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro ed., 1985).

En algunas realizaciones, se administra una única dosis del inhibidor del SCF (por ejemplo, un anticuerpo específico del SCF) de acuerdo con la tecnología proporcionada en el presente documento a un sujeto. En otras realizaciones, se administran múltiples dosis en dos o más puntos temporales, separados por horas, días, semanas, etc. En algunas realizaciones, los compuestos se administran en un largo período de tiempo (por ejemplo, de manera crónica), por ejemplo, durante un período de meses o años (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, o más meses o años; por ejemplo, durante toda la vida del sujeto). En dichas realizaciones, los compuestos se pueden tomar con una base programada regular (por ejemplo, diariamente, semanalmente, etc.) durante la duración del periodo extenso.

En algunas realizaciones, se co-administra un inhibidor del SCF (por ejemplo, un anticuerpo específico del SCF) de acuerdo con la tecnología proporcionada en el presente documento con otro compuesto o más de uno de otros compuestos (por ejemplo, 2 o 3 o más de otros compuestos).

5. Kits

Algunas realizaciones proporcionan en el presente documento, kits para el tratamiento de un sujeto. En algunas realizaciones, los kits incluyen un inhibidor del SCF y soluciones y tampones apropiados. Las realizaciones incluyen todos los controles e instrucciones para su uso.

Ejemplos

Materiales y procedimientos

Secuencias de nucleótidos y proteínas del SCF

El gen humano que codifica el Factor Celular de células madre (SCF) también se conoce como ligando kit y tiene el símbolo oficial KITLG y HGNC número HGNC:6343. El SCF también se conoce como SF; MGF; SCF; FPH2; KL-1; Kitl; SHEP7; y ligando de kit. Se han encontrado dos variantes de transcripción que codifican isoformas diferentes para este gen. El precursor de la isoforma b del SCF (ligando de kit) está disponible en el GenBank con los números de referencia NM_000899 (transcripción de ARNm; SEQ ID NO: 3) y NP_000890 (secuencia proteica; SEQ ID NO: 4). El precursor de la isoforma a del SCF (ligando de kit) está disponible en el GenBank con los números de referencia NM_003994 (transcripción de ARNm; SEQ ID NO: 5) y NP_003985 (secuencia proteica; SEQ ID NO: 6). La Secuencia Genética de Referencia del NCBI tiene el número de referencia NG_012098 (SEQ ID NO: 7). Para ambas isoformas, los primeros 25 aminoácidos comprenden el péptido de señal y la forma madura comienza en el aminoácido 26. Los primeros 11 aminoácidos de la forma madura son EGICRNRVTNN (SEQ ID NO: 8).

Modelo de bleomicina

Se indujo una fibrosis pulmonar intersticial en ratones hembra libres de patógenos específicos (SPF), CBA/J (de 6-8 semanas de edad; The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME), mediante inyección i.t. de 0,003 U de bleomicina (Blenoxane, sulfato de bleomicina estéril; Bristol-Meyers Pharmaceuticals, Evansville, IN; 0,15 U/kg de peso corporal de ratón) disuelta en 60 µl de solución salina tampón de fosfato (PBS). Los controles recibieron 60 µl de PBS por la misma vía. Todos los procedimientos se llevaron a cabo en un entorno estéril y se aprobaron por el comité institucional de uso y cuidado animal.

Histología del pulmón completo

Después de una eutanasia inducida por anestesia, se inflaron los pulmones completos de los ratones desafiados con bleomicina con formalina al 10%, se disecaron, y se colocaron en formalina reciente durante 24 horas. Se utilizaron técnicas histológicas de rutina para embeber el pulmón completo en parafina y se tiñeron secciones de 5 µm con hematoxilina y eosina.

Producción y administración de anticuerpos anti-SCF policlonales

Se generaron anticuerpos anti-SCF inmunizando conejos con el SCF recombinante (proteína completa) y se generaron anticuerpos policlonales específicos del SCF. Los anticuerpos policlonales se aislaron del suero utilizando una columna de proteína G. La parte de IgG aislada se cuantificó y se utilizó con las concentraciones especificadas suspendida en solución salina. La IgG del suero pre-inmune se aisló de manera similar para su uso como control. En resumen, se dieron 100, 150 o 200 µg del control o el anti-SCF a los ratones mediante administración intranasal 7 días después del tratamiento con bleomicina. Este tratamiento se repitió con una base diaria hasta 12 días después de la administración de bleomicina. Por lo tanto, el protocolo de tratamiento se considera terapéutico.

Generación de anticuerpos monoclonales anti-humanos de ratón

Después de identificar un péptido humano inmunogénico (por ejemplo, de SEQ ID NO: 1 u 8), los ratones se inmunizaron con un protocolo convencional. La determinación de altos títulos de anticuerpo en el suero indicaba la inmunización apropiada y se hicieron los hibridomas de fusión. Se analizaron los sobrenadantes del cultivo de clones individuales en cuanto a anticuerpos específicos del SCF y se escogieron basándose en la especificidad. Cinco hibridomas que producían anticuerpos monoclonales específicos contra el péptido se propagaron y el monoclonal con el título más alto se ensayó posteriormente en cultivos biológicamente relevantes. En algunas realizaciones, se utilizó un péptido que tiene la secuencia EGICRNRVTNN (SEQ ID NO: 8) para generar un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal). En algunas realizaciones, se utiliza cualquier fragmento peptídico (por ejemplo, un fragmento antigénico) de la secuencia proteica del SCF (por ejemplo, como se proporciona en la SEQ ID NO: 4 y/o SEQ ID NO: 6) para generar los anticuerpos. En algunas realizaciones, se utilizan mutantes o formas variantes (por ejemplo, que comprendan una o más sustituciones de aminoácidos con respecto a las secuencias proporcionadas por la SEQ ID NO: 4 y la SEQ ID NO: 6) del SCF para proporcionar un péptido para la generación de anticuerpos. Se tiene que entender que estas realizaciones comprenden adiciones, eliminaciones, sustituciones, modificaciones postraduccionales (por ejemplo, glicosilación, ciclación, modificación de los extremos N- y C-, etc.) y otras variaciones de proteínas y péptidos que se conocen en la técnica de la biología molecular según se aplique para proporcionar un péptido para la generación de anticuerpos.

Ensayo de los anticuerpos monoclonales anti-humanos de ratón

Para demostrar que los anticuerpos monoclonales inhiben al SCF, se ensayaron líneas de mastocitos que son sensibles al SCF. Se utilizó en primer lugar la línea celular HMC-1, una línea celular de mastocitoma que expresa el c-Kit y responde al SCF. En resumen, se cultivaron las células HMC-1 en medio de cultivo específico y se colocaron en placas de cultivo tisular de 24 pocillos a una concentración de 1×10^6 células/ml. Se mezcló un SCF humano recombinante (1-100 ng/ml) con anticuerpo monoclonal anti-SCF (12 µg/ml) y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Después de la incubación, se añadió el anticuerpo/SCF o el SCF solo a las células HMC-1. Tras 1 hora o 24 horas, las células HMC-1 cultivadas se recolectaron y se midieron los niveles de ARNm y proteína como indicación de la inhibición del SCF por los anticuerpos monoclonales.

Análisis de la expresión de ARNm mediante PCR cuantitativa

Las células o el tejido que se va a ensayar se dispersaron en 1 ml de reactivo Trizol (Invitrogen). Se aisló el ARN como se describe (Invitrogen) y se transcribieron inversamente 5 µg de ARNm para evaluar la expresión genética. Se determinó la detección de ARNm de citocina utilizando los conjuntos de sonda/cebador disponibles previamente (PE Biosystems, Foster City, CA) y se analizó utilizando un Sistema de Detección de Secuencias ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Se midió la GAPDH como control para la normalización de la expresión del ARNm. Se calcularon los cambios de la expresión genética con respecto a la expresión genética en ratones sin desafiar.

Determinación de la producción de citocinas

Los niveles proteicos de citocinas se cuantificaron utilizando un ensayo de citocinas basado en perlas Bio-Plex adquirido en Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA). Utilizando los protocolos convencionales, el nivel de citocinas podía evaluarse rápida y constantemente con esta metodología.

Análisis estadístico

Se analizaron los datos utilizando un software Prism GraphPad. A menos que se especifique otra cosa, los datos que se muestran son representativos de dos o más experimentos. La significación estadística se determinó mediante ANOVA de una vía, seguido por un ensayo de Newman-Keuls posterior. se consideraron las diferencias significativas como $p < 0,05$.

Aislamiento y propagación de fibroblastos pulmonares de poblaciones de pacientes

La Junta de Revisión Institucional de la Escuela de Medicina de la Universidad de Michigan aprobó este estudio. Todos los pacientes se sometieron a una evaluación clínica, que incluía radiografía de tórax, mediciones de la función pulmonar, y tomografía computarizada de sección fina antes de la broncoscopia de fibra óptica. En estos pacientes, se determinó neumonía intersticial a partir de una recopilación de síntomas, síntomas fisiológicos, y hallazgos radiográficos. Se obtuvieron biopsias quirúrgicas de pulmón mediante el Centro Clínico de la Escuela Médica de la Universidad de Michigan de pacientes sospechosos de tener neumonía intersticial entre mayo de 2000 y mayo de 2002. Se obtuvo pulmón histológicamente normal de especímenes resecados en pacientes sometidos a resección torácica. Cada biopsia se procesó por separado utilizando una técnica estéril en una cámara de flujo laminar y se procesó para el cultivo de las líneas de fibroblastos primarios. Dos patólogos que desconocían cualquier otro hallazgo clínico revisaron independientemente cada biopsia y la clasificación histológica se basó en los criterios publicados previamente para la neumonía intersticial idiopática.

Las biopsias de neumonía intersticial y normales se picaron finamente y las piezas de tejido dispersas se colocaron en matraces de cultivo de 150 cm² (Corning Inc., Corning, NY) que contenían medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, BioWhittaker, Walkersville, MD) suplementado con un 15% de suero fetal bovino (DMEM-15, BioWhittaker), 1 mmol/l de glutamina (BioWhittaker), 100 U/ml de penicilina (BioWhittaker), 100 µg/ml estreptomycin (BioWhittaker), y 0,25 µg anfotericina B (Fungizone; BioWhittaker). Todas las líneas celulares primarias de pulmón se mantuvieron en DMEM-15 a 37 °C en una incubadora con un 5 % de CO₂ y se pasaron en serie un total de cinco veces para dar lugar a poblaciones puras de fibroblastos pulmonares. Todas las líneas celulares primarias de fibroblastos se utilizaron en los pasajes 6 a 10 en los experimentos descritos a continuación y todos los experimentos se llevaron a cabo en condiciones comparables.

1. El anticuerpo anti-SCF reduce la fibrosis y la inflamación

Los experimentos que se llevaron a cabo durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología demostraron que el anticuerpo anti-SCF reducía la fibrosis y la inflamación. La fibrosis pulmonar se indujo en los ratones como se ha descrito. El día 7 después de la lesión por bleomicina, los ratones se sometieron a un tratamiento con anticuerpos anti-SCF suministrados en las vías respiratorias mediante administración intranasal. El tratamiento continuó hasta el día 12 después de la exposición a la bleomicina. Los pulmones se recolectaron el día 16 y se examinaron mediante microscopio y se tomaron una serie de micrografías. La histología pulmonar demostraba que los anticuerpos anti-SCF reducían la inflamación total. Además, la tinción tricrómica de Masson, que demarca el depósito de colágeno, estaba reducida.

2. El anticuerpo anti-SCF reduce los niveles de SCF, hidroxiprolina, IL-25 e IL-13

Se monitorizaron los niveles de hidroxiprolina y citocinas particulares mientras se desarrollaban las realizaciones de la tecnología. Las secciones de tejido pulmonar del experimento anterior se examinaron en cuanto a la presencia de hidroxiprolina, un precursor del colágeno. Los datos demostraron que el anticuerpo anti-SCF reducía la producción de hidroxiprolina y los niveles plasmáticos del SCF de una manera dependiente de la dosis (Figura 1A y D). También, la expresión de IL-25 e IL-13, medida en función de los niveles de ARNm, se había reducido, al igual que la expresión del receptor de la IL-25 (Figura 1B, C, y E).

En particular, los experimentos ensayaban el efecto del tratamiento con anticuerpos anti-SCF en el modelo BLM (Figura 1). Los ratones se trataron con solución salina (Figura 1, "SAL") o BLM (Figura 1, "BLM") el día 0. Los días 8

y 12, también se trataron diferentes grupos por vía intratraqueal con no inmune (Figura 1, "IgG") o anticuerpos anti-SCF (Figura 1, "aSCF") con las dosis indicadas. Se adquirieron y examinaron las secciones pulmonares teñidas con H&E de cada grupo de tratamiento. Se cuantificó la fibrosis bioquímicamente según el contenido pulmonar de hidroxiprolina (Figura 1A). Los pulmones se analizaron entonces en cuanto a los ARNm de IL-13 mediante PCR en tiempo real (Figura 1C). Entonces se analizaron el plasma y el tejido pulmonar recolectado de los ratones tratados con SAL o BLM en cuanto al SCF soluble mediante un ELISA (Figura 1D) o el ARNm de IL-25 mediante PCR en tiempo real (Figura 1B). Los valores representan las medias $\pm$ el error estándar con un $n = 7$. Un único asterisco (*) indica una significación estadística ($P < 0,05$) cuando se compara con el grupo de control de solución salina, mientras que un doble asterisco (**) indica significación respecto al grupo de control de BLM + IgG.

3. La IL-4 estimula la expresión de c-kit en fibroblastos humanos

Los experimentos que se llevaron a cabo durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología demostraron que la IL-4 estimulaba la expresión de c-kit en fibroblastos humanos. Además del modelo de ratón de inflamación pulmonar, el receptor del SCF se expresa en poblaciones de fibroblastos de pacientes diagnosticados con neumonitis por hipersensibilidad, y que tienen por tanto un entorno pro-fibrótico. Se cultivaron fibroblastos pulmonares de áreas normales de pulmones de pacientes (normal) y los diagnosticados de neumonitis por hipersensibilidad. Se midió la expresión de c-kit después de la estimulación con la IL-4 con 1-10 ng/ml. Se evaluaron las líneas celulares individuales (133, 131, 173, 177A, 177B) utilizando una PCR en tiempo real. Al comparar con los fibroblastos pulmonares cultivados de pacientes sin enfermedad fibrótica, los fibroblastos de los pacientes con neumonitis por hipersensibilidad presentaban una regulación positiva significativa del c-kit cuando se estimulaban con la IL-4, una citocina asociada con fibrosis. Los datos demostraban que el SCF activaba los fibroblastos de las lesiones inflamatorias, pero no los del tejido normal, y promovía la expresión de genes asociados con fibrosis incluyendo el colágeno (Figura 2).

4. Un anticuerpo monoclonal anti-humano de ratón bloquea la activación de mastocitos HMC inducida por el SCF.

Los experimentos que se llevaron a cabo durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología demostraban que el anticuerpo monoclonal específico del SCF inhibía la activación de las células HMC-1 para la producción de MCP-1. La activación de mastocitos es una respuesta clásica inducida por el SCF que se puede utilizar para monitorizar la neutralización por anticuerpos de las respuestas de citocinas mediadas por el SCF. Los estudios previos habían demostrado que la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP)-1 está fuertemente regulada positivamente por el SCF en los mastocitos. Se produjo un anticuerpo monoclonal contra la SEQ ID NO: 1 (Figura 3). La eficacia de este anticuerpo se ensayó utilizando una línea de mastocitos humana, HMC-1, estimulada con 100 ng/ml de SCF. El anticuerpo monoclonal (6 μ g/ml) se preincubó con el SCF recombinante durante 5 minutos antes de colocar el SCF o el SCF más el anti-SCF sobre las células HMC-1 cultivadas (1×10^6 células/ml). Las células se incubaron posteriormente durante 12 horas, tras las cuales se recolectó el sobrenadante libre de células y se analizó la MCP-1 mediante el BioPlex. Los datos ilustran que el anticuerpo monoclonal específico del SCF inhibía la activación de las células HMC-1 para la producción de MCP-1 (Figura 4).

5. Los ratones deficientes en SCF sometidos a lesión inducida por BLM tienen una fibrosis reducida.

Durante el desarrollo de las realizaciones de la tecnología que se proporciona en el presente documento, se examinaron los efectos de la deficiencia de SCF en ratones mutantes $\text{Kit}^{\text{S1}}/\text{Kit}^{\text{S1-d}}$ (Figura 5). Estos ratones tienen una eliminación completa del gen del SCF en un alelo (S1) y una eliminación del ligando unido a la membrana en el otro (S1^{d}), lo que disminuye significativamente la expresión del SCF soluble. Cuando estos ratones y sus controles de tipo silvestre (TS) se sometían a lesión pulmonar inducida por BLM, había una reducción significativa de la fibrosis en los ratones mutantes en comparación con los ratones de tipo silvestre, tanto morfológicamente (tinción tricrómica de Masson) como bioquímicamente mediante el análisis de hidroxiprolina (Figura 5).

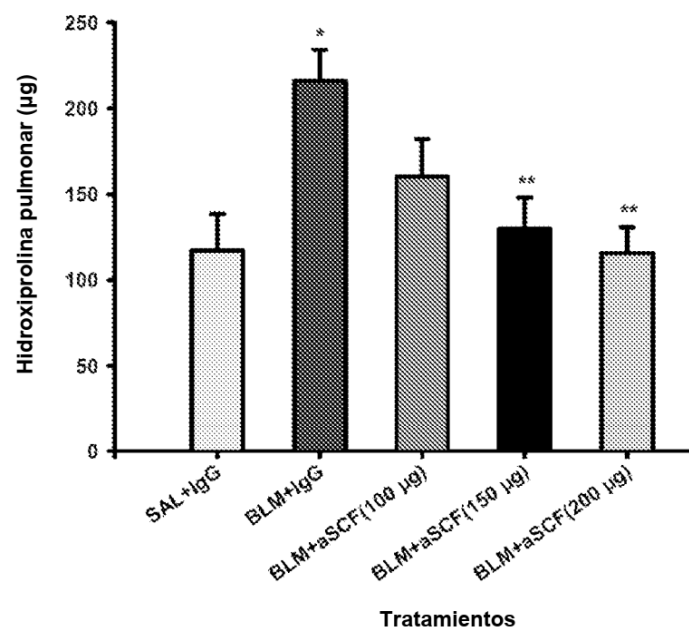
Los ratones de tipo silvestre y deficientes en SCF se trataron con solución salina ("SAL") o BLM ("BLM") el día 0 y se recolectaron los pulmones 21 días más tarde. Se cuantificó bioquímicamente la fibrosis según el contenido pulmonar de hidroxiprolina. Los valores representan la media $\pm$ la desviación típica con un $n = 3$. Un único asterisco (*) indica una significación estadística ($P < 0,05$) cuando se compara con la media del control TS tratado con solución salina, mientras que el doble asterisco (**) indica la significación cuando se compara con el grupo TS tratado con BLM.

También se notó una supresión similar de la expresión de citocina e inducción de telomerasa en ratones S1/S1d. Estos datos en conjunto indican un papel esencial para la fibrosis pulmonar inducida por la señalización SCF/c-Kit.

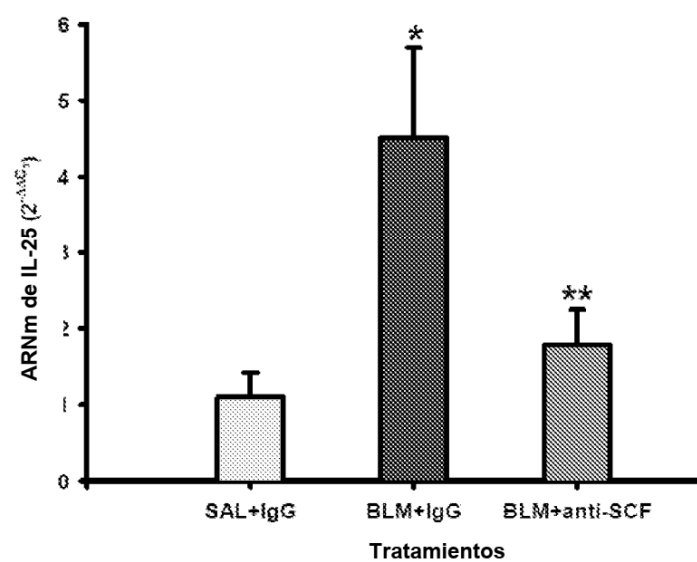
REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal o un fragmento de anticuerpo de unión al antígeno que se une específicamente al péptido de SEQ ID NO: 1.
- 5 2. Un anticuerpo monoclonal o un fragmento de anticuerpo de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
3. Un anticuerpo monoclonal o un fragmento de anticuerpo de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso como un medicamento.
- 10 4. Un anticuerpo monoclonal o un fragmento de anticuerpo de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso en el tratamiento de una enfermedad fibrótica en un sujeto, en el que la enfermedad fibrótica se selecciona de entre fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, síndrome de dificultad respiratoria aguda, fibrosis quística, fibrosis peribronquial, neumonitis por hipersensibilidad, asma, escleroderma, inflamación, cirrosis hepática, fibrosis renal, fibrosis parenquimatosa, fibrosis endomiocárdica, fibrosis mediastínica, fibrosis retiniana, fibrosis nodular subepidérmica, histiocitoma fibroso, fibrotórax, fibrosis hepática, fibromialgia, fibrosis gingival, o fibrosis inducida por radiación.
- 15 5. El anticuerpo monoclonal o un fragmento de anticuerpo de unión al antígeno para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la enfermedad fibrótica es una fibrosis pulmonar.
6. El anticuerpo monoclonal o un fragmento de anticuerpo de unión al antígeno para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión al antígeno evita o reduce la gravedad de al menos un síntoma de la enfermedad fibrótica en un sujeto, preferentemente en el que la enfermedad fibrótica es fibrosis pulmonar.
- 20 7. El anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo de unión al antígeno para su uso de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.
8. El anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo de unión al antígeno para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7 en el que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de unión al antígeno se suministra por las vías respiratorias del sujeto.
- 25 9. El anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo de unión al antígeno para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, en el que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión al antígeno inhibe un factor de células madre que se origina a partir de una célula de la médula ósea, una célula hepática, una célula epitelial, una célula de músculo liso, una célula renal, o un fibroblasto.
- 30 10. Una composición que comprende un anticuerpo monoclonal o un fragmento de anticuerpo de unión al antígeno que se une específicamente al péptido de SEQ ID NO: 1.
11. Un kit que comprende el anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo de unión al antígeno de acuerdo con la reivindicación 1 y/o la composición de la reivindicación 10, un medio para la administración de la composición a un sujeto, e instrucciones para su uso.
- 35 12. Un procedimiento de preparación de un anticuerpo monoclonal aislado o un fragmento de anticuerpo de unión al antígeno que se une específicamente a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos proporcionada por la SEQ ID NO:1, comprendiendo el procedimiento las etapas de: a) proporcionar un hibridoma obtenido por inmunización de un huésped con un péptido de SEQ ID NO: 1, aislar una célula inmunitaria del huésped inmunizado, y preparar dicho hibridoma utilizando dicha célula inmunitaria; y b) aislar el anticuerpo monoclonal o el fragmento de anticuerpo de unión al antígeno.
- 40

Figura 1

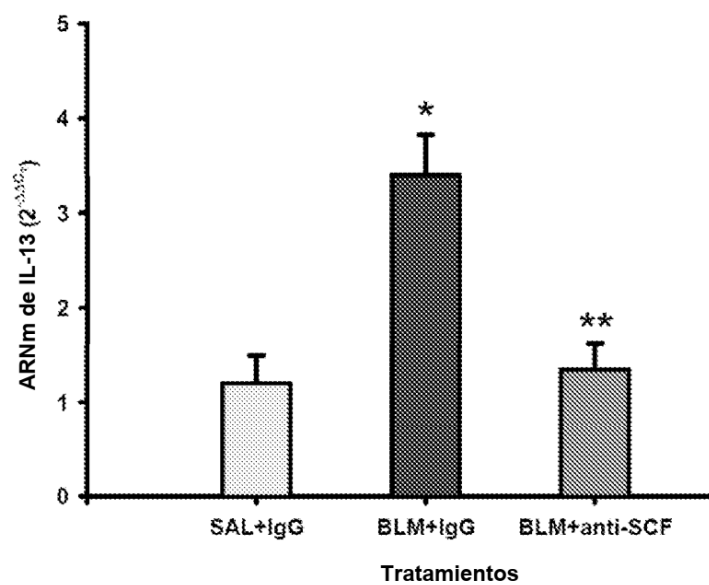


A

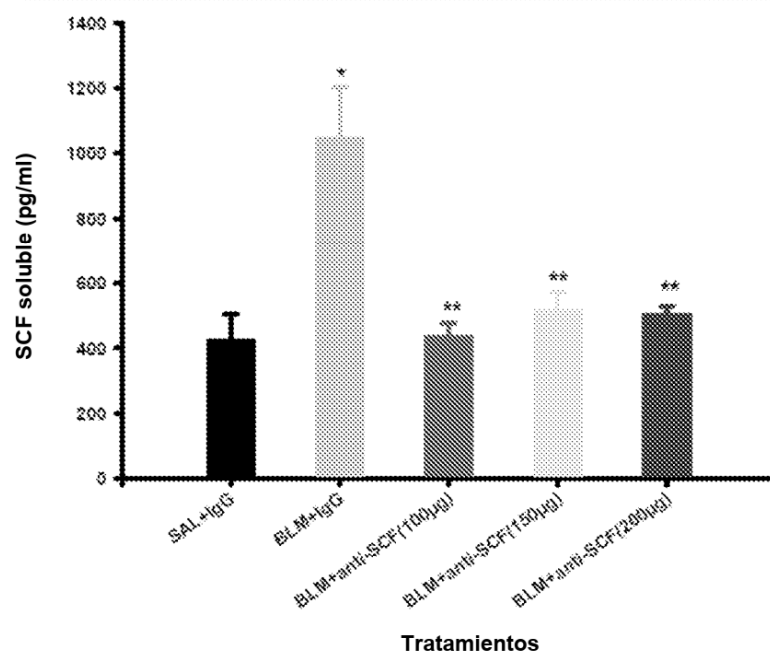


B

Figura 1 (continuación)

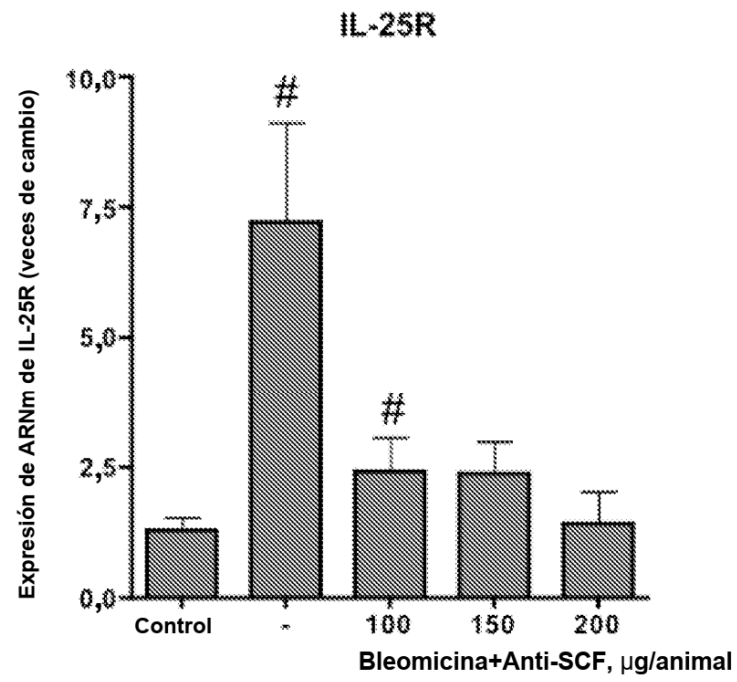


C



D

Figura 1 (continuación)



E

Figura 2

La IL-4 estimula la expresión de c-kit en fibroblastos humanos

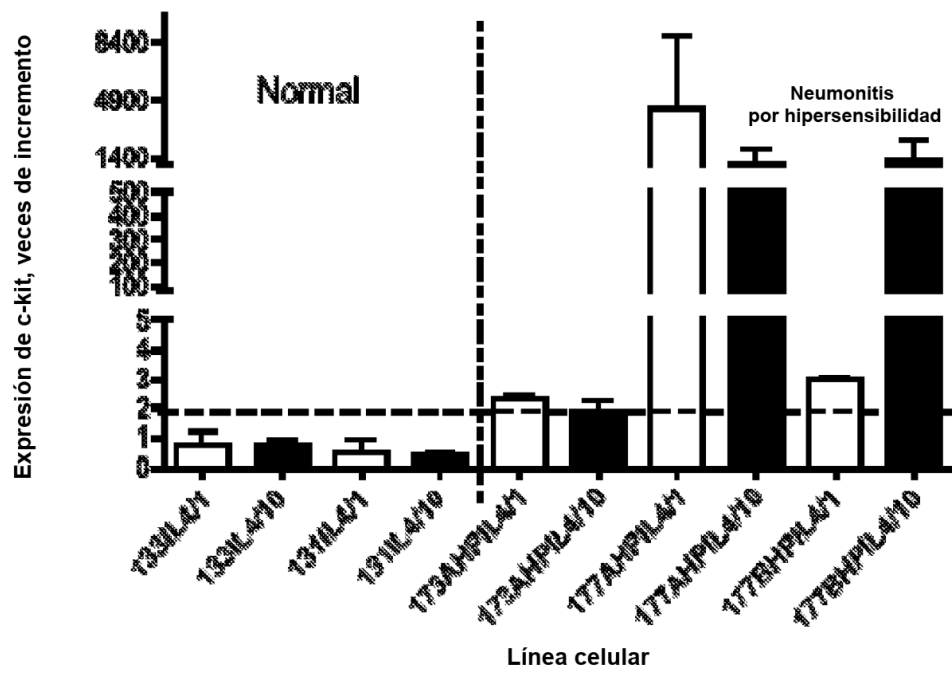


Figura 3

La secuencia de aminoácidos de un péptido inmunogénico utilizado para producir anticuerpos específicos del SCF
(SEQ ID NO: 1)

Ser Ser Ser Asn Arg Lys Ala Lys Asn Pro Pro Gly Asp Ser Cys

La secuencia de nucleótidos correspondiente a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 2)

TCG TCG TCG AAC CGC AAA GCG AAA AAC CCG CCG GGC GAT TCG TGC

Ser Ser Ser Asn Arg Lys Ala Lys Asn Pro Pro Gly Asp Ser Cys

Figura 4

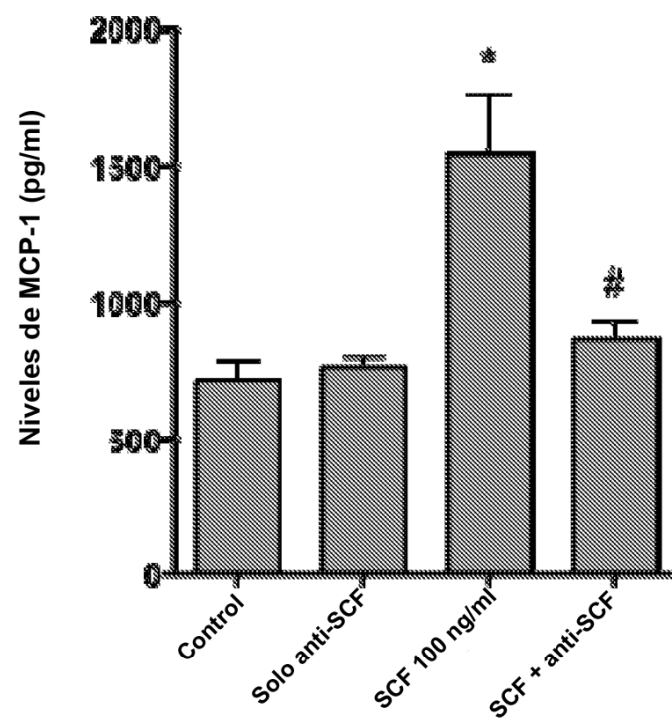


Figura 5

