



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 307 911**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **03712443 .5**

(96) Fecha de presentación : **02.04.2003**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1493033**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **05.01.2005**

(54)

Título: **Uso de SC6 para el diagnóstico y tratamiento del carcinoma de mama.**

(30)

Prioridad: **02.04.2002 GB 0207533**

(73)

Titular/es: **UCB, S.A.**
Allée de la Recherche 60
1070 Bruxelles, BE

(45)

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2008

(72)

Inventor/es: **Patel, Sonal**

(45)

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2008

(74)

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 307 911 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

Uso de SC6 para el diagnóstico y tratamiento del carcinoma de mama.

5 Esta invención se refiere a nuevas aplicaciones del portador de solutos 6 (SC6), un transportador de la taurina, en el diagnóstico, escrutinio, tratamiento y profilaxis del carcinoma de mama. También se incluyen las composiciones que contienen la proteína, como vacunas y agentes que modulan la expresión de las proteínas o su actividad, incluyendo anticuerpos que son inmunoespecíficos para la proteína.

10 *El portador de solutos 6*

El gen del portador de solutos 6, con número de registro del NCBI NM_003043 fue clonado y caracterizado por Ramamoorthy, S. *et al.* (1994, Biochem J., 300 (Pt 3), 893-900) y codifica una proteína transportadora de taurina. El ADNc fue aislado de una genoteca de ADNc de placenta humana y está altamente relacionado con el transportador de taurina del cerebro de rata (US 5.658.786). La transfección de este ADNc en una célula HeLa da como resultado un aumento notable de la actividad de transporte de la taurina. La actividad del transportador inducido por ADNc depende de la presencia de Na⁺ así como de Cl⁻. La estequiometría Na⁺/Cl⁻/taurina para el transportador clonado es 2:1:1. El transportador es específico para taurina y otros beta- amino ácidos, incluyendo beta-alanina, y presenta una alta afinidad por la taurina (constante de Michaelis-Menten de aproximadamente 6microM). La secuencia nucleótidos de la región codificante predice una proteína de 620 amino ácidos con un M(r) calculado de 69.858 Da (Ramamoorthy S, *et al.*, 1994).

La patente WO01/90148 desarrolla métodos para el diagnóstico, tratamiento, o prevención de trastornos asociados con una expresión anormal de los transportadores de neurotransmisores, incluyendo el SC6, en el que alguno de esos trastornos son el cáncer de próstata y los neoplasmas cerebrales.

Función celular de la taurina

La taurina (ácido 2-aminoetanosulfónico), un beta-amino ácido ubicuo, es esencial, con reservas, en el hombre. Se deriva de la metionina y de la cisteína y no se utiliza en la síntesis de proteínas aunque se encuentra libre o en algunos péptidos simples. La taurina intracelular normalmente se mantiene en concentraciones altas aunque su papel parece ser específico de la célula. Los niveles de taurina en plasma también son altos, aunque se han observado descensos en respuesta a daños quirúrgicos y numerosos estados patológicos incluyendo cáncer y sepsis (Stapleton PP, *et al.* (1998) J Parenter Enteral Nutr, Jan-Feb, 22 (1),42-8).

La taurina es un conocido neuromodulador y un amino ácido inhibidor. Otra función clave es como osmolito en la mayoría de las células. De este modo, puede regular muchos procesos biológicos, incluyendo el ritmo cardiaco, la función contráctil, la presión sanguínea, la agregación de plaquetas, la excitabilidad neuronal, la temperatura del cuerpo, el aprendizaje, el comportamiento motor, el consumo de alimentos, la agudeza visual, la movilidad del esperma, la viabilidad y proliferación celular, el metabolismo energético y la síntesis de ácidos biliares. Muchas de estas acciones están asociadas con alteraciones en el transporte de iones o en la fosforilación de proteínas. Aunque los efectos en el transporte de iones se han atribuido a cambios en la estructura de la membrana, pueden estar igualmente influidos por un cambio en la actividad de los transportadores afectados. La actividad de los transportadores puede estar alterada por una expresión intensificada de la proteína, cambios en el estado de fosforilación de la proteína y cambios citoesqueléticos. Curiosamente, estos tres sucesos están afectados por el estrés osmótico (Schaffer S, *et al.*, (2000) Amino Acids, 19 (3-4), 527-46).

Adicionalmente, la taurina se ha asociado con la hipoxia, la hipoglucemia, la isquemia, la antioxidación (estrés oxidativo y presencia de radicales libres), la detoxificación y la estimulación de la glicólisis y la glicogénesis.

Un papel importante de la taurina es la protección celular contra la hipoxia (Canas PE (1992) Acta Physiol Pharmacol Ther Latinoam, 42(3), 133-7). Estudios en cultivos de células renales han indicado que cuando la taurina se administró durante la hipoxia, el daño celular concomitante se redujo considerablemente. Por lo tanto, se redujo el deterioro osmoregulador durante la hipoxia y la reoxigenación, de forma que la homeostasis del calcio mejoró destacadamente. Lo que es más, la salida de Ca²⁺ durante la hipoxia así como la sobrecarga de Ca²⁺ durante la reoxigenación se redujo significativamente. El efecto de la taurina es parcialmente comparable al efecto inducido por los bloqueantes del canal de Ca²⁺. Uno de los efectos mayoritariamente responsables de la protección celular parece ser la aceleración inducida por la taurina de los procesos de crecimiento celular pese a la hipoxia y la reoxigenación. El espectro de efectos citoprotectores de la taurina predispone a esta sustancia a ser un agente fisiológico protector responsable de la homeostasis o enantiosis celular. (Michalk DV *et al.*, (1996) Adv Exp Med Biol, 403, 223-32). En condiciones de daño neuronal puede constituir un importante mecanismo protector contra la excitotoxicidad, p. ej. Isquemia (Saransaari P, Oja S S, (2000) Amino Acids 19 (3-4), 509-26).

Finalmente, la taurina, la arginina y la homocisteína son aminoácidos que se ha demostrado que afectan a los factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares en los seres humanos. (Nittynen L, *et al.*, (1999) Ann Med, Oct; 31(5), 318-26).

Hipoxia y crecimiento tumoral

El crecimiento tumoral depende del oxígeno y los nutrientes suministrados por la vasculatura de los tejidos locales. Es bien conocido que los tumores sólidos están peor oxigenados que los tejidos normales. (En: Vaupel, P.W. *et al.*, (eds.) *Tumour Oxygenation* pp219-232: Gustav Fisher Verlag, 1995). La hipoxia (baja concentración de oxígeno celular, <1%) aparece cuando las células tumorales proliferan fuera de la zona de difusión del suministro vascular local. Los tumores responden a la hipoxia produciendo factores inducibles por hipoxia (p. ej. VEGF) que estimulan el crecimiento de las células endoteliales (las células que recubren los capilares sanguíneos) de los vasos sanguíneos (es decir, angiogénesis) (Weidner N, *et al.*, N Engl J Med, 1991 Jan 3, 324:1,1-8). El flujo sanguíneo en estos vasos sanguíneos celulares es lento e irregular lo que da como resultado una menor eficiencia en el aporte de oxígeno y propaga la tendencia hipóxica de los tumores (para revisión véase, Brown J.M. Mol Med Today 6; 157-62, 2000). Este proceso angiogénico inducido por hipoxia permite a las células tumorales acceder al sistema circulatorio del animal huésped. Lo que es más, los nuevos vasos sanguíneos proporcionan a los tumores una puerta para acceder a la circulación y metastatizar en zonas distantes (Folkman J, J Natl Cancer Inst., 1990, Jan 3; 82(1):4-6). De hecho, la extensión de la neurovascularidad está fuertemente relacionada con el cáncer de mama primario, el cáncer de vejiga, el cáncer de próstata, el cáncer de pulmón de células no pequeñas, melanomas cutáneos y cáncer de cuello de útero (revisado en: Ferrara N, Breast Cancer Res Treat, 1995, 36:2, 127-37). Estos hallazgos han llevado a los investigadores a especular que la vascularización tumoral podría utilizarse como herramienta diagnóstica para predecir el estado del cáncer, i.e. si el cáncer ha metastatizado o no y en qué extensión.

Hipoxia y terapia tumoral

Se sabe que los carcinomas tienen fracciones hipóxicas significativas, p. ej. 80% del tumor en carcinomas de células escamosas de cuello y cabeza y el 50% del tumor en carcinomas del cuello uterino (Van de Wiele, C *et al.*, (2001 Nuclear Med, 22, 945-947). Las zonas hipóxicas son heterogéneas y lo son debido, parcialmente, a diferentes presiones de oxígeno en el tumor. Las áreas hipóxicas de los tumores tienden a escapar de la radiación y la quimioterapia. Estas áreas son las más alejadas de los vasos sanguíneos y por tanto reciben un aporte pobre de fármaco. Las células tumorales hipóxicas tienden a ser de proliferación lenta y muchos de los fármacos de quimioterapia hacen blanco rápidamente dividiendo solamente las células tumorales. Esta puede ser una de las razones por las que la hipoxia puede inducir la recaída después del tratamiento y la evolución de los tumores más agresivos y resistentes. La hipoxia aumenta la velocidad de mutación de las células y da como resultado tipos celulares mutados que son menos susceptibles a las señales de muerte celular programada como p53. En conjunto, la hipoxia tumoral ha emergido como predictora de una prognosis pobre. Puesto que la hipoxia es una afección anormal que aparece en todos los tumores sólidos, las células hipóxicas podrían ser utilizadas como dianas muy específicas en terapias anti cáncer

Angiogénesis

En condiciones normales la angiogénesis es necesaria para facilitar la cicatrización de heridas, la reparación de tejidos, la reproducción, el crecimiento y el desarrollo. No obstante, muchos episodios patológicos también dependen de este proceso. El proceso de cicatrización de heridas es complejo y representa un serio problema médico que afecta a un gran número de individuos. Los problemas de cicatrización aparecen en heridas dérmicas como úlceras de decúbito, quemaduras severas, úlceras diabéticas y lesiones oculares (incluyendo sequedad ocular y úlceras córneas) así como en heridas quirúrgicas y otras patologías relacionadas con las heridas. Un aspecto importante de la cicatrización de heridas es la migración controlada de células nuevas a partir de los tejidos que rodean la zona de la herida. Esto se hace para establecer una población apropiada de tipos de células y corregir la organización de los tejidos en el tejido que se está desarrollando nuevamente. La hipoxia promueve un incremento del crecimiento vascular y se asocia así con el crecimiento tumoral tal y como se describe anteriormente. Adicionalmente, se sabe que el crecimiento vascular excesivo contribuye a trastornos no-neoplásicos, como la retinopatía diabética, el asma, la degeneración macular, la psoriasis y la artritis reumatoide.

Por tanto, existe la necesidad de identificar nuevos marcadores y dianas potenciales de la ruta angiogénica regulada por oxígeno que son importantes en el desarrollo del cáncer y que pueden ser utilizados para su diagnóstico y tratamiento.

Una proteína diana ideal para la inmunoterapia del cáncer deberá tener un patrón de expresión restringido en tejidos normales y deberá estar sobre-expresada en tumores, de forma que la respuesta inmune estará dirigida a las células tumorales y no contra otros órganos. Además, la proteína diana deberá estar expuesta en la superficie celular, donde será accesible a los agentes terapéuticos. Se han identificado antígenos tumorales para varios tipos de cáncer, empleando técnicas como el diagnóstico diferencial del ADNc (Hubert, R.S., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 14523-14528(1999); Lucas, S., De Plaen, E. & Boon, T. Int. J. Cancer 87, 55-60 (2000)) y la purificación de antígenos de la superficie celular que son reconocidos por anticuerpos específicos de tumores (Catimel, B., *et al.*, J. Biol. Chem 271, 25664-25670 (1996)).

Esta invención se basa en el descubrimiento del que el SC6 está regulado en ascenso en la respuesta celular a la hipoxia. Nuestros hallazgos indican que la expresión del SC6 aumenta bajo condiciones hipóxicas en líneas celulares de cáncer endotelial microvascular dérmico humano (HDMEC) y de cáncer renal (RCC4) indicando que responde a estímulos hipóxicos. Además, el SC6 estaba expresado en cantidades relativamente pequeñas en muchos tejidos normales investigados. Sin embargo, aumentó la expresión del SC6 en algunas muestras clínicas de tejido

de carcinomas cervicales, de colon, renales, de pulmón y de células uterinas, en muestras clínicas de linfoma y en algunas líneas celulares de ciertos tumores, p. ej. linfoma de Burkitt, leucemia mieloide y de células T, líneas celulares de carcinoma de mama, renal y pancreático, que indican que el SC6 juega un papel importante en el desarrollo de muchos tipos de cáncer y puede ser apropiado como diana en el diagnóstico y la terapia del cáncer.

La secuencia de aminoácidos para el SC6 puede encontrarse en la base de datos GenBank, gestionada por el National Institute of Health (NIH) (disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) con número de identificación NP_003034 (SEQ ID N° 1) y la secuencia de nucleótidos se muestra con el número de identificación NM_003043 (SEQ ID N° 2).

Esta invención contempla el uso de una proteína SC6 p. ej. de longitud completa, en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento del cáncer de mama. Se contempla específicamente el uso de anticuerpos terapéuticos obtenidos de la porción extracelular del SC6.

Por consiguiente, esta invención proporciona un método para el escrutinio y/o el diagnóstico del carcinoma de mama en un sujeto y/o controlar la eficacia de la terapia para la enfermedad mencionada, que comprende la etapa de detectar y/o cuantificar en una muestra biológica obtenida a partir de dicho sujeto un polipéptido SC6 que:

comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 1

es una variante que tiene una o más sustituciones, deleciones, inserciones o modificaciones de aminoácidos relativas a la secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 1, siempre que tal variante presente la actividad inmunológica y/o transportadora del polipéptido con la secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 1; o

es un fragmento de un polipéptido que se define en los apartados a) y b) anteriores que tiene una longitud de al menos diez aminoácidos.

En una realización, la cantidad de polipéptido SC6 se compara con un control o con un intervalo de referencia. Preferentemente, la afección relacionada con hipoxia es cáncer, p. ej. células cancerosas hipóxicas. Un medio adecuado para tal detección/cuantificación incluirá el uso de anticuerpos. Por lo tanto, en una realización del método descrito más arriba el polipéptido se detecta y/o cuantifica utilizando un anticuerpo que se une específicamente a uno o más polipéptidos SC6.

La expresión “polipéptido SC6” incluye en lo sucesivo polipéptidos como los que se describen en los apartados de a) a c) anteriores.

La expresión “afección relacionada con hipoxia” incluye cáncer, tal como pero sin limitarse a, carcinoma cervical, de colon, renal, pulmonar, uterino, de mama o de células pancreáticas, linfoma de Burkitt, leucemia, p. ej. mieloide o de células T, angiogénesis y trastornos relacionados con la angiogénesis, como pero sin limitarse a, retinopatía diabética, asma, degeneración macular, psoriasis y artritis reumatoide. El término “cáncer” tanto leucemia como linfoma. “Leucemia” es el término utilizado para describir una enfermedad aguda o crónica que implica a los órganos en los que se forma la sangre y se caracteriza por un aumento anormal en el número de leucocitos en los tejidos del cuerpo con o sin el correspondiente aumento de los mismos en la sangre circulante y que se clasifica conforme al tipo de leucocito involucrado más destacado. “Linfoma” es el término empleado para describir un tumor maligno de los linfoblastos derivado de los linfocitos B.

La expresión “muestra biológica” incluye fluidos, p. ej. suero o linfa, y muestras de tejidos, p. ej. tejido mamario.

El término “agente” se refiere a, sin limitaciones, agentes que interaccionan con y/o modulan la expresión o la actividad de un polipéptido SC6 p. ej. anticuerpos que se unen a un polipéptido SC6, agonistas o antagonistas de un polipéptido SC6 y moléculas, p. ej. compuestos químicos, o bio-moléculas, p. ej. péptidos.

Esta invención también proporciona un método para el escrutinio y/o el diagnóstico del carcinoma de mama en un sujeto y/o para vigilar la eficacia de la terapia para la afección mencionada, que comprende la etapa de detectar y/o cuantificar en una muestra biológica obtenida de dicho sujeto la cantidad de una secuencia de ácido nucleico ADN que,

comprende o consiste en la secuencia de ADN de SEQ ID N° 2, o su ARN equivalente;

es una secuencia que es complementaria a las secuencias de a);

es una secuencia que codifica el mismo polipéptido que las secuencias de a) o b);

es una secuencia que muestra una identidad sustancial con cualquiera de las de a), b) y c); o

es una secuencia que codifica una variante o fragmento del polipéptido con la secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 1

ES 2 307 911 T3

Se prefiere que las secuencias que muestran identidad sustancial con cualquiera de las de a), b) y c) tengan p. ej. al menos un 50%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95% o al menos un 98% de identidad de secuencia.

5 La expresión “moléculas de ácidos nucleicos SC6” incluye en lo sucesivo las secuencias de ácidos nucleicos como las descritas en los apartados a) a e) anteriores.

En un aspecto adicional, el método de detección de la presencia de un polipéptido SC6 comprende la detección del polipéptido capturado utilizando un reactivo de detección marcado directa o indirectamente.

10 Un polipéptido SC6 puede ser detectado por varios de métodos conocidos por los expertos en la técnica. Los métodos de diagnóstico conforme a esta invención pueden realizarse usando los siguientes métodos conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo, sin limitación, la inmunoprecipitación seguida de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico, electroforesis en gel en 2 dimensiones, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos utilizando técnicas como la transferencia tipo Western, inmunocitoquímica, inmunohistoquímica, 15 inmunoensayos, p. ej. radioinmunoensayos, ELISA (ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas), inmunoensayo en sándwich, ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitinas, reacciones de precipitinas con difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmuno radiométricos, inmunoensayos fluorescentes e inmunoensayos con proteína A.

20 Se describen kits de diagnóstico, que comprenden un reactivo de captura (p. ej. un anticuerpo) frente a un polipéptido SC6. Adicionalmente, esos kits pueden comprender uno o más de los siguientes:

instrucciones para utilizar el reactivo de captura para el diagnóstico, pronóstico, vigilancia terapéutica o cualquier 25 combinación de estas aplicaciones;

un copartícipe de unión marcado para el reactivo de captura;

30 una fase sólida (tal como una tira de reactivo) sobre la que se inmoviliza el reactivo de captura; y

una etiqueta o prospecto que indique la autorización de la especialidad farmacéutica a para el diagnóstico, pronóstico o uso terapéutico o cualquier combinación de ellas

35 Si no se suministra un copartícipe de unión marcado para el reactivo de captura, el reactivo de captura del anti-polipéptido mismamente puede marcarse con un marcador luminiscente, p.ej. un grupo quimioluminiscente, enzimático, fluorescente o radiactivo.

40 Los polipéptidos SC6 también encuentran aplicación en la generación de anticuerpos. En otro aspecto, esta invención proporciona anticuerpos, que se unen a un polipéptido SC6. Los anticuerpos preferidos se unen específicamente a polipéptidos SC6 de forma que pueden usarse para purificar, capturar y/o inhibir la actividad de tales polipéptidos SC6. Los anticuerpos pueden ser monoclonales, policlonales, quiméricos, humanizados o biespecíficos o estar conjugados con una fracción terapéutica, un segundo anticuerpo o un segmento del mismo, un agente citotóxico o citoquina. Preferiblemente estos anticuerpos son anticuerpos humanos o humanos quiméricos.

45 Como se indica anteriormente, los polipéptidos SC6 constituyen una diana para la intervención terapéutica en afecciones relacionadas con la hipoxia. Lo que es más, esta invención proporciona ensayos para el uso en el descubrimiento de fármacos con objeto de identificar o verificar la eficacia de los agentes para el tratamiento o prevención de afecciones relacionadas con la hipoxia. Los agentes candidatos se pueden ensayar para determinar su capacidad para modular los niveles de un polipéptido SC6 en un sujeto que padece una afección relacionada con la hipoxia, p. ej. 50 cáncer. Preferiblemente, el agente candidato inhibe la expresión o los niveles de actividad de un polipéptido SC6. Los agentes capaces de modular los niveles de un polipéptido SC6 en un sujeto que padece una afección relacionada con la hipoxia, p. ej. cáncer, hacia los niveles encontrados en sujetos libres de afecciones relacionadas con la hipoxia o de producir cambios similares en un modelo experimental de afecciones relacionadas con la hipoxia, pueden usarse como agentes guía para la detección de fármacos, o usarse terapéuticamente. La expresión de un polipéptido SC6 puede 55 ser ensayada por, por ejemplo inmunoensayos, electroforesis en gel seguida de visualización, detección de actividad de ARNm o de polipéptido o cualquier otro método mostrado en este documento o conocido por los expertos en la técnica. Tales ensayos pueden ser utilizados para escrutar los agentes candidatos, en el seguimiento clínico o en el desarrollo de fármacos, en los que la abundancia de un polipéptido SC6 puede servir como marcador subrogado de la enfermedad clínica.

60 Por lo tanto, también se especifican métodos para el escrutinio de agentes que modulan (p. ej. regulan en ascenso, regulan en descenso, estimulan o inhiben) la expresión (p. ej. expresión de proteínas) o actividad (p. ej. actividad unión/transporte) de un polipéptido SC6. En consecuencia, se especifica un método para el escrutinio de agentes que modulan

65 (i) la expresión o actividad de un polipéptido SC6, o

(ii) la expresión de una molécula de ácido nucleico SC6, que comprende

comparar la expresión o la actividad del mencionado polipéptido, o la expresión de dicha molécula de ácido nucleico, en presencia de un agente candidato con la expresión o actividad de dicho polipéptido, o la expresión de dicha molécula de ácido nucleico, en ausencia del agente candidato o en presencia de un agente de control; y determinar si el agente candidato causa cambio de expresión o actividad de dicho polipéptido o de dicha molécula de ácido nucleico.

El grado de expresión o actividad del péptido mencionado, o el grado de expresión de dicha molécula de ácido nucleico, se compara con un intervalo de referencia predeterminado. Preferentemente, el agente regula en descenso o inhibe, la expresión, p. ej. la expresión de proteínas, o actividad, p. ej. actividad ligando/transporte, de un polipéptido SC6, o la expresión de una molécula de ácido nucleico de un polipéptido SC6.

Se describe un método para el escrutinio de agentes que interaccionan con (p. ej. se unen a) un polipéptido SC6, que comprende poner en contacto el polipéptido mencionado con un agente candidato y que determinar si el agente candidato interacciona o no con dicho polipéptido. Los agentes que interaccionan con un polipéptido SC6 pueden emplearse en la preparación de conjugados de fármacos terapéuticos.

Los ensayos de escrutinio pueden comprender, un ensayo de crecimiento (en condiciones hipóxicas), un ensayo de unión o un ensayo de inhibición de la traducción. Los ensayos de unión incluyen ensayos de unión competitiva, en los que la afinidad de unión del compuesto candidato se compara con la de un sustrato conocido de enzima para el SC6, un sustrato de enzima preferido es la taurina.

Ejemplos de agentes candidatos para los que puede analizarse la actividad en los ensayos descritos, incluyen, pero no se limitan a, ácidos nucleicos (p. ej. ADN y ARN), carbohidratos, lípidos, proteínas, péptidos, peptidomiméticos, agonistas, antagonistas, moléculas pequeñas y otros fármacos. Los agentes pueden obtenerse utilizando cualquiera de las estrategias apropiadas en los métodos de las colecciones combinatorias descritos por la técnica, incluyendo: colecciones biológicas; colecciones espacialmente dirigibles en fase sólida paralela o en disolución; métodos de colecciones sintéticas que requieren desenrollado; método de colecciones “una perla- un compuesto”; y métodos de colecciones sintéticas que usan la selección por cromatografía de afinidad. La estrategia de colecciones biológicas se limita a colecciones de péptidos, mientras que las otras cuatro estrategias s son aplicables a péptidos, oligómeros no peptídicos o colecciones de compuestos de moléculas (Lam, 1997, *Anticancer Drug Des.* 12:145; US 5.738.996 y US 5.807.683).

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

Se pueden presentar colecciones de compuestos, p. ej. presentes en disolución (p. ej. Houghten, 1992, *Bio/Techniques* 13:412-421), o en perlas (Lam, 1991, *Nature* 354:82-84); en virutas (Fodor, 1993, *Nature* 364:555-556); bacterias (US 5.223.409), esporas (US 5.571.698; US 5.403.484; y US 5.223.409), plásmidos (Cull *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1865-1869) o fagos (Scott and Smith, 1990, 386-390; Devlin, 1990, *Science* 249:404-406; Cwirla *et al.*, 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6378-6382; y Fellici, 1991, *J. Mol. Biol.* 222:301-310).

Los agentes que interaccionan con (es decir se unen a) un polipéptido SC6 (o ácido nucleico) son identificados mediante un sistema de ensayo basado en células. Conforme a esto, las células que expresan el polipéptido SC6 (o el ácido nucleico) se ponen en contacto con un agente candidato o un agente de control y se determina la capacidad del agente candidato para interaccionar con el polipéptido SC6 (o ácido nucleico). Si se desea, este ensayo puede utilizarse para escrutar una pluralidad (p. ej. una colección) de agentes candidatos. La célula, por ejemplo, puede ser de origen procariótico (p. ej. *E. coli*) o de origen eucariótico (p. ej. levadura o célula de mamífero). Además, las células pueden expresar el polipéptido SC6 de forma endógena o ser modificadas genéticamente para expresar dicho polipéptido. En algunas realizaciones, el polipéptido SC6 (o ácido nucleico) o el agente candidato se marca, por ejemplo con un marcador radioactivo (como ^3H , ^{32}P , ^{35}S o ^{125}I) o un marcador fluorescente (como el isotiocianato de fluoresceína, la rodamina, la ficoeritrina, la ficocianina, la aloficocianina, el o-ftalaldehído o la fluorescamina), para permitir la detección de una interacción entre dicho polipéptido (o ácido nucleico) y un agente candidato. La capacidad del agente candidato para interaccionar directa o indirectamente con el polipéptido SC6 (o ácido nucleico) puede determinarse por métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la interacción entre un agente candidato y un polipéptido SC6 puede determinarse por citometría de flujo, ensayo de centelleo, inmunoprecipitación o análisis por transferencia tipo Western.

Los agentes que interaccionan con (i.e. se unen a) un polipéptido SC6 (o ácido nucleico) son identificados mediante un sistema de ensayo libre de células. De acuerdo con esta realización, un polipéptido SC6 (o ácido nucleico) nativo o recombinante o un fragmento de los mismos, se pone en contacto con un agente candidato o un agente de control y se determina la capacidad del agente candidato para interaccionar con el polipéptido. Si se desea, este ensayo puede utilizarse para escrutar una pluralidad (p. ej. una colección) de agentes candidatos. Preferiblemente, un polipéptido SC6 (o ácido nucleico) primero se inmoviliza, por ejemplo, poniendo en contacto el polipéptido SC6 con un anticuerpo inmovilizado que lo reconoce selectivamente y se une a él, o poniendo en contacto una preparación de polipéptidos purificada con una superficie diseñada para unirse a proteínas, o poniendo en contacto una preparación de ácido nucleicos purificada con una superficie diseñada para unirse a ácidos nucleicos. El polipéptido SC6 (o ácido nucleico) puede estar purificado parcial o completamente (p. ej. parcial o completamente libre de otros polipéptidos o ácidos

nucleicos) o ser parte de lisado celular. Además, el polipéptido SC6 puede ser una proteína de fusión que comprende el polipéptido SC6 para su uso en la invención o una porción activada biológicamente de los mismos y un dominio como la glutatión-S-transferasa. Alternativamente, el polipéptido SC6 puede ser bio-tinilado empleando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica (p. ej. kit de biotinylation, Pierce Chemicals; Rockford, IL, USA). La capacidad del agente candidato para interactuar con el polipéptido SC6 puede ser determinada por métodos conocidos por los expertos en la técnica.

Se utiliza un sistema de ensayo basado en células para identificar los agentes que se unen o modulan la actividad de una proteína, tal como una enzima o una porción biológicamente activa de las mismas (que es responsable de la producción o degradación del polipéptido SC6 o es responsable de la modificación post-traduccion del polipéptido. En un primer escrutinio, una pluralidad (p. ej. una colección) de agentes contactan con las células que expresan natural o recombinantemente: (i) un polipéptido SC6 y (ii) una proteína que es responsable del procesamiento del péptido SC6, con objeto de identificar los compuestos que modulan la producción, degradación o modificación post-traduccion del polipéptido SC6. Si se desea, los agentes identificados en el primer escrutinio, pueden ser ensayados en un escrutinio secundario frente a células que se expresan el polipéptido SC6 natural o recombinantemente. La capacidad del agente candidato para modular la producción, degradación o modificación post-traduccion de un polipéptido SC6 puede determinarse por métodos conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo, sin limitaciones, la citometría de flujo, ensayos de centelleo, inmunoprecipitación o ensayos de transferencia tipo Western.

Los agentes que interactúan competitivamente con (p. ej. se unen a) un polipéptido SC6 se identifican con un ensayo de unión competitiva. Conforme a esta realización, las células que expresan el polipéptido se pone en contacto con un agente candidato y un agente conocido por interactuar con el polipéptido, p. ej. taurina; después, se determina la capacidad del agente candidato para interactuar competitivamente con el polipéptido. Alternativamente, los agentes que interactúan competitivamente con (p. ej. se unen a) un polipéptido SC6 son identificados con un ensayo libre de células por contacto del polipéptido con un agente candidato y un agente conocido por interactuar con el polipéptido, p. ej. taurina. Como se ha establecido anteriormente, la capacidad del agente candidato de interactuar con un polipéptido SC6 puede ser determinada por métodos conocidos por los expertos en la técnica. Estos ensayos, ya sean basados en células o libres de células, pueden utilizarse para detectar una pluralidad (p. ej. una colección) de agentes candidatos.

Los agentes que modulan (p. ej. regulan en ascenso o regulan en descenso) la expresión de un polipéptido SC6 (o ácido nucleico) son identificados poniendo en contacto las células (p. ej. células de origen procariota o eucariota) que expresan el polipéptido SC6 (o el ácido nucleico) con un agente de contacto o un agente de control (p. ej. suero salino tamponado con fosfato (PBS)) y determinando la expresión del polipéptido SC6 (o el ácido nucleico p. ej. ARNm) que codifica el polipéptido. El nivel de expresión de un polipéptido SC6 o de un ARNm que codifica un polipéptido SC6 en presencia del agente candidato se compara con el nivel de expresión de un polipéptido SC6 o de un ARNm que codifica un polipéptido SC6 en ausencia del agente candidato (p.ej. en presencia de un agente de control). Basándonos en esta comparación, el agente candidato puede ser identificado como modulador de la expresión del polipéptido SC6. Por ejemplo, cuando la expresión del polipéptido SC6 o de un ARNm que codifica el polipéptido SC6 es significativamente mayor en presencia del agente candidato que en su ausencia, el agente candidato se identifica como estimulador de la expresión del polipéptido SC6 o de un ARNm que codifica el polipéptido SC6. Alternativamente, cuando la expresión del polipéptido SC6 o de un ARNm que codifica el polipéptido SC6 es significativamente menor en presencia del agente candidato que en su ausencia, el agente candidato se identifica como inhibidor de la expresión del polipéptido SC6 o de un ARNm que codifica el polipéptido. El nivel de expresión, de un polipéptido SC6 (o ácido nucleico) puede determinarse por métodos conocidos por los expertos en la técnica basándose en esta descripción. Por ejemplo, la expresión de ARNm puede evaluarse por análisis de transferencia tipo Northern o RT-PCR, y los niveles de proteína pueden evaluarse por análisis de transferencia tipo Western.

Los agentes que modulan la expresión de la actividad de un polipéptido SC6 para su uso en la invención se identifican poniéndolos en contacto con una preparación que contiene el polipéptido SC6, o células (p. ej. células procariotas o eucariotas) que expresan el polipéptido SC6 con un agente candidato o un agente de control y determinando la capacidad del agente candidato para modular (p. ej. estimular o inhibir) la actividad del polipéptido SC6. Preferentemente el agente candidato inhibe la actividad del polipéptido SC6. La actividad de un polipéptido SC6 puede evaluarse detectando su efecto sobre un "efector secuencia abajo" o sustrato, por ejemplo, pero sin limitación, induciendo una ruta de transducción de una señal celular (p. ej. Ca^{2+} intracelular, diacilglicerol, IP3, etc.), detectando la actividad catalítica enzimática de la diana sobre un sustrato adecuado (p. ej. concentraciones de taurina, Shi YR *et. Al*, (2000) Acta Pharmacol Sin, Oct 23, 10, 910-918 & Warskulat U *et al.*, (1997) 321, 683-690), detectando la inducción de un gen indicador (p. ej. un elemento regulador que es sensible a un polipéptido de la invención y está unido operativamente a un ácido nucleico que codifica un marcador detectable, p. ej. luciferasa), o detectando una respuesta celular, por ejemplo, diferenciación celular, o proliferación celular según sea el caso, basada en esta descripción, para medir estas actividades se pueden utilizar técnicas conocidas por los expertos en la técnica (véase, p. ej. US 5.401.639). El agente candidato puede entonces ser identificado como un modulador de la actividad del polipéptido SC6 por comparación de los efectos del candidato con los del agente de control. Agentes apropiados incluyen sueros salinos tamponados con fosfato (PBS) y sueros salinos normales (NV).

Los agentes que modulan (p. ej. regulan en ascenso o regulan en descenso) la expresión, la actividad o ambas, expresión y actividad, de un polipéptido SC6 para su utilización en la invención se identifican en un modelo animal. Ejemplos de animales apropiados, incluyen, aunque no se limitan a, ratones, ratas, conejos, cobayas, perros y

gatos. De acuerdo con esta realización, el agente candidato o un agente de control se administra (p. ej. oral, rectal o parenteralmente así como intraperitoneal o intravenosamente) a un animal apropiado y se determina el efecto en la expresión, actividad o ambas, expresión y actividad, del polipéptido. Los cambios en la expresión de un polipéptido SC6 para su uso en la invención pueden evaluarse por cualquier método adecuado descrito anteriormente, basado en esta descripción.

Se utiliza un polipéptido SC6 para uso en la invención como “proteína cebo” en un ensayo con dos híbridos o en un ensayo con tres híbridos para identificar estas proteínas que se unen o interaccionan con el polipéptido SC6 (véase, p. ej. US 5.283.317; Zervos *et al.* (1993) Cell 72:223-232; Madura *et al.* (1993) J. Biol. Chem 268:12046-12054; Bartel *et al.* (1993) Bio/Techniques 14:920-924; Iwabuchi *et al.* (1993) Oncogene 8:1693-1696; y WO 94/103000). Como apreciarán los expertos en la técnica, estas proteínas de unión probablemente estarán implicadas en la propagación de señales de los polipéptidos SC6 para uso en la invención como, por ejemplo, elementos secuencia arriba o secuencia abajo de una ruta de señalización que implican a los polipéptidos SC6 para uso en la invención.

Un experto en la técnica apreciará que un polipéptido SC6 puede utilizarse en un método de diseño basado en estructuras de un agente, en particular una molécula pequeña que actúa para modular (p. ej. estimular o inhibir) la actividad de dicho polipéptido, comprendiendo dicho método:

determinar la estructura tridimensional de dicho polipéptido,
deducir la estructura tridimensional del probable sitio(s) reactivo o de unión de dicho polipéptido,
sintetizar agentes candidatos que se ha predicho que reaccionan o se unen al reactivo o sitio de unión deducido, y
analizar si el agente candidato es capaz de modular la actividad de dicho polipéptido.

Se apreciará que es probable que el proceso anterior sea un proceso iterativo. En un modo preferido el agente inhibe un polipéptido SC6. En otro modo preferido el agente se une a un sitio de unión alostérico sobre el polipéptido SC6 e inhibe la actividad del polipéptido SC6.

La invención comprende el uso de un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido SC6 que comprende la SEQ ID N° 1, en la preparación de un medicamento para el tratamiento del carcinoma de mama, en el que el anticuerpo es preferiblemente monoclonal, policlonal, quimérico, humanizado o biespecífico o está conjugado con un grupo terapéutico, un agente citotóxico o una citoquina.

Se describen aquí los agentes identificados mediante los ensayos de escrutinio arriba descritos y el uso de los mismos en tratamientos. Adicionalmente, se describe el uso de un agente que interacciona con, o modula la expresión y/o actividad de un polipéptido SC6, en la fabricación de medicamentos para el tratamiento de afecciones relacionadas con la hipoxia, p. ej. cáncer. Preferiblemente, el agente interacciona con o inhibe la expresión y/o actividad de un polipéptido SC6. Tales agentes pueden ser utilizados en la fabricación de medicamentos para el tratamiento de condiciones relacionadas con la hipoxia, p. ej. cáncer. Cuando en este documento se hace una referencia a un método para tratar o prevenir una enfermedad o afección utilizando un agente particular o una combinación de agentes, debe entenderse que tal referencia pretende incluir el uso de dicho agente o combinación de agentes en la preparación de un medicamento (preparación farmacéutica) para el tratamiento o prevención de la enfermedad o afección.

Como se discute en este documento los agentes que se describen encuentran aplicación en el tratamiento o profilaxis de afecciones relacionadas con la hipoxia, p. ej. cáncer. Así, en otros aspectos, se describe una composición farmacéutica que comprende al menos uno de los agentes, opcionalmente junto con uno o más excipientes, portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables. En otro aspecto, la composición farmacéutica es para su uso como vacuna por lo que también serán aceptables cualesquier componentes adicionales para su uso como vacuna. Además, el experto apreciará que pueden añadirse uno o más coadyudantes adecuados a tales preparaciones de vacunas.

La composición farmacéutica puede administrarse simultáneamente, por separado o secuencialmente con otro tratamiento apropiado para afecciones relacionadas con la hipoxia, como pero sin limitarse a, cáncer, angiogénesis y otros tratamientos relacionados con la angiogénesis, como pero sin limitarse a, retinopatía diabética, asma, degeneración macular, psoriasis y artritis reumatoide.

La composición farmacéutica puede ser administrada a un sujeto por cualquiera de las rutas convencionalmente usadas para la administración de fármacos, por ejemplo dichas composiciones pueden destinarse a la administración oral (incluyendo bucal, sublingual), tópica (incluyendo transdérmica), nasal (incluyendo inhalación), rectal, vaginal o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa o intradérmica) a mamíferos incluyendo a seres humanos. La ruta más adecuada para la administración en un caso dado dependerá del compuesto particular o de su composición farmacéutica, del sujeto, y de la naturaleza y severidad de la enfermedad y de la condición física del sujeto. Tal composición puede ser preparada por cualquier método conocido en la técnica farmacéutica, por ejemplo por asociación del agente activo con vehículo(s), excipiente(s) o diluyentes(s).

ES 2 307 911 T3

La composición será suministrada habitualmente como parte de una composición farmacéutica estéril, que habitualmente incluirá un portador farmacéuticamente adecuado. Esta composición farmacéutica puede estar en cualquier forma apropiada (dependiendo del método deseado de administración al paciente).

- 5 Las composiciones farmacéuticas destinadas a la administración oral pueden presentarse en unidades discretas como cápsulas o comprimidos, polvos o gránulos, soluciones o suspensiones en líquidos acuosos o no acuosos, espumas comestibles o batidos, en emulsiones líquidas de agua en aceite o de aceite en agua.

10 Los comprimidos y cápsulas destinados a la administración oral se pueden presentar en forma de dosis unitarias, y pueden contener excipientes convencionales tales como agentes aglutinantes por ejemplo jarabe de glucosa, goma arábica, gelatina, sorbitol, goma tragacanto o polivinilpirrolidona; cargas, por ejemplo lactosa, azúcar, almidón de maíz, fosfato de calcio, sorbitol o glicina; lubricantes para hacer comprimidos, por ejemplo estearato magnésico, talco, polietilenglicol o sílice; disgregantes, por ejemplo el almidón de patata; o agentes humectantes aceptables como el lauril sulfato sódico. Los comprimidos pueden ser recubiertos conforme a métodos bien conocidos en la práctica
15 farmacéutica normal. Las preparaciones líquidas orales pueden estar en forma de, por ejemplo, suspensiones acuosas u oleosas, disoluciones, emulsiones, jarabes o elixires, o pueden presentarse como producto seco para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Estas preparaciones líquidas pueden contener aditivos convencionales, tales como agentes de suspensión, por ejemplo sorbitol, metil celulosa, jarabe de glucosa, gelatina, hidroxietil celulosa, carboximetil celulosa, gel de estearato de aluminio o grasas hidrogenadas comestibles, agentes emulsionantes, por ejemplo lecitina, monooleato de sorbitol, o goma arábica; vehículos no acuosos (que pueden incluir grasas comestibles), por ejemplo aceite de almendras, ésteres oleosos como la glicerina, el propilenglicol, o el alcohol etílico; conservantes, como por ejemplo, p-hidroxibenzoato de metilo o propilo o ácido sórbico, y, si se desea, agentes aromatizantes y colorantes convencionales.

25 Las composiciones farmacéuticas destinadas a la administración tópica pueden estar formuladas como pomadas, cremas, suspensiones, lociones, polvos, soluciones, pastas, geles, apósitos impregnados, pulverizaciones, aerosoles o aceites y pueden contener aditivos convencionales apropiados como conservantes, disolventes para facilitar la penetración del fármaco y emolientes en pomadas y cremas. Estas aplicaciones incluyen las oculares o a otros tejidos externos, por ejemplo la boca y la piel y las composiciones son aplicadas preferentemente como pomada tópica o
30 crema. Cuando se formula en pomada, el agente activo puede emplearse en una base de pomada parafínica o en una base miscible en agua. Alternativamente, el agente activo puede ser formulado en crema con una base de aceite en agua o con una base de agua en aceite. La composición también puede contener soportes convencionales compatibles, como bases de crema o pomada y etanol o alcoholes oleicos para lociones.

35 Las composiciones farmacéuticas destinadas a la administración tópica en el ojo incluyen gotas oftálmicas en las que el agente activo se disuelve o suspende en un soporte específico, especialmente un disolvente acuoso.

Las composiciones farmacéuticas destinadas a administración tópica en la boca incluyen grageas, píldoras y colutorios bucales.

40 Las composiciones farmacéuticas destinadas a la administración transdérmica pueden presentarse como parches desarrollados para permanecer en contacto íntimo con la epidermis del receptor por un periodo prolongado de tiempo. Por ejemplo, el agente activo puede ser repartido desde el parche por ionoforesis como se describe en Pharmaceutical Research 3(6), 318, (1986).

45 Las composiciones farmacéuticas destinadas a la administración nasal en la que el vehículo es un sólido incluyen un polvo grueso que tiene un tamaño de partícula en el intervalo de, por ejemplo, 20 a 500 micras que se administra por inhalación rápida a través de un pasadizo nasal que va desde el contenedor de polvo hasta las proximidades de la nariz. Las composiciones apropiadas en las que el vehículo es un líquido, para la administración
50 como pulverización nasal o como gotas nasales, incluyen soluciones acuosas o soluciones oleosas del ingrediente activo.

Las composiciones farmacéuticas destinadas a la administración por inhalación incluyen partículas finas como polvos o nieblas que pueden ser generadas mediante varios tipos de de aerosoles presurizados de dosis tarada, nebulizadores o insufladores.

55 Las composiciones farmacéuticas destinadas a la administración rectal pueden presentarse en forma de supositorios o enemas. Los supositorios contendrán bases de supositorio convencionales, p. ej. manteca de cacao u otro glicérido.

60 Las composiciones farmacéuticas destinadas a la administración vaginal pueden presentarse en forma de pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o composiciones en pulverización.

Las composiciones farmacéuticas destinadas a la administración parenteral incluyen soluciones inyectables estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, soluciones tampón, bacteriostáticos y solutos que llevan a una formulación isotónica con la sangre del receptor; suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las composiciones se pueden presentar en contenedores unidos o multitidos, por ejemplo ampollas selladas y viales, y pueden almacenarse en condiciones de frío seco (liofilizadas) que requieran únicamente la adición de un vehículo líquido, por ejemplo agua para inyectables, inmediatamente antes de

ES 2 307 911 T3

su uso. Las soluciones y suspensiones de inyección extemporáneas pueden prepararse a partir de polvos, gránulos y tabletas estériles.

Para la administración parenteral, las formas de administración fluidas unitarias se preparan usando el agente activo y un vehículo estéril, prefiriéndose agua. El ingrediente activo, dependiendo de la concentración y el vehículo empleado, puede estar suspendido o disuelto en el vehículo. Para preparar disoluciones el ingrediente activo se puede disolver en agua para inyectables y esterilizar por filtración antes de introducirlo en un vial o ampolla adecuado y sellarlo.

Ventajosamente, se pueden disolver agentes como anestésicos locales, conservantes y agentes taponadores en el vehículo. Para aumentar su estabilidad, la composición puede congelarse después de rellenar el vial y eliminar el agua a vacío. El polvo liofilizado seco se sella después y se puede suministrar un vial adicional de agua para inyectables para reconstituir el líquido antes de su uso. Las suspensiones parenterales se preparan sustancialmente de la misma forma exceptuando que el agente activo se suspende en el vehículo en lugar de disolverse y que la esterilización no puede obtenerse por filtración. El agente activo puede esterilizarse por exposición al óxido de etileno antes de suspenderlo en el vehículo estéril. Ventajosamente, para facilitar la distribución uniforme del ingrediente activo se incluye en la composición un agente tensioactivo o humectante.

Debe entenderse que además de los ingredientes mencionados anteriormente de forma particular, las composiciones deben incluir otros agentes convencionales en la técnica que estén relacionados con el tipo de formulación en cuestión, por ejemplo los apropiados para la administración oral pueden incluir aromatizantes. Pueden incluir también agentes terapéuticamente activos junto con los agentes de esta invención. Estos vehículos pueden presentarse desde 1% p/p hasta alrededor de 98% p/p de la formulación. Usualmente constituirán hasta aproximadamente un 80% de la formulación.

Las composiciones pueden contener desde 0,1% en peso, preferentemente 10-60% del material activo, dependiendo del método de administración.

Las composiciones farmacéuticas pueden suministrarse en forma de dosis unitarias, generalmente se suministrarán en un contenedor cerrado o pueden suministrarse como parte de un kit. Semejante kit normalmente incluiría (aunque no necesariamente) instrucciones para su uso. Puede incluir una pluralidad de las dosis unitarias mencionadas. Las composiciones de unidades de dosificación preferidas son aquellas que contienen una dosis o subdosis diaria, o una proporción adecuada de las mismas, de un ingrediente activo.

Las dosificaciones óptimas de las composiciones farmacéuticas puede variar entre amplios límites, dependiendo de la naturaleza y extensión de la afección que se esté tratando, la forma, la ruta y el lugar de administración y el sujeto particular que se esté tratando, y ese óptimo se puede determinar con técnicas convencionales. Un experto en la técnica apreciará que el transcurso óptimo del tratamiento, i.e. el número de dosis de las composiciones mencionadas administradas por día en un número determinado de días, puede establecerse por expertos en la técnica empleando pruebas convencionales de determinación de la evolución del tratamiento. Si se desarrollan efectos colaterales se puede reducir la cantidad y/o frecuencia de la dosificación, de acuerdo con la práctica clínica normal.

En aspectos adicionales, se describe lo siguiente:

un método para la profilaxis y/o el tratamiento de un sujeto que sufre una afección relacionada con la hipoxia, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un polipéptido SC6 o un ácido nucleico SC6 como el que se describe aquí.

un método para la profilaxis y/o el tratamiento de un sujeto que sufre una afección relacionada con la hipoxia, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente que inhibe la expresión o la actividad de un polipéptido SC6 como el que aquí se describe.

el uso de al menos un polipéptido SC6 o un ácido nucleico SC6, como el aquí descrito, para la profilaxis y/o el tratamiento de condiciones relacionadas con la hipoxia.

el uso de un agente que inhibe la expresión o la actividad de un polipéptido SC6, como el que aquí se describe, para la profilaxis y/o el tratamiento de condiciones relacionadas con la hipoxia.

el uso de al menos un polipéptido SC6 o un ácido nucleico SC6, como el aquí descrito, en la preparación de un medicamento para su uso en la profilaxis y/o el tratamiento de condiciones relacionadas con la hipoxia.

el uso de un agente que inhibe la expresión o la actividad de un polipéptido SC6, como el aquí descrito, en la preparación de un medicamento para la profilaxis y/o el tratamiento de condiciones relacionadas con la hipoxia.

Preferentemente, el agente para uso, en el método o uso de los aspectos adicionales mencionados anteriormente, es un anticuerpo que se une a un polipéptido SC6.

A la vista de la importancia del SC6 en el cáncer los siguientes constituyen otros aspectos adicionales;

un método para el control/evaluación del tratamiento del cáncer, como el carcinoma cervical, de colon, renal, de pulmón, de útero, de mama o de células pancreáticas, linfoma, p. ej. linfoma de Burkitt, o leucemia, p. ej. leucemia mieloide o de células T, tratamiento en un paciente, que comprende la etapa de determinar la presencia o ausencia y/o cuantificar al menos un polipéptido SC6 en una muestra biológica obtenida del mencionado paciente.

Un método para la identificación de células cancerosas hipóxicas, como el carcinoma cervical, de colon, renal, de pulmón, de útero, de mama o de células pancreáticas, linfoma, p. ej. Linfoma de Burkitt; o leucemia, p. ej. leucemia mieloide o de células T, en una muestra biológica obtenida de un sujeto, que comprende la etapa de determinar la presencia o ausencia y/o cuantificar al menos un polipéptido SC6.

Para apreciar más completamente esta invención, los polipéptidos SC6 serán analizados con mayor detalle.

El término “polipéptidos” incluye péptidos, polipéptidos y proteínas. Estos términos se utilizan indistintamente a menos que se especifique otra cosa.

Los polipéptidos se proporcionan preferentemente en una forma sustancialmente pura, es decir, que están libres, en una extensión sustancial, de otras proteínas. Así, un polipéptido SC6 puede proporcionarse en una composición en la que es el componente predominante presente (i.e. está presente en un nivel de al menos el 50%; preferentemente al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, o al menos un 95%; cuando se determina en base al peso excluyendo disolventes o vehículos).

Los polipéptidos SC6 pueden estar en forma aislada o recombinante, y pueden estar fusionados a otros grupos. Los polipéptidos SC6 pueden estar en forma de una proteína “madura” o pueden formar parte de una proteína mayor como una proteína de fusión. A menudo es ventajoso incluir una secuencia adicional de aminoácidos que contiene secuencias secretoras o guía, una secuencia de pre-, pro-, prepro- proteína, o una secuencia que ayuda en la purificación, tal como una etiqueta de afinidad, por ejemplo, pero sin limitación, restos múltiples de histidina, una etiqueta FLAG, una etiqueta HA o una etiqueta myc. Puede utilizarse una secuencia adicional que pueda proporcionar estabilidad durante la producción recombinante. Estas secuencias pueden opcionalmente eliminarse si es necesario por incorporación de una secuencia de escisión como una secuencia adicional o una parte de la misma. Así, un polipéptido SC6 puede fusionarse a otros restos incluyendo otros polipéptidos. Estas secuencias adicionales y etiquetas de afinidad son bien conocidas por la técnica.

En particular, se contemplan en esta invención fusiones de los polipéptidos SC6 con proteínas localizadoras-informadoras, como la Proteína Fluorescente Verde (documentos de patente US 5.625.048, US 5.777.079, US 6.054.321 y US 5.804.387), la proteína fluorescente Roja Ds (Matz, M.V., *et al.*, (1999) Nature Biotech. 17:969-973) o proteínas fluorescentes procedentes de especies de Anthozoa no bioluminescentes.

Polipéptidos dentro del alcance de a)

Un polipéptido dentro del alcance de a), puede consistir en la secuencia particular de aminoácidos de SEQ ID N° 1 o puede tener una secuencia adicional de aminoácidos N-terminal y/o C-terminal relacionada con la secuencia de SEQ ID N° 1.

Se pueden proporcionar secuencias adicionales N-terminal o C-terminal por varios motivos. Las técnicas para proporcionar tales secuencias adicionales son bien conocidas por la técnica. Las secuencias adicionales pueden suministrarse para alterar las características de un polipéptido particular. Esto puede ser útil para mejorar la expresión o la regulación de la expresión en sistemas de expresión específicos. Por ejemplo, una secuencia adicional puede proporcionar alguna protección contra la escisión proteolítica. Esto se ha realizado con la hormona Somatostatina por fusión de su extremo-N con una parte de la enzima β -galactosidasa (Itakwa *et al.*, Science 198:105-63(1977)).

Las secuencias adicionales también pueden ser útiles en la alteración de las proteínas de un polipéptido para ayudar en la identificación o purificación. Por ejemplo, se puede proporcionar una proteína de fusión en la que un polipéptido se une a un resto capaz de ser aislado por cromatografía de afinidad. El resto puede ser un antígeno o un epítipo y la columna de afinidad puede comprender anticuerpos inmovilizados o fragmentos inmovilizados de anticuerpos que se unen a dicho epítipo o antígeno (deseablemente con un alto grado de especificidad). La proteína de fusión normalmente puede ser eluida de la columna por adición de un tampón adecuado.

Las secuencias adicionales N-terminales o C-terminales pueden, no obstante, estar presentes simplemente como resultado de una técnica particular usada para obtener un polipéptido SC6 y no proporcionar necesariamente ninguna característica ventajosa particular al polipéptido.

Cualquiera que sea la secuencia N-terminal o C-terminal presente, preferiblemente el polipéptido resultante exhibirá la actividad inmunológica y/o transportadora del polipéptido que tiene la secuencia de SEQ ID N° 1.

Polipéptidos dentro del alcance de b)

Volviendo ahora a los polipéptidos definidos en el apartado b) anterior, el experto en la técnica apreciará que estos polipéptidos son variantes del polipéptido dado en el apartado a) anterior, siempre que esas variantes exhiban la actividad inmunológica y/o de transporte del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N° 1.

Pueden darse alteraciones de la secuencia de aminoácidos de una proteína que no afecten a la función de la proteína. Estas incluyen sustituciones, deleciones e inserciones de aminoácidos y pueden ser el resultado de cortes y empalmes alternativos y/o de la presencia de múltiples puntos de inicio y fin. Pueden surgir polimorfismos como resultado de la falta de fidelidad en el proceso de traducción. Así, pueden tolerarse cambios en la secuencia de aminoácidos que no afecten a la función de las proteínas.

El experto apreciará que a menudo se pueden realizar varios cambios en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido que tiene una actividad particular para producir variantes (conocidas a veces como “muteínas”) que tienen al menos una proporción de dicha actividad, y preferentemente una proporción sustancial de dicha actividad. Tales variantes de los polipéptidos descritos en el apartado a) anterior se analizan en mayor detalle más abajo. Incluyen variantes alélicas y no alélicas.

Un ejemplo de la variante es un polipéptido como se define en a) anterior, aparte de la sustitución de uno o más aminoácidos con uno o más de otros aminoácidos. El experto es consciente de que varios aminoácidos tienen propiedades similares. Uno o más de esos aminoácidos pueden estar sustituidos a menudo por uno o más de esos otros aminoácidos sin eliminar una actividad deseada de esa sustancia. Así, los aminoácidos glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina pueden ser sustituidos a menudo por otro (aminoácidos que tienen restos alifáticos laterales). De las posibles sustituciones, es preferible que la glicina y la alanina se utilicen para sustituirse entre sí (ya que tienen cadenas laterales relativamente cortas) y que la valina, la leucina y la isoleucina se utilicen para sustituirse unas por otras (puesto que tienen cadenas laterales relativamente más largas que son hidrofóbicas).

Otros aminoácidos que pueden ser sustituidos los unos por los otros incluyen:

fenilalanina, tirosina y triptófano (aminoácidos con cadenas laterales aromáticas);

lisina, arginina e histidina (aminoácidos con cadenas laterales básicas);

aspartato y glutamato (aminoácidos con cadenas laterales ácidas)

asparagina y glutamina (aminoácidos con cadenas laterales amida); y

cisteína y metionina (aminoácidos que contienen cadenas laterales que contienen sulfuros).

Las sustituciones de esta naturaleza se denominan sustituciones de aminoácidos conservativas o semi-conservativas.

Las deleciones o inserciones de aminoácidos pueden hacerse relativas a la secuencia dada en el apartado a) anterior. De esta forma, por ejemplo, los aminoácidos que no tienen efecto sustancial en la actividad del polipéptido, o al menos que no eliminan esa actividad pueden ser suprimidos. Estas deleciones pueden ser ventajosas puesto que se puede reducir la longitud del péptido y su masa molecular manteniendo aún su actividad. Lo que puede permitir que se reduzca la cantidad de polipéptido que se requiere para un propósito determinado- por ejemplo, se pueden reducir los niveles de dosificación. También se pueden hacer inserciones de aminoácidos relacionadas con la secuencia dada en el apartado a) anterior. Esto puede hacerse para alterar las propiedades de un polipéptido (p. ej. para ayudar en la identificación, purificación o expresión, como se ha expuesto antes con relación a las proteínas de fusión).

Los cambios en los aminoácidos relativos a la secuencia dada en el apartado a) anterior pueden realizarse utilizando cualquier técnica apropiada p. ej. utilizando la mutagénesis dirigida (Hutchinson *et al.*, (1978) J. Biol. Chem. 235:6551).

Se apreciará que las sustituciones o inserciones de aminoácidos dentro del alcance de esta invención pueden realizarse usando aminoácidos presentes en la naturaleza o aminoácidos no presentes en la naturaleza. Ya se utilicen o no aminoácidos naturales o sintéticos, es preferible que sólo estén presentes L- aminoácidos.

En una realización particular, el/los aminoácido(s) sustituido(s) afectan significativamente a la actividad del polipéptido SC6 y pueden seleccionarse específicamente para producir actividad negativa dominante sobre el péptido. En otra realización, el/los aminoácido(s) sustituido(s) pueden seleccionarse específicamente para producir significativamente polipéptido activo.

Las modificaciones incluyen modificaciones que tienen lugar naturalmente, como pero sin limitación, modificaciones post-traducción y también modificaciones que no tienen lugar naturalmente como las que pueden introducirse por mutagénesis.

Cualquiera que sea el cambio que se haga en el amino ácido (ya sea por medio de sustitución, inserción, delección o modificación), los polipéptidos SC6 preferidos tienen al menos un 50% de identidad en la secuencia con el polipéptido SEQ ID N° 1, más preferiblemente el grado de identidad de la secuencia es al menos del 75%. Y aún más preferible el grado de identidad en la secuencia es de al menos el 80% o al menos del 85%. Las más preferibles de todas son secuencias con identidades de al menos el 90%, o al menos el 95%, o al menos el 98%.

El porcentaje de identidad es un concepto bien conocido por la técnica y para dos secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos, se determina por alineación de las secuencias para una comparación óptima (p. ej. se pueden introducir mellas en la primera secuencia para una mejor alineación con la secuencia) y comparación los residuos de aminoácidos o nucleótidos en las posiciones correspondientes. La “mejor alineación” es una alineación de dos secuencias que da como resultado un mayor porcentaje de identidad. El porcentaje de identidad se determina por el número de restos de aminoácidos o nucleótidos de las secuencias que se comparan, i.e. Porcentaje de identidad = n° de posiciones idénticas/ n° de posiciones totales $\times 100$.

La determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias puede conseguirse utilizando un algoritmo matemático conocido por el experto en la técnica. Un ejemplo de algoritmo matemático para comparar dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, modificado como en Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877. Los programas NBLAST y XBLAST de Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410 han incorporado ese algoritmo. Las búsquedas BLAST de nucleótidos pueden realizarse con el programa NBLAST, puntuación=100, longitud de palabra=12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácidos nucleicos de la invención. Las búsquedas de proteínas BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST, puntuación=50, longitud de palabra=3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de proteínas descritas en este documento. Para obtener alineaciones con mellas con el propósito de comparación, se puede utilizar BLAST Gapped como se describe en Altschul *et al.*, (1997) Nucleic Acid Res. 25:3389-3402. Alternativamente, puede utilizarse PSI-Blast para llevar a cabo una búsqueda iterativa que detecte relaciones distantes entre molécula (Id.). Cuando se utilizan programas BLAST, gapped BLAST y PSI-Blast, se pueden usar los parámetros que por defecto tiene el programa correspondiente (p. ej. XBLAST y NBLAST). Véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Otro ejemplo de algoritmo matemático que se utiliza en la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers & Miller, CABIOS (1989). El programa ALIGN (versión 2.0) que forma parte del paquete de software de alineación de cadenas CGC ha incorporado este algoritmo. Otros algoritmos de alineación de secuencias conocidos por la técnica incluyen ADVANCE y ADAM como se describe en Torellis & Robotti (1994) Comput. Appl. Biosci., 10:3-5; y FASTA descrito en Pearson y Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci 85:2444-8. Dentro de FASTA ktup es una opción de control que establece la sensibilidad y la velocidad de la búsqueda. Cuando se presenten altos grados de identidad de secuencia habrá relativamente pocas diferencias en la secuencia de amino ácidos. Así por ejemplo puede haber menos de 20, menos de 10, o incluso menos de 5 diferencias.

Polipéptidos dentro del alcance de c)

Como se discute más arriba, a menudo es ventajoso reducir la cadena de un polipéptido, siempre que el polipéptido resultante de longitud reducida tenga todavía la actividad deseada o pueda llevar a que surjan anticuerpos útiles o una vacuna. El punto c) por tanto cubre fragmentos de polipéptido de a) o b) anteriores.

El experto puede determinar si un fragmento particular tiene o no actividad utilizando las técnicas mencionadas anteriormente. Los fragmentos preferidos tienen al menos 10, al menos 20, al menos 50 o al menos 100 aminoácidos de longitud.

Los polipéptidos SC6 encontrarán aplicación en una estrategia terapéutica de afecciones relacionadas con la hipoxia, particularmente en el cáncer. El experto apreciará que para la preparación de uno o más polipéptidos, la estrategia preferible estará basada en técnicas de ADN recombinante.

Los polipéptidos SC6 pueden estar codificados por una gran variedad de de moléculas de ácidos nucleicos, teniendo en cuenta la bien-conocida degeneración del código genético. Pueden ser insertados en vectores y clonados para proporcionar mayores cantidades de ADN o ARN para un estudio adicional. Los vectores apropiados pueden introducirse en células huésped para permitir la expresión del polipéptido SC6 utilizando técnicas conocidas por personas entrenadas en la técnica.

La expresión “equivalente de ARN” cuando se utiliza anteriormente se refiere que una molécula de ARN dada tiene una secuencia de amino ácidos complementaria a la de una molécula de ADN dada, permitiendo el hecho de que en el ARN “U” reemplace a “T” en el código genético. La molécula de ácido nucleico puede obtenerse de forma aislada, recombinante o sintetizada químicamente.

Las técnicas para clonar, expresar y purificar polipéptidos son bien conocidas por los expertos. Los constructos de ADN pueden prepararse fácilmente utilizando métodos bien conocidos por la técnica. Estas técnicas son descritas, por ejemplo en J. Sambrook *et al.*, Molecular Cloning 2ª edición, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989); en Old & Primrose Principles of Gene Manipulation 5ª edición, Blackwell Scientific Publications (1994); y Stryer, Biochemistry 4ª edición, W H Freeman and Company (1995). De esta forma, pueden estar facilitadas las modificaciones de los

constructos de ADN y de las proteínas expresadas como la adición de promotores, potenciadores, secuencias señal, secuencias guía, señales de inicio y fin de la traducción y regiones de control de la estabilidad del ADN, o la adición de pares de adición o de fusión.

5 Normalmente el constructo de ADN se insertará en un vector, que puede ser originario de un fago o de un plásmido. La expresión de la proteína se consigue por la transformación o transfección del vector en una célula huésped que puede ser de origen eucariota o procariota.

10 El conocimiento de la estructura del ácido nucleico puede utilizarse para generar anticuerpos y en la terapia de genes. Las técnicas para hacerlo son bien conocidas por los expertos en la técnica.

Utilizando sistemas de expresión apropiados, los polipéptidos SC6 pueden expresarse en forma glicosilada o no glicosilada. Para formas no glicosiladas se pueden producir por expresión en huéspedes procariotas, como *E. coli*.

15 Los polipéptidos que comprenden metionina N-terminal pueden producirse utilizando determinados sistemas de expresión, mientras en otros el polipéptido maduro carecerá este residuo. Las técnicas preferidas para clonar, expresar y purificar una sustancia se resumen más abajo.

20 Los polipéptidos se pueden preparar nativamente o bajo condiciones desnaturalizantes y después replegarse subsecuentemente. Los vectores de expresión baculovirales incluyen plásmidos secretores (como pACGP67 de Pharmingen), que pueden tener una secuencia etiqueta de epítipo clonada en marco (p. ej. myc, V5 o His) para facilitar la detección y permitir la purificación subsecuente de la proteína. Los vectores de expresión de mamíferos pueden incluir pCDNA3 y pSecTag (ambos de Invitrogen) y pREP9 y pCEP4 (Invitrogen). Los sistemas de *E. coli* incluyen la serie pBad (marcadas con His-Invitrogen) o la serie pGEX (Pharmacia).

25 Además de las moléculas de ácidos nucleicos que codifican el polipéptido SC6 denominadas en este documento como moléculas de ácidos nucleicos "codificantes", se describen también moléculas de ácidos nucleicos complementarias a las mismas. También se describen moléculas de ARNm y moléculas de ADN complementarias (p. ej. moléculas de ADNc).

30 También se describen las moléculas de ácidos nucleicos que pueden hibridarse con cualesquier moléculas de ácidos nucleicos analizadas anteriormente. Aquí se hace referencia a estas moléculas de ácidos nucleicos como moléculas de ácidos nucleicos "hibridantes". Las moléculas de ácidos nucleicos hibridantes pueden ser útiles como sondas o cebadores, por ejemplo.

35 Es deseable que estas moléculas hibridantes tengan al menos 10 nucleótidos de longitud, preferentemente al menos 25 o al menos 50 nucleótidos de longitud. Las moléculas de ácidos nucleicos hibridantes preferiblemente se hibridan con ácidos nucleicos dentro del alcance de a), b), c), d) o e), como se menciona específicamente más arriba.

40 Deseablemente las moléculas hibridantes se hibridarán con esas moléculas en condiciones de hibridación restrictiva. Un ejemplo de condiciones de hibridación restrictiva es cuando la hibridación que se pretende se lleva a cabo a temperaturas desde aproximadamente 35°C hasta aproximadamente 65°C utilizando una solución salina, que está en torno a 0,9 molar. No obstante, el experto será capaz de variar esas condiciones como sea apropiado para tener en cuenta variables como la longitud de la sonda, la composición de las bases, los tipos de iones presentes, etc.

45 La manipulación del ADN que codifica la proteína es una técnica particularmente potente tanto para modificar la proteína y como para generar grandes cantidades de proteína con el propósito de purificación. Esto puede incluir el uso de técnicas PCR para amplificar una secuencia de ácidos nucleicos deseada. Puede utilizarse la síntesis química como una alternativa adicional a las técnicas PCR. Esta puede automatizarse. Secuencias relativamente cortas pueden sintetizarse químicamente y ligarse juntas para proporcionar una secuencia mayor.

50 Así la secuencia de datos proporcionada aquí puede utilizarse para diseñar cebadores para su uso en PCR de forma que la secuencia deseada puede marcarse y después ampliarse en un alto grado. Típicamente los cebadores deberán tener al menos cinco nucleótidos de longitud y generalmente deberán tener al menos 10 nucleótidos de longitud (p. ej. de quince a veinticinco nucleótidos de longitud). En algunos casos, se pueden utilizar cebadores de al menos treinta o treinta y cinco nucleótidos de longitud.

Además de ser utilizados como sondas y/o como cebadores, las moléculas de ácido nucleico hibridantes pueden utilizarse como moléculas anti- sentido para alterar la expresión de los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos SC6 por unión a moléculas de ácidos nucleicos complementarias. Estas técnicas pueden utilizarse en terapias anti-sentido.

60 Una molécula de ácido nucleico hibridante puede tener un alto grado de identidad de secuencia a lo largo de su longitud con una molécula de ácido nucleico dentro del alcance específico de los apartados de a) a e) anteriores (p. ej. al menos 50%; al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, o 95% de la secuencia). Como puede apreciar un experto, cuanto mayor sea la identidad de secuencia de un ácido nucleico de cadena simple con otra molécula de ácido nucleico, mayor será la probabilidad de que se hibride con una molécula de ácido nucleico complementaria a esa otra molécula de ácido nucleico en las condiciones apropiadas.

A la vista de la descripción precedente el experto apreciará que un gran número de ácidos nucleicos son de utilidad en esta invención. A menos que el contexto indique otra cosa, las moléculas de ácidos nucleicos de esta invención pueden tener una o varias de las siguientes características:

- 5 pueden ser ADN o ARN;
- pueden ser de cadena simple o de cadena doble;
- 10 pueden proporcionarse en forma recombinante, i.e. covalentemente unidas a una secuencia flanqueante 5' y/o 3' para proporcionar una molécula que no está presente en la naturaleza;
- pueden proporcionarse sin secuencias flanqueantes 5' y/o 3' que normalmente están presentes en la naturaleza;
- 15 se pueden proporcionar en forma sustancialmente pura. Así se pueden proporcionar en una forma que está sustancialmente libre de proteínas contaminantes y/o otros ácidos nucleicos; y
- pueden proporcionarse con intrones y sin intrones (p. ej. como ADNc).

Ahora se analizan con mayor detalle los anticuerpos que se unen específicamente a uno o más polipéptidos SC6 para su uso en esta invención.

El polipéptido SC6, sus fragmentos y otros derivados, o análogos de los mismos, pueden utilizarse como inmunógeno para generar anticuerpos que se unen inmuno-específicamente a tal inmunógeno. Los anticuerpos de la invención incluyen, pero no están limitados a anticuerpos de cadena simple, monoclonales, policlonales, quiméricos, humanizados o biespecíficos, fragmentos Fab y F(ab'), fragmentos producidos por un banco de expresión de Fab, anticuerpos anti-idiotípicos (anti Id), fragmentos que se unen a epítopos y cualquiera de los anteriores. Los anticuerpos pueden estar conjugados con una fracción terapéutica, un segundo anticuerpo o un fragmento de los mismos, un agente citotóxico o citoquina.

El término anticuerpo como se usa en este documento se refiere a moléculas de inmunoglobulina y proporciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, i.e. moléculas que contienen un sitio de unión a antígenos que se une específicamente a un antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina de la invención pueden ser de cualquier clase (p. ej. IgG, IgE, IgM, IgD e IgA) o una subclase de la molécula de inmunoglobulina.

En la producción de anticuerpos, el escrutinio del anticuerpo deseado puede realizarse con técnicas conocidas, p. ej. ELISA (ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas). Por ejemplo, para seleccionar anticuerpos que reconocen un dominio específico de un polipéptido SC6, se pueden ensayar hibridomas generados para un producto que se une a un fragmento del polipéptido que contiene dicho dominio. Para la selección de un anticuerpo que se une específicamente al primer polipéptido homólogo pero que no se une específicamente a (o que se une menos ávidamente a) un segundo polipéptido homólogo, se puede seleccionar en base a una unión positiva al primer polipéptido homólogo y una falta de unión (o una unión reducida a) al segundo polipéptido homólogo.

Para la preparación de anticuerpos monoclonales (AcMo) dirigidos hacia un polipéptido SC6 o un fragmento o análogo del mismo, puede usarse cualquier técnica que conduzca a la producción de moléculas de anticuerpos por cultivo de líneas celulares continuas. Por ejemplo, la técnica de hibridoma originalmente desarrollada por Kohler and Milstein (1975, *Nature* 256:495-497), así como la técnica trioma, la técnica de hibridoma de células B humanas (Kozbor *et al.*, 1983, *Immunology Today* 4:72), y la técnica hibridoma-EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole *et al.*, 1985, en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp 77-96). Estos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier subclase de las mismas. Los hibridomas que producen los AcMo pueden cultivarse *in vitro* o *in vivo*. Adicionalmente, los anticuerpos monoclonales pueden producirse en animales libres de gérmenes usando tecnologías conocidas en la técnica.

Los anticuerpos monoclonales incluyen pero no se limitan a anticuerpos monoclonales humanos y quiméricos (p. ej. quimeras humano-ratón). Un anticuerpo híbrido es una molécula en la que diferentes porciones se derivan de diferentes especies animales; tales como aquellas que tienen una región constante de inmunoglobulina humana y una región derivada de un AcMo murino (véase, p. ej. Cabilly *et al.*, US 4.816.567; y Boss *et al.*, US 4.816.397). Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpos de especies no humanas que tienen una o más regiones de la complementareidad determinantes (CDR) de la especie no humana y una región marco procedente de una molécula de inmunoglobulina humana (véase, p. ej. Queen, US 5.585.089).

Los anticuerpos monoclonales y quiméricos humanizados pueden producirse por técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica, por ejemplo utilizando métodos descritos en WO 87/02671; EP 184.187; EP 171.496; EP 173.494; WO 86/01533; US 4.816.567; EP 125.023; Better *et al.*, 1988, *Science*, 240:1041-1043; Liu *et al.*, 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-3443; Liu *et al.*, 1987, *J. Immunol.* 139:3521-3526; Sun *et al.*, 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:214-218, Nashimura *et al.*, 1987, *Canc. Res.* 47:999-1005; Wood *et al.*, 1985, *Nature* 314:446-449; y Shaw *et al.* 1988, *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-1559; Morrison, 1985, *Science* 229:12020-1207; Oi *et al.*, 1986, *Bio/techniques* 4:214; US 5.225.539; Jones *et al.*, 1986, *Nature* 321:552-525; Verhoeyan *et al.* (1988) *Science* 239:1534, y Beidler *et al.*, 1988, *J. Immunol.* 141:4053-4060.

Los anticuerpos completamente humanos son particularmente deseables en el tratamiento terapéutico de pacientes humanos. Estos anticuerpos pueden producirse utilizando ratones transgénicos que son incapaces de expresar los genes endógenos de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, pero que pueden expresar los genes humanos de cadenas ligeras y pesadas. Los ratones transgénicos se inmunizan por regla general con un antígeno seleccionado, p. ej. todo el polipéptido SC6 o una porción del mismo. Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno pueden obtenerse utilizando tecnologías de hibridoma convencionales. Los transgenes de inmunoglobulina humanos portados por ratones transgénicos se reorganizan durante la diferenciación de las células B, y subsecuentemente experimentan una conmutación de clase y una mutación somática. Así, utilizando tal técnica, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE útiles terapéuticamente. Para tener una visión de conjunto de esta tecnología de producción de anticuerpos humanos, véase Lonberg y Huszar (1995, Int. Rev. Immunol 13:65-93). Para tener una descripción detallada de esta tecnología de producción de anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y de los protocolos para la producción de dichos antibióticos, véase, p. ej. los documentos US 5.625.126; US 5.633.425; US 5.569.825; US 5.661.016; y US 5.545.806. Además, compañías como Abgenix, Inc. (Freemont, CA, USA) y Genpharm (San José, CA, USA) pueden comprometerse a proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado usando tecnologías similares a las descritas anteriormente.

Pueden generarse anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo seleccionado, utilizando una técnica conocida como "selección guiada". En esta estrategia, un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, p. ej. un anticuerpo de ratón, se utiliza para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconozca el mismo epítipo (Jespers *et al.*, (1994) Bio/technology 12:899-903).

Los anticuerpos también pueden generarse utilizando varios métodos de presentación de fagos conocidos por la técnica. En estos métodos de presentación de fagos, los dominios funcionales del anticuerpo se presentan en la superficie de las partículas de fago que portan las secuencias de polinucleótidos que los codifican. En un particular, tal fago puede utilizarse para desplegar dominios de unión a antígenos expresados a partir de un repertorio de bancos de anticuerpos combinatorios. (p. ej. humanos o murinos). El fago que expresa un dominio de unión a un antígeno que se une al antígeno de interés puede ser seleccionado o identificado con otro antígeno, p. ej. un antígeno marcado o antígeno unido o capturado en una superficie sólida o perla. El fago empleado en estos métodos es típicamente un fago filamentoso que incluye dominios de unión fd y M13, expresado a partir de un fago con dominios de anticuerpo Fab, Fv o Fv estabilizado con disulfuro fusionados recombinantemente ya sea a la proteína de gen III o de gen VIII del fago. Los métodos de presentación de fagos que pueden utilizarse para fabricar los anticuerpos incluidos aquellos descritos en Brinkman *et al.*, J. Immunol. Methods 182:41-50 (1995); Ames *et al.*, J. Immunol. Methods 184:177-186 (1995); Kettleborough *et al.*, Eur. J. Immunol. 24:952-958 (1994); Persic *et al.*, Gene 187 9-18 (1997); Burton *et al.*, Advances in Immunology 57:191-280 (1994); WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/118619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; US 698.426; US 5.223.409; US 5.403.484; US 5.580.717; US 5.427.908; 5.750.753; US 5.821.047; US 5.571.698; US 5.427.908; US 5.516.637; US 5.780.225; US 5.658.727; 5.733.743 y US 5.969.108.

Como se describe en las referencias anteriores; después de la selección del fago, las regiones del fago que codifican el anticuerpo pueden ser aisladas y utilizadas para generar anticuerpos completos, incluyendo anticuerpos humanos, o cualquier otro fragmento de unión al antígeno deseado, y expresadas en el huésped que se desee, incluyendo células de mamíferos, células de insectos, células de plantas, levaduras y bacterias, p. ej. como las que se describen en detalle más abajo. Por ejemplo, también se pueden utilizar técnicas para producir recombinantemente fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ empleando métodos conocidos por la técnica como los descritos en WO 92/22324; Mullinax *et al.*, (1992) BioTechniques 12(6):864-869; y Sawai *et al.*, (1995) 34:26-34; y Better *et al.*, (1998) Science 240:1041-1043.

Ejemplos de técnicas que pueden utilizarse para producir Fvs de cadena simple y anticuerpos incluyen las descritas en los documentos US 4.946.778 y US.5.258.498; Huston *et al.*, (1991) Methods in Enzymology 203:46-88, Shu *et al.*, (1993) PNAS-90:7995-7999; y Skerra *et al.*, (1988) Science 240:1038-1040.

La invención proporciona además el uso de anticuerpos biespecíficos, que pueden obtenerse por métodos conocidos por la técnica. La producción tradicional de anticuerpos bi-específicos de cadena de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadenas de inmunoglobulina cadena pesada-cadena ligera, en que las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Milstein *et al.*, 1983, Nature, 305:537-539). Debido a la distribución al azar de las cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas de anticuerpos diferentes, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que normalmente se realiza mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante engorrosa, y los rendimientos del producto son bajos. Procedimientos similares se describen en WO 93/08829 y en Traucknecker *et al.*, (1991) EMBO J. 10:3655-3659.

De acuerdo con una estrategia diferente, los dominios variables del anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación antígeno-anticuerpo) se fusionan con secuencias de inmunoglobulina de dominio constante. La fusión se realiza preferiblemente con un dominio constante de inmunoglobulina de cadena pesada, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Es preferible que la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contenga el sitio necesario para la unión de la cadena ligera, esté presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de las cadenas pesadas, y si se desea de las cadenas ligeras de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y son co-transferidos a un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos

de polipéptidos en realizaciones en las que proporciones desiguales de las tres cadenas de polipéptidos empleadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. No obstante, es posible insertar las secuencias codificantes para las dos o las tres cadenas de polipéptidos en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptidos en la misma proporción da como resultado altos rendimientos o cuando la proporción no tiene una importancia específica.

En una estrategia preferida, los anticuerpos biespecíficos están compuestos por una cadena híbrida pesada de inmunoglobulina con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par híbrido de cadena pesada- cadena ligera de inmunoglobulina (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se ha encontrado que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones indeseadas de cadenas de inmunoglobulina, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo la mitad de la molécula biespecífica proporciona una fácil separación. Esta estrategia se desarrolla en WO 94/04690. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 1986, 121:210.

Se describen fragmentos, derivados o análogos funcionalmente activos de moléculas de inmunoglobulina del polipéptido anti-SC6. Funcionalmente activo indica que el fragmento, derivado o análogo descrito es capaz de incitar anticuerpos anti-anti-idiotipo (i.e. anticuerpos terciarios) que reconocen el mismo antígeno reconocido por el anticuerpo del que se deriva el fragmento, derivado o análogo. Específicamente, en una realización preferida la antigeneidad del idiotipo de la molécula de inmunoglobulina puede aumentarse por delección de un marco y de secuencias CDR que son C-terminales para la secuencia CDR que reconoce el antígeno específicamente. Para determinar que secuencias CDR se unen al antígeno, pueden utilizarse péptidos sintéticos que contienen secuencias CDR en ensayos de unión con el antígeno mediante cualquier ensayo de unión descrito en la técnica.

Se describen fragmentos de anticuerpos como, pero sin limitarse a, fragmentos F(ab')₂ y fragmentos Fab. Los fragmentos de anticuerpo que reconocen epítopes específicos pueden generarse con técnicas conocidas. Los fragmentos F(ab')₂ consisten en la región variable, la región constante de la cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada y se generan por digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo. Los fragmentos Fab se generan por reducción de los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. La invención también proporciona dímeros de cadena pesada y cadena ligera de los anticuerpos de la invención, o cualquier mínimo fragmento de los mismos como Fvs o cadenas simples de anticuerpos (SCAs) (p. ej. como se describe en el documento US 4.946.778; Bird (1988) *Science* 242:423-42; Huston *et al.*, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; y Ward *et al.*, (1989) *Nature* 334:544-54), o cualquier otra molécula con la misma especificidad que el anticuerpo. Los anticuerpos de cadena simple se forman por unión de los fragmentos de cadena ligera y de cadena pesada de la región Fv vía un puente de aminoácidos, dando como resultado un polipéptido de cadena simple. Pueden utilizarse las técnicas para el ensamblaje de fragmentos funcionales Fv en *E. coli* (Skerra *et al.*, (1988) *Science* 242. 1038-1041).

Las proteínas de fusión de las inmunoglobulinas descritas (o los fragmentos funcionalmente activos de las mismas), en las que por ejemplo la inmunoglobulina se fusiona vía enlace covalente (p. ej. enlace peptídico), ya sea en el extremo-N o en el extremo - C de la secuencia de aminoácidos de otra proteína (o una porción de la misma, preferiblemente una porción de al menos 10, 20 o 50 aminoácidos de la proteína) que no sea inmunoglobulina. Preferentemente la inmunoglobulina, o fragmento de la misma, está unida covalentemente a otra proteína en el extremo-N del dominio constante. Como se establece anteriormente, estas proteínas de fusión pueden facilitar la purificación, incrementar la vida media *in vivo*, y potenciar el aporte de un antígeno a través de la barrera epitelial hasta el sistema inmune.

Las inmunoglobulinas incluyen análogos y derivados que también están modificados, i.e. por la unión covalente de cualquier tipo de molécula siempre que dicha unión covalente no perjudique la unión inmunoespecífica. Por ejemplo, pero en modo alguno como limitación, los derivados o análogos de la inmunoglobulina incluyen aquellos que han sido más modificados, p. ej. por glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización por grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas puede realizarse mediante técnicas conocidas, incluyendo, pero sin limitarse a escisión química específica, acetilación, formilación, etc. Adicionalmente, el análogo o derivado puede contener uno o más amino ácidos no clásicos.

Los anticuerpos anteriores pueden utilizarse en métodos conocidos en la técnica relativos a la localización y la actividad de los polipéptidos SC6, p. ej. mediante formación de imágenes o formación de radio imágenes de estos polipéptidos, midiendo los niveles de los mismos en muestras fisiológicas adecuadas, en métodos de diagnóstico, etc. y para radio terapia.

Los anticuerpos de la invención pueden producirse por cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de anticuerpos, en particular, por síntesis química o por expresión recombinante, y son producidos preferentemente por técnicas de expresión recombinante.

La expresión recombinante de anticuerpos, o fragmentos, derivados o análogos de los mismos, requiere la construcción de un ácido nucleico que codifique el anticuerpo. Si se conoce la secuencia de nucleótidos de los anticuerpos, se puede ensamblar un ácido nucleico que codifica el anticuerpo a partir de oligonucleótidos sintetizados químicamente (p. ej. como los descritos en Kutmeier *et al.*, (1994) *BioTechniques* 17:242), que, brevemente, incluye la síntesis de

oligonucleótidos de solapamiento que contienen porciones de la secuencia codificante del anticuerpo, reasociación y ligado de esos oligonucleótidos, y después amplificación de los nucleótidos ligados por PCR.

Alternativamente, el ácido nucleico que codifica el anticuerpo puede obtenerse clonando el anticuerpo. Si no está disponible un clon que contenga el ácido nucleico que codifica el anticuerpo particular, pero se conoce la secuencia de la molécula de anticuerpo, se puede obtener un ácido nucleico que codifique el anticuerpo a partir de una fuente apropiada (p. ej. un banco de ADNc de anticuerpos, o un banco de ADNc generado a partir de cualquier tejido celular o célula que exprese el anticuerpo) por amplificación PCR utilizando cebadores sintéticos hibridables con los extremos 3' y 5' de la secuencia o por clonación usando una sonda de oligonucleótidos específica para la secuencia particular de genes.

Si no se dispone de una molécula de anticuerpo que reconoce específicamente un antígeno particular (o de una fuente para un banco de ADNc para clonar un ácido nucleico que codifica dicho anticuerpo), se pueden generar anticuerpos específicos para un antígeno particular mediante cualquier método conocido por la técnica, por ejemplo, inmunizando un animal, como un conejo, para generar anticuerpos policlonales, o, más preferiblemente, generando anticuerpos monoclonales. Alternativamente, se puede obtener un clon que codifique al menos la porción Fab del anticuerpo por detección de genotecas de expresión de Fab (p. ej. las descritas en Huse *et al.*, (1989) Science 246:1275-1281) para clones de fragmentos Fab que se unen al antígeno específico o por escrutinio de colecciones de anticuerpos (véase, p. ej. Clackson *et al.*, (1991) Nature 352:624; Hane *et al.*, (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4937).

Una vez obtenido un ácido nucleico que codifica al menos el dominio variable de la molécula de anticuerpo, se puede introducir en un vector que contenga la secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de la molécula de anticuerpo (véase, p. ej. los documentos WO 86/05807; WO 89/01036; y US 5.122.464). También están disponibles los vectores que contienen la cadena completa, ligera o pesada, para la coexpresión con el ácido nucleico que permite la expresión de una molécula completa de anticuerpo. Después, el ácido nucleico que codifica el anticuerpo puede utilizarse para introducir en el nucleótido sustitución(es) o delección(es) necesarias para sustituir (o eliminar) uno o más restos de cisteína de la región variable que participan en un enlace disulfuro intracatenario con un resto de aminoácido que no contiene el grupo sulfhidrilo. Estas modificaciones pueden llevarse a cabo por cualquier método conocido en la técnica para la introducción de mutaciones o delecciones específicas en una secuencia de aminoácidos, por ejemplo, pero no limitadas a, mutagénesis química, mutagénesis dirigida *in vitro* (Hutchinson *et al.*, (1978), J. Biol. Chem. 253:6551), métodos basados en PCR, etc.

Además, pueden utilizarse las técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison *et al.* (1984) Proc. Natl. Acad. Sci 81:851-855; Neuberger *et al.*, (1984) Nature 312:604-608; Takeda *et al.*, (1985) Nature 314:452-454) por empalme de genes de una molécula de anticuerpo de ratón del antígeno de especificidad antigénica apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humano de actividad biológica adecuada. Como se describe más arriba, un anticuerpo quimérico es una molécula en la que las diferentes porciones se derivan de diferentes especies animales, como aquellos que tienen una región variable derivada de un mAb murino y una región constante de anticuerpo humano, p. ej. anticuerpos humanizados.

Una vez obtenido un ácido nucleico que codifica una molécula de anticuerpo la invención, se puede producir el vector para la producción de la molécula de anticuerpo mediante la tecnología de ADN recombinante empleando técnicas bien conocidas en este campo. Por tanto, aquí se describen los métodos para preparar la proteína de la invención por expresión de un ácido nucleico que contiene las secuencias de la molécula de anticuerpo como las que se describen en este documento. Se pueden emplear métodos conocidos por los expertos en la técnica para construir vectores de expresión que contienen una molécula de anticuerpo que codifica secuencias y señales apropiadas de control de transcripción y traducción. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. Véase, por ejemplo las técnicas descritas en Sambrook *et al.* (1990) Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d. Ed., Cold Spring Harbor, NY y Ausubel *et al.* (1998) Current Protocols in Molecular Biology, eds., John Wiley & Sons, NY.

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

Las células hospedantes usadas para expresar un anticuerpo recombinante de la invención pueden ser o células bacterianas como *E. coli*, o, preferiblemente, células eucariotas, especialmente para la expresión de la molécula de anticuerpo recombinante completa. En particular, las células de mamíferos como las células ováricas de los hámsters chinos (CHO), en conjunción con un vector tal como el elemento promotor principal del gen precoz inmediato del citomegalovirus humano es un sistema de expresión efectivo para anticuerpos (Foecking *et al.*, (1986) Gene 45:101; Cockett *et al.*, (1990) Bio/technology 8:2).

Para expresar una molécula de anticuerpo de la invención se pueden utilizar variedad de sistemas de vectores de expresión en un huésped. Tales sistemas de expresión en un huésped representan vehículos a través de los que las secuencias codificantes de interés se pueden producir y purificar subsecuentemente, pero también representan células que pueden, cuando se transforman o transfectan con las secuencias codificantes de nucleótidos apropiadas, expresar la molécula de anticuerpo de la invención *in situ*. Estas incluyen pero no se limitan a microorganismos como bacterias (p. ej. *E. coli*, *B. subtilis*) transformadas con ADN bacteriófago recombinante, vectores plásmidos o cósmidos de expresión de ADN que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; levaduras (p. ej. *Saccharomyces*, *Pichia*) transformadas

con vectores recombinantes de expresión de levaduras que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; sistemas de células de insectos infectadas con vectores de expresión de virus recombinantes (p. ej. baculovirus) que contienen secuencias codificantes del anticuerpo; sistemas celulares de plantas infectados con vectores de expresión del virus recombinante (p. ej. virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformadas con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (p. ej. plásmido Ti) que contienen las secuencias que codifican el anticuerpo; o sistemas de células de mamíferos (p. ej. COS, CHO, BHK, 293, células 3T3 que portan constructos de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamíferos (p. ej. promotor de la metalotioneína) o de virus de mamíferos (p. ej. el promotor tardío del adenovirus; el promotor del virus vaccinia de 7,5K).

En sistemas bacterianos, se pueden seleccionar ventajosamente un número de vectores de expresión dependiendo del uso que se pretenda dar a la molécula de anticuerpo que se expresa. Por ejemplo, cuando se va a producir una gran cantidad de tal proteína, para la generación de composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula de anticuerpo, pueden ser deseables vectores que dirige la expresión de altos niveles de productos de proteínas de fusión que sean fácilmente purificados. Tales vectores incluyen, sin limitarse a ellos, al vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther *et al.*, (1983) EMBO J. 2:1791), en el que la secuencia que codifica el anticuerpo puede estar ligada individualmente en el vector en marco con la región codificante lac Z de forma que se produce la proteína de fusión; vectores pIN (Inouye & Inouye, (1985) Nucleic Acid Res. 13:3101-3109; Van Heenke & Schuster, (1989) J. Biol. Chem. 24:5503-5509); y similares. Los vectores pGEX se pueden utilizar también para expresar polipéptidos foráneos como proteínas de fusión con Glutación S-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y pueden ser purificadas fácilmente a partir de células lisadas por adsorción y unión a una matriz de perlas de glutatión-agarosa seguida de elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX se diseñan para incluir sitios de escisión de la trombina o la proteasa del factor Xa de forma que el producto del gen diana clonado pueda ser liberado de la fracción GST.

En un sistema basado en insectos, el virus de la polihedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcNPV) se usa como vector de expresión de genes foráneos. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. El anticuerpo que codifica la secuencia puede clonarse individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo el gen polihedrina) del virus y colocarse bajo el control de un promotor de AcNPV (por ejemplo el promotor de la polihedrina). En células hospedantes de mamíferos, se pueden utilizar un número de sistemas de expresión basados en virus (p. ej. un sistema de expresión del adenovirus).

Como se indica arriba, se puede seleccionar una capa celular hospedante que module la expresión de las secuencias insertadas, o modifique y procese el producto del gen en la forma específica deseada. Tales modificaciones (p. ej. glucosilación) y procesamiento (p. ej. escisión) de productos de la proteína pueden ser importantes para la función de la proteína.

Para la producción a largo plazo y con alto rendimiento de anticuerpos recombinantes, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, se pueden producir líneas celulares que expresan establemente un anticuerpo de interés por transfección de las células con un vector de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos del anticuerpo y la secuencia de nucleótidos de un marcador seleccionable (p. ej. neomicina o higromicina), y seleccionando la expresión del marcador seleccionable. Tales líneas celulares diseñadas pueden ser particularmente útiles en el escrutinio y evaluación de compuestos que interaccionan directa o indirectamente con la molécula del anticuerpo.

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

La célula huésped puede ser co-transfectada con dos vectores de expresión de la invención, el primer vector que codifica un polipéptido derivado de la cadena pesada y el segundo vector que codifica un polipéptido derivado de la cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permiten una expresión equivalente de polipéptidos de cadenas pesadas y ligeras. Alternativamente, puede usarse un vector simple que codifica polipéptidos tanto de cadena pesada como de cadena ligera. En estas situaciones, la cadena ligera puede colocarse delante de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (Proudfoot, (1986) Nature 322:52; Kohler, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197). Las secuencias codificantes de cadenas pesadas y ligeras pueden comprender ADNc y ADN genómico.

Una vez que la molécula de anticuerpo de la invención se ha expresado recombinantemente, puede purificarse por cualquier método conocido en la técnica para la purificación de una molécula de anticuerpo, por ejemplo, por cromatografía (p. ej. cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, tal como con proteína A o un antígeno específico y cromatografía en columna para separar por tamaños), centrifugación, solubilidad diferencial, o por cualquier técnica estándar de purificación de proteínas.

Alternativamente, cualquier proteína de fusión puede ser fácilmente purificada utilizando un anticuerpo específico para la proteína de fusión que se esté expresando. Por ejemplo, un sistema descrito por Janknecht *et al.* permite una purificación fácil de proteínas de fusión no desnaturalizadas expresadas en líneas celulares humanas (Janknecht *et al.* (1991) Proc. Natl. Acad. Sci USA 88:8972-897). En este sistema, el gen de interés se subclona en un plásmido recombinación de vaccinia, de forma que el marco de lectura abierto del gen se fusiona en traducción con una etiqueta amino terminal que consiste en seis residuos de histidina. La etiqueta sirve a la proteína de fusión como dominio de unión a la matriz. Los extractos de células infectadas con virus vaccinia recombinante se cargan en columnas agarosa-ácido nitriloacético Ni^{2+} y las proteínas etiquetadas con histidina son eluidas selectivamente con tampones que contienen imidazol.

En una forma preferida, los anticuerpos o fragmentos de los mismos se conjugan con una fracción de diagnóstico o terapéutica. Los anticuerpos pueden utilizarse en la diagnosis o para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección puede facilitarse por el acoplamiento del anticuerpo con una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminescentes, materiales bioluminescentes, núcleos radiactivos, metales que emiten positrones (para su uso en tomografía de emisión de positrones), e iones de metales paramagnéticos no radiactivos. Véase generalmente US 4.741.900 para conocer los iones metálicos que pueden conjugarse con anticuerpos para su uso en el diagnóstico.

Las enzimas apropiadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; los grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina, avidina y biotina; Los materiales fluorescentes adecuados incluyen umbelliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinil amino fluoresceína, cloruro de dansilo y ficoeritrina; los materiales luminescentes adecuados incluyen luminol; los materiales bioluminescentes adecuados incluyen luciferasa, luciferina y aequorina; y los nucleidos radiactivos adecuados incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In y ^{99}Tc .

Los anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden conjugarse con restos de un agente terapéutico o de un fármaco para modificar una respuesta biológica dada. El agente terapéutico o resto farmacológico no debe malinterpretarse como limitado a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto farmacológico puede ser una proteína o un polipéptido que posea una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, o toxina de la difteria; una proteína como el factor de necrosis tumoral, el interferón- α , el interferón- β , el factor de crecimiento de nervios, el factor de crecimiento derivado de plaquetas, el activador de plasminógeno de tejidos, un agente trombotico o un agente anti-angiogénico, p. ej. angiostatina o endostatina; o un modificador de la respuesta biológica como la linfoquina, la interleucina-1 (IL-1), la interleucina-2 (IL-2), la interleucina-6 (IL-6), el factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), el factor de crecimiento de nervios (NGF) y otros factores de crecimiento.

Las técnicas para conjugar tales restos terapéuticos con anticuerpos son bien conocidas, p. ej. véase Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Reisfeld *et al.*, (1985) eds. Alan R. Liss, Inc. pp.243-256; Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (1987), eds. Robinson *et al.*, (Marcel Dekker, Inc.) pp. 623-53; Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review" en Monoclonal Antibodies' 84: Biological And Clinical Applications, Pinchera *et al.* (eds.) pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy" en Monoclonal Antibodies For Cancer Detection and Therapy, Baldwin *et al.* (eds.) pp. 303-16 (Academic Press 1985); Thorpe *et al.*, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62:119-58 (1982) y Dubowchik *et al.*, 1999, Pharmacology and Therapeutics, 83, 67-123.

Alternativamente, un anticuerpo puede conjugarse con un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpo como se describe en Segal en la patente US 4.4.676.980.

Un anticuerpo con o sin resto terapéutico conjugado puede usarse como terapéutico que se administra sólo o en combinación con factor(es) citotóxico(s) y/o citoquina(s).

Un anticuerpo que se utiliza solamente para la detección/ cuantificación puede generarse en otras especies de mamíferos p. ej. conejo y dirigirse contra su homólogo del SC6 humano, consiguiendo que el anticuerpo reaccione cruzadamente y todavía reconozca los polipéptidos SC6 humanos para uso en la invención (p. ej. transportador de taurina de conejo y anti-rata (TAU 11) n° de catálogo TAU 11S, Alpha Diagnostic International Inc, San Antonio, TX 78238 USA).

Ahora se describe la invención con referencia a los siguientes ejemplos, que no deben constituirse en modo alguno en limitaciones del alcance de esta invención. Los ejemplos hacen referencia a las figuras en que:

Figura 1: Muestra la expresión de un ARNm de SC6 en células endoteliales microvasculares dérmicas humanas (HDMEC) en condiciones normóxicas e hipóxicas durante un periodo de tiempo de 4-16 horas. Los niveles de ARNm de 6 se cuantificaron por RT-PCR en tiempo real. Los niveles de ARNm se expresan como número de copias ng^{-1} de ADNc.

Figura 2: muestra la expresión de ARNm del 6 en líneas celulares de cáncer de mama (MCF7 y MDA435) y en células de carcinoma de células renales (RCC4), bajo condiciones normóxicas (N) e hipóxicas (H). Las barras rellenas representan los recuentos hipóxicos y las barras claras representan recuentos normóxicos. Los niveles de ARNm se expresan como número de copias ng^{-1} de ADNc.

Figura 3: muestra la distribución en tejidos de ARNm de 6. Los niveles de ARNm de SC6 fueron determinados en un panel de tejidos normales por RT-PCR en tiempo real. Los niveles de ARNm se expresan como número de copias ng^{-1} de ADNc.

Figura 4: muestra la expresión de ARNm de SC6 en siete tejidos de tumor de mama emparejados. Los tejidos tumorales se designan con una (T) y los tejidos normales emparejados con una (N). Los niveles de ARNm se expresan como número de copias ng^{-1} de ADNc.

Figura 5: muestra la expresión de ARNm de SC6 en tejidos de tumor emparejados y tejidos de control procedentes de la mama, el cuello de útero, el colon, los riñones, los pulmones, el timo y el útero. Los niveles de ARNm de SC6 fueron determinados por RT-PCR en tiempo real. Los niveles de ARNm se expresan como número de copias ng^{-1} de ADNc. Las barras sombreadas representan recuentos en tejidos tumorales y las barras claras representan recuentos en tejidos de control.

Figura 6: muestra la expresión de ARNm de SC6 en varias líneas celulares cancerosas. El panel de líneas celulares humanas investigado es el siguiente: osteosarcoma humano (MG63); carcinoma de mama (MDA-MB-453, MDA-MB-468, BT20, BT474, CAL51, DU4475 y T47D); carcinoma renal (Wilm); células renales normales transformadas (293); líneas celulares fibroblásticas normales transformadas (MRC-5); sarcoma uterino (MES-SA); carcinoma cervical (HeLa S3); carcinoma pancreático (Mia Paca, Panc 1, PC3, PC3M); células endoteliales microvasculares dérmicas humanas (HDMECQ y HDMECQ-VEGF). Los niveles de ARNm de SC6 fueron determinados por RT-PCR en tiempo real. Los niveles de ARNm se expresan en número de copias ng^{-1} de ADNc.

Figura 7: muestra la expresión de ARNm de SC6 en muestras clínicas y normales del sistema linfático, clínicas: muestras de linfoma 9-37 y normales: CD34+, de leucocito en sangre, bazo y timo. Adicionalmente, se muestra también la expresión de ARN de SC6 para un panel de líneas celulares de linfoma/leucemia, que incluye, linfoma de Burkitt (Raji, Daudi, CA46, Namalwa, Ramos); MUTU III, BL58, OZ, SUD HL6, KHM108, leucemia de células T (Jurkat); leucemia aguda monocítica (THP-1); leucemia mielógena crónica (K-562); leucemia mielógena aguda (KG-1); REC1 MV, K1106, K-231, AS293, BL115 y leucemia promielocítica (HL-60). Los niveles de ARNm se expresan en número de copias ng^{-1} de ADNc.

Ejemplo 1

Expresión de ARNm de SC6 en condiciones hipóxicas

Crecimiento de células endoteliales primarias en condiciones normóxicas e hipóxicas

Las células HDMEC se trataron exponiéndolas a condiciones normóxicas o hipóxicas (1% O_2) durante 4, 8, o 16 h (metodología para el cultivo de células como en Ratcliffe P *et al.*, Nature, 1999, 399, 271-275). Después de la exposición, se recolectaron las células para la preparación de ARNm.

Análisis de la expresión génica mediante micromatrices (GEM)

Se realizó un análisis detallado de la expresión diferencial de genes en células HDMEC que han crecido en condiciones normóxicas (control) o hipóxicas (tratadas) durante 4, 8 y 16 h utilizando los servicios de construcción de micromatrices GEMTM ofertados por Incyte Genomics, Ltd. Paloalto, USA). En resumen, se suministraron pares de ARNm polyA⁺ que se correspondían con las claves de comparación sometidas a investigación (en este caso hipoxia frente a normoxia) La preparación de ARNm se realizó utilizando el protocolo Incyte. Incyte, preparó sondas etiquetadas y realizó una reacción de hibridación competitiva con estas sondas a una de sus micromatrices humanas estándar.

El análisis GEM de células endoteliales primarias mostró que el gen del SC6 aumentó en condiciones de hipoxia.

TABLA 1

Cambio en número de veces de SC6 por análisis GEM utilizando matrices Incyte ADNc10.000

Hipoxia (h)	4	8	16
Aumento en número de veces en la expresión del SC6 comparado con células en normoxia	2,4	2,8	6,1

Cuantificación del ARNm de SC6 por RT-PCR

Para confirmar los resultados del análisis GEM, se usó RT-PCR cuantitativa en tiempo real (como se describe en el ejemplo 2) para analizar la expresión de ARNm de SC6 en cultivos primarios de células endoteliales, HDMEC, cultivados en condiciones normóxicas e hipóxicas.

La expresión del ARNm de SC6 fue cuantificada en células endoteliales HDMEC tras 4,8 y 16 h de exposición a condiciones normóxicas o hipóxicas (Figura 1). En consonancia con los resultados del análisis GEM, encontramos un aumento drástico de los niveles de ARNm de SC6 después de 16 h de exposición a la hipoxia comparado con condiciones de normoxia.

La expresión de ARNm de SC6 se cuantificó también en líneas celulares de carcinoma celular renal, (RCC4), y en dos líneas celulares de carcinoma de mama, (adenocarcinoma de mama de humanos caucásicos, ECACC, MCF7 y efusiones pleurales metastáticas de glándulas mamarias, carcinoma ductal, ATCC, MDA-435), cultivados en condiciones hipóxicas o normóxicas durante 16 h (figura 2).

La presencia de hipoxia se asoció a un gran aumento de la expresión de ARNm de SC6 en todos los casos, indicando que la expresión del SC6 está inducida por factores hipóxicos.

Ejemplo 2

Expresión del ARNm de SC6 en tejidos humanos

Se utilizó RT-PCR cuantitativa a tiempo real (Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. & Williams, P.M. Genome Res. 6, 986-994 (1996); Morrison, T.B., Weis, J.J. & Wittwer, C.T. Biotechniques 24, 954-958 (1998)) para analizar la distribución de ARNm en tejidos humanos normales (Figura 3) y en parejas de tejidos clínicamente normales y tejidos tumorales cancerosos (Figuras 4 y 5) y en líneas celulares tumorales (Figura 6).

Cuantificación del ARNm de SC6 por RT-PCR

Se utilizó RT-PCR para medir cuantitativamente la expresión del ARNm del SC6 en tejidos humanos normales y en parejas de tejidos clínicamente normales y tejidos tumorales cancerosos (Clontech). Los cebadores utilizados para PCR fueron los siguientes:

homosentido 5' atcggctatgcctccgtttaa 3' (SEQ ID N° 3)

antisentido 5' agttggtggagctgatggtgat 3' (SEQ ID N° 4)

Las reacciones que contienen de 5 ng de ADNc, preparados utilizando el kit de RT-PCR Superscript para la síntesis de la primera hebra (Life Technologies), reactivos de detección de secuencias SYBR verdes (PE Biosystems) y cebadores homosentido y antisentido, se ensayaron en un sistema de detección de secuencias ABI7700 (PE Biosystems). Las condiciones del PCR fueron 1 ciclo a 95°C durante 10 min seguido de 40 ciclos a 95°C durante 30 seg y 65°C durante 1 min. La acumulación del producto de PCR se midió en tiempo real como el aumento de fluorescencia verde de SYBR, y los datos se analizaron con el programa Sequence Detector v1.6.3 (PE Biosystems). Las curvas patrón que relacionan el número inicial de copias del molde con la fluorescencia y el ciclo de amplificación se generaron utilizando como molde el producto PCR amplificado, y se utilizaron para calcular el número de copias de SC6 en cada muestra. La expresión del ARNm del SC6 se muestra como un nivel relativo de expresión de ARNm (número de copias ng⁻¹ de ADNc).

La expresión del ARNm de SC6 fue baja en la mayoría de los tejidos normales, encontrándose los mayores niveles de expresión en tejidos normales de las amígdalas, de la traquea y mamaris (Figura 3).

La expresión del ARNm de SC6 se examinó en siete parejas de muestras clínicas de tejidos normales y tumorales de mama (obtenidas con permiso del IMM, Oxford, UK). En todos los casos la expresión del ARNm de SC6 aumentó en las muestras tumorales con respecto a las muestras de los tejidos normales emparejados (Figura 4).

El nivel de ARNm de SC6 además fue cuantificado en parejas de tejidos normales y tumorales de muestras de mama, cuello de útero, colon, riñones, pulmones, timo y útero (Figura 5). Estas muestras fueron obtenidas de BD Biosciences Clontech, 1020 East Meadow Circle, Palo Alto, CA 94303. Encontramos que la expresión del ARNm de SC6 en las células de carcinoma cervical (1/1), de colon (2/3), de riñón (1/1), de pulmón (2/2) y uterinas (1/1) aumentó con respecto a las muestras de control emparejadas correspondientes.

La expresión del ARNm de SC6 fue también determinada en un número de líneas celulares tumorales humanas (Figura 6). Se investigó la siguiente lista de líneas celulares humanas: osteosarcoma humano (MG63); carcinoma de mama (MDA-MB-453, MDA-MB-468, BT20, BT474, CAL51, DU4475 y T47D); carcinoma renal (Wilm); líneas celulares renales normales transformadas (293); líneas celulares fibroblásticas normales transformadas (MRC-5); sarcoma uterino (MES-SA); carcinoma cervical (HeLa S3); carcinoma pancreático (Mia Paca, Panc 1, PC3, PC3M);

células endoteliales microvasculares dérmicas humanas (HDMECQ y HDMECQ-VEGF). Estas líneas celulares se obtuvieron de los siguientes proveedores: American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, USA; European Collection of Cell Cultures (ECACC), Salisbury, Wiltshire, UK y BioWhittaker House, Wokingham, Berkshire, UK y se cultivaron en medios acordes con las especificaciones del fabricante. Se encontró que los niveles de ARNm de SC6 en determinadas líneas celulares de carcinomas mamarios estaban elevados y que los niveles de ARNm de SC6 habían aumentado particularmente en líneas celulares de carcinomas renales, uterinos y pancreáticos.

Adicionalmente, se examinaron los niveles de ARNm de SC6 en muestras clínicas y normales del sistema linfático. Las muestras clínicas de linfoma validadas patológicamente se obtuvieron de Ardaís Corporation (Lexington, MA, USA) con el apoyo consiguiente del Institucional Review Board (Figura 7). Adicionalmente, la expresión del ARNm de SC6 se comparó en una gama de líneas celulares de linfoma/leucémicas, que incluye, linfoma de Burkitt (Raji, Daudi, CA46, Namalwa, Ramos); leucemia de células T (Jurkat); leucemia aguda monocítica (THP-1); leucemia mielógena crónica (K-562); leucemia mielógena aguda (KG-1); leucemia promielocítica (HL-60)-todas disponibles en ATCC o ECACC- y otras líneas celulares de leucemia, MUTU III, BL58, OZ, SUD HL6, KHM108, REC1 MV, K1106, K-231, AS293, y BL115. en cuanto a las líneas celulares de carcinoma de la Figura 3, ciertas líneas celulares linfoma/leucemia presentaron aumento de la expresión del ARNm del SC6, incluyendo líneas celulares de linfoma de Burkitt (1/5), leucemia aguda monocítica (1/1), leucemia mieloide crónica (1/1) y SUD HL6.

Similarmente se observó un aumento del ARNm de SC6 en el 65% de las muestras clínicas de linfoma comparadas con las muestras normales del sistema linfático. En estos casos el SC6 pudiera ser una buena diana para la intervención terapéutica p. ej. con un anticuerpo humano anti-SC6 o con agentes que inhiben o regulan en descenso la expresión o actividad del SC6.

En los escenarios clínicos es muy probable que ciertas regiones de un cáncer sean hipóxicas. Nuestros descubrimientos indican que el SC6 está regulado en ascenso en respuesta a la hipoxia. Puede producirse el caso de que (para alguna o todas las células) el tejido canceroso esté desregulado con respecto a su respuesta hipóxica y así, SC6 está expresado en ascenso constitutivamente.

En resumen, SC6 muestra un perfil de expresión bajo en tejidos normales aunque este perfil de expresión es alto en ciertos tejidos tumorales y líneas celulares cancerosas p. ej. carcinoma celular cervical, de colon, renal, de pulmón, uterino, de mama y pancreático, además de linfoma de Burkitt y leucemia mieloide. En particular, el SC6 está elevado en condiciones hipóxicas indicando que puede ser un marcador celular de tumores hipóxicos.

La regulación en ascenso del SC6 puede servir para aumentar los niveles de taurina de la célula hipóxica tumoral y de esa manera proteger la célula tumoral del daño celular debido a bajas concentraciones de oxígeno. Lo que es más, este mecanismo de protección permitiría la continua proliferación y movilidad de las células tumorales. Así, el SC6 puede usarse como marcador en la diagnosis de, o como diana en el tratamiento de, el cáncer.

Los características preferidas de cada aspecto de esta invención son aplicables, mutatis mutandi, a cada uno de los otros aspectos de la invención.

REIVINDICACIONES

5 1. Un método para escrutar y/o diagnosticar el carcinoma de mama en un sujeto y/o controlar la efectividad de la terapia para dicho carcinoma, que comprende la etapa de detectar y/o cuantificar en una muestra biológica obtenida de dicho sujeto un polipéptido SC6 que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 1, en el que el polipéptido se detecta y/o cuantifica utilizando un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido SC6.

10 2. Un método para escrutar y/o diagnosticar el carcinoma de mama en un sujeto y/o controlar la efectividad de la terapia para dicho carcinoma, que comprende la etapa de detectar y/o cuantificar en una muestra biológica obtenida de dicho sujeto la cantidad de una secuencia de ácido nucleico ADN aislado o recombinante que:

a) comprende o consiste en la secuencia de ADN de SEQ ID N° 2; o su ARN equivalente;

15 b) es una secuencia que es complementaria de las secuencias de a; o

c) es una secuencia que codifica el mismo polipéptido que la secuencia de aminoácidos SEQ ID N° 1.

20 3. Un método según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es monoclonal, policlonal, quimérico, humanizado o biespecífico o está conjugado con un segundo anticuerpo, o un fragmento del mismo.

4. El uso de un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido SC6 que comprende la SEQ ID N° 1, en la preparación de un medicamento para el tratamiento del carcinoma de mama.

25 5. El uso según la reivindicación 4, en el que el anticuerpo es monoclonal, policlonal, quimérico, humanizado o biespecífico, o está conjugado con un resto terapéutico, un agente citotóxico o una citoquina.

30

35

40

45

50

55

60

65

Figura 1

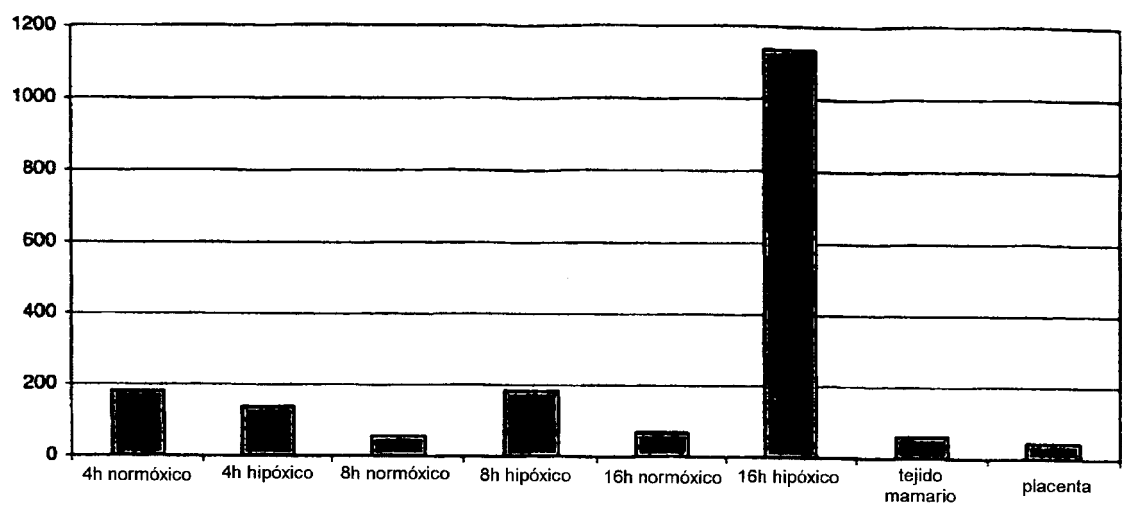


Figura 2

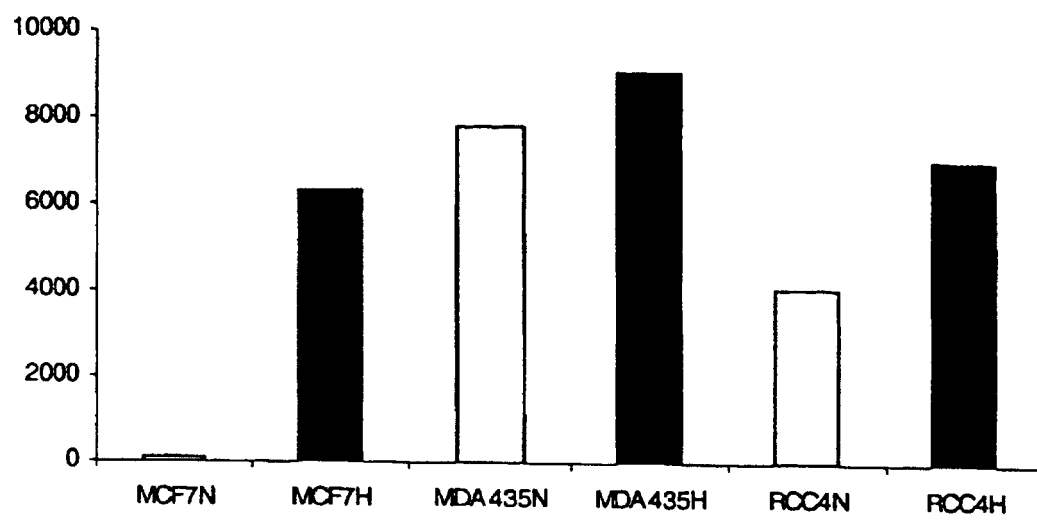


Figura 3

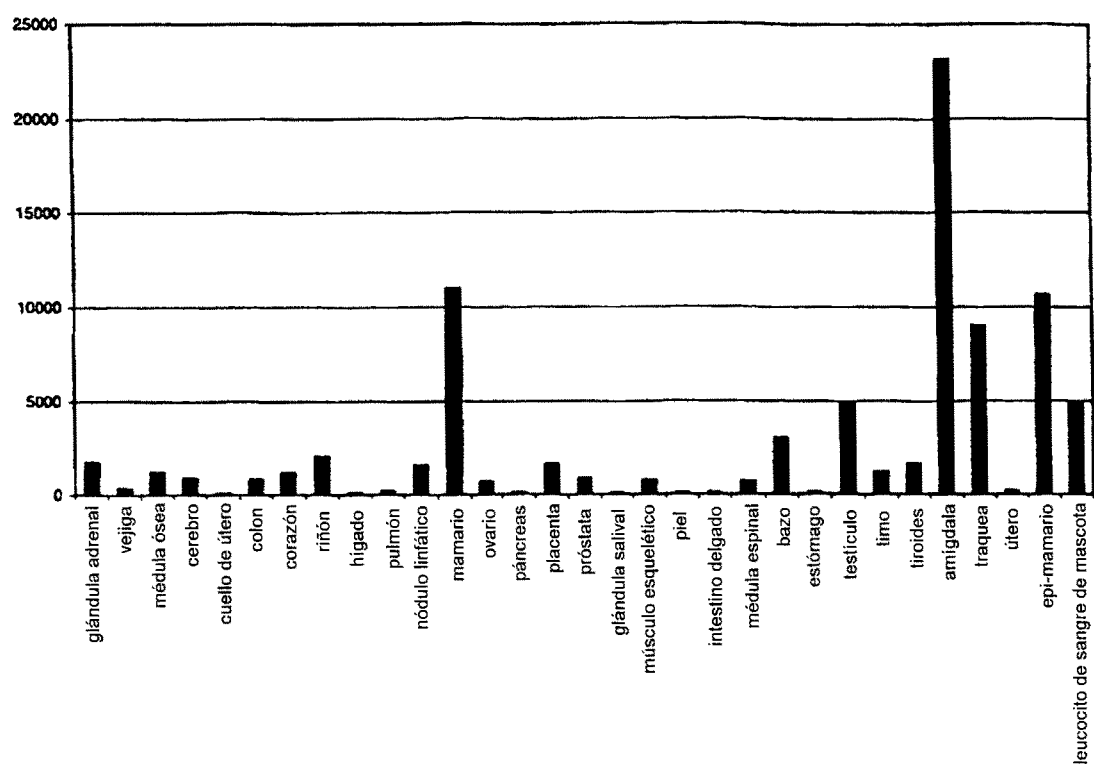


Figura 4

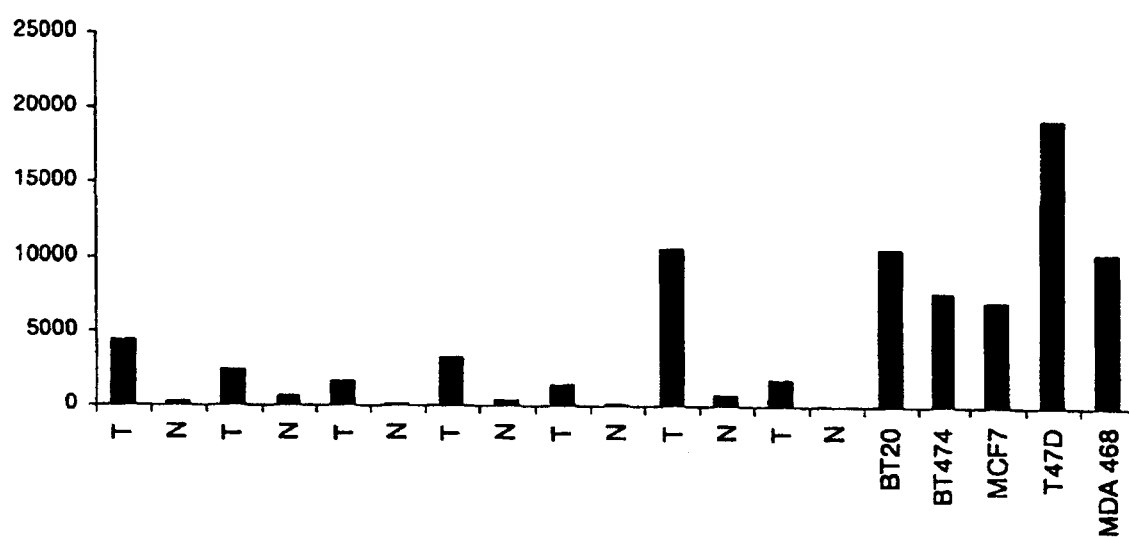


Figura 5

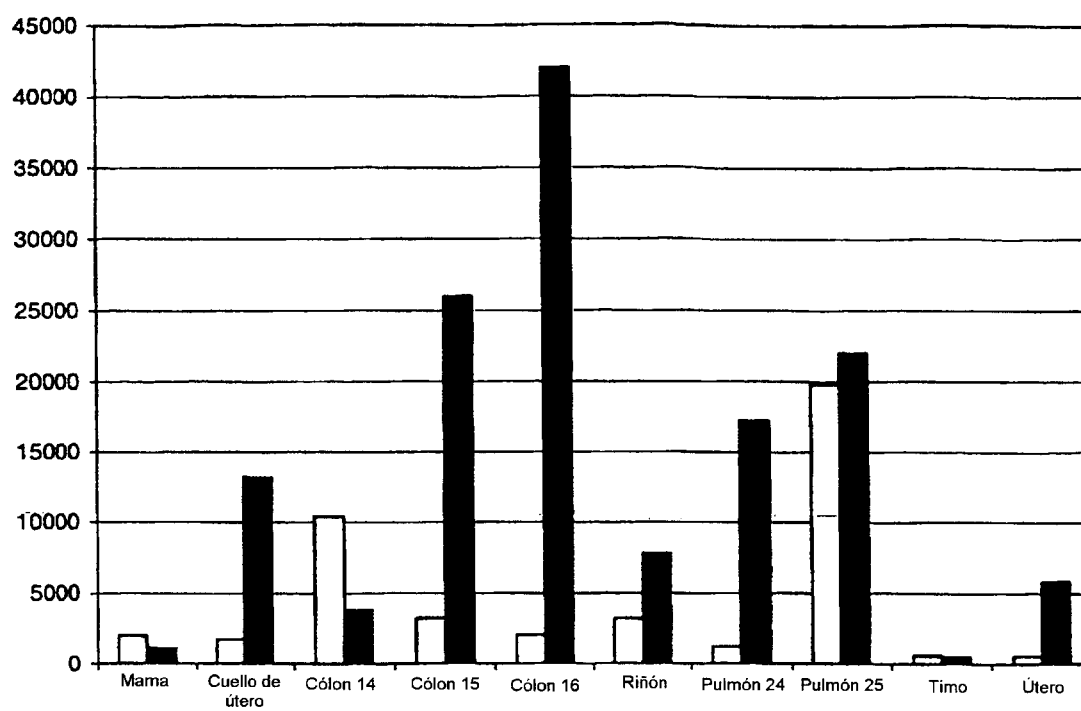


Figura 6

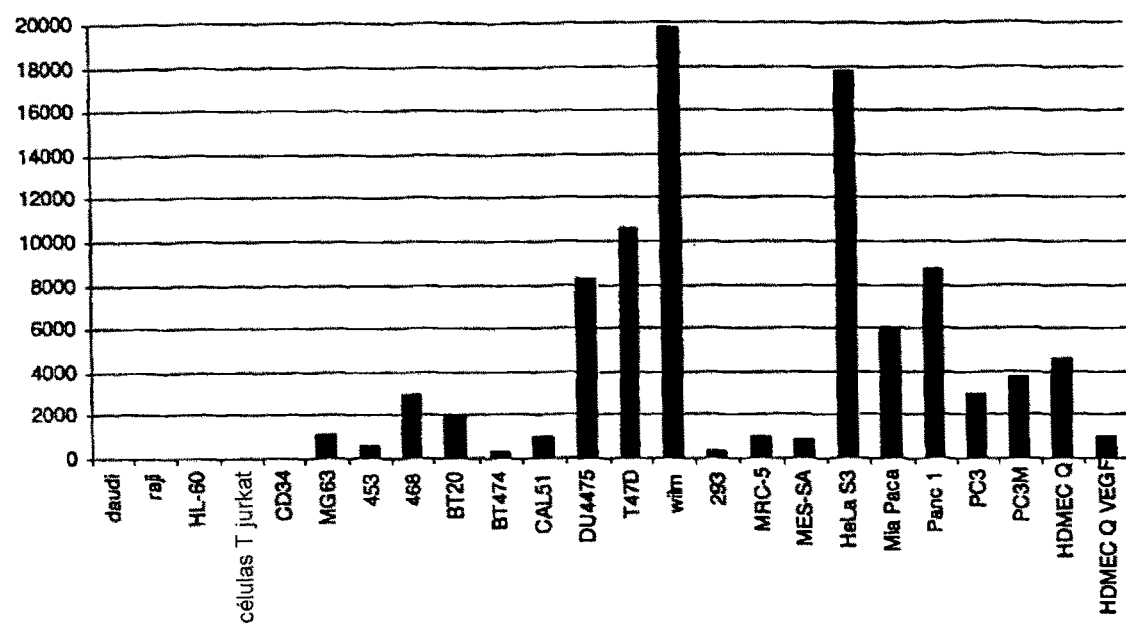
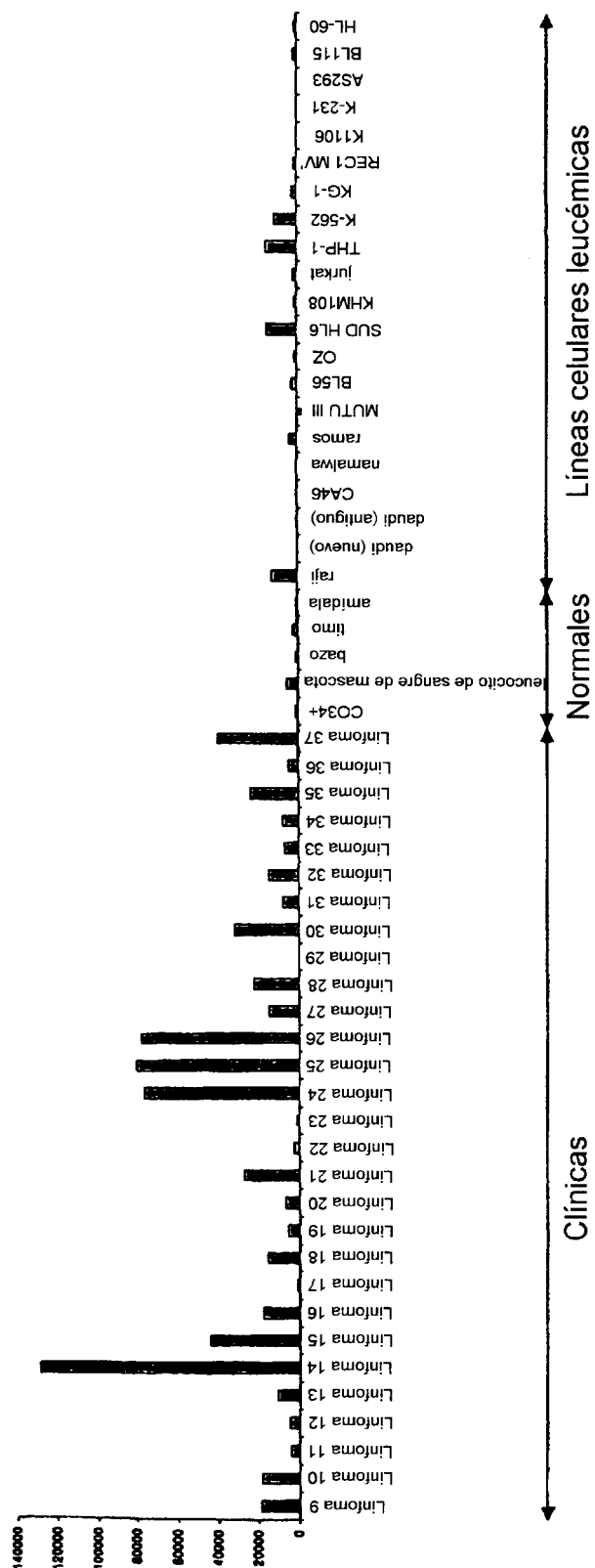


Figura 7



ES 2 307 911 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Oxford GlycoSciences (UK) Ltd;
 Patel, Sonal
 5 <120> PROTEÍNA PARA USO EN AFECCIONES RELACIONADAS CON HIPOXIA
 <130> P0114-W001
 <150> GB 0207533.1
 10 <151> 2002-04-02
 <160> 4
 <170> PatentIn versión 3.1
 <210> 1
 15 <211> 619
 <212> PRT
 <213> *Homo Sapiens*
 20 <400> 1

Met Ala Thr Lys Glu Lys Leu Gln Cys Leu Lys Asp Phe His Lys Asp
 1 5 10 15
 25

Met Val Lys Pro Ser Pro Gly Lys Ser Pro Gly Thr Arg Pro Glu Asp
 20 25 30
 30

Glu Ala Glu Gly Lys Pro Pro Gln Arg Glu Lys Trp Ser Ser Lys Ile
 35 40 45
 35

Asp Phe Val Leu Ser Val Ala Gly Gly Phe Val Gly Leu Gly Asn Val
 50 55 60
 40

Trp Arg Phe Pro Tyr Leu Cys Tyr Lys Asn Gly Gly Gly Ala Phe Leu
 65 70 75 80
 45

Ile Pro Tyr Phe Ile Phe Leu Phe Gly Ser Gly Leu Pro Val Phe Phe
 85 90 95
 50

Leu Glu Ile Ile Ile Gly Gln Tyr Thr Ser Glu Gly Gly Ile Thr Cys
 100 105 110
 55

Trp Glu Lys Ile Cys Pro Leu Phe Ser Gly Ile Gly Tyr Ala Ser Val
 115 120 125
 60

Val Ile Val Ser Leu Leu Asn Val Tyr Tyr Ile Val Ile Leu Ala Trp
 130 135 140
 65

Ala Thr Tyr Tyr Leu Phe Gln Ser Phe Gln Lys Glu Leu Pro Trp Ala
 145 150 155 160

ES 2 307 911 T3

5	His Cys Asn His Ser Trp Asn Thr Pro His Cys Met Glu Asp Thr Met 165 170 175
10	Arg Lys Asn Lys Ser Val Trp Ile Thr Ile Ser Ser Thr Asn Phe Thr 180 185 190
15	Ser Pro Val Ile Glu Phe Trp Glu Arg Asn Val Leu Ser Leu Ser Pro 195 200 205
20	Gly Ile Asp His Pro Gly Ser Leu Lys Trp Asp Leu Ala Leu Cys Leu 210 215 220
25	Leu Leu Val Trp Leu Val Cys Phe Phe Cys Ile Cys Lys Gly Val Arg 225 230 235 240
30	Ser Thr Gly Lys Val Val Tyr Phe Thr Ala Thr Phe Pro Phe Ala Met 245 250 255
35	Leu Leu Val Leu Leu Val Arg Gly Leu Thr Leu Pro Gly Ala Gly Arg 260 265 270
40	Gly Ile Lys Phe Tyr Leu Tyr Pro Asp Ile Thr Arg Leu Glu Asp Pro 275 280 285
45	Gln Val Trp Ile Asp Ala Gly Thr Gln Ile Phe Phe Ser Tyr Ala Ile 290 295 300
50	Cys Leu Gly Ala Met Thr Ser Leu Gly Ser Tyr Asn Lys Tyr Lys Tyr 305 310 315 320
55	Asn Ser Tyr Arg Asp Cys Met Leu Leu Gly Cys Leu Asn Ser Gly Thr 325 330 335
60	Ser Phe Val Ser Gly Phe Ala Ile Phe Ser Ile Leu Gly Phe Met Ala 340 345 350
65	Gln Glu Gln Gly Val Asp Ile Ala Asp Val Ala Glu Ser Gly Pro Gly 355 360 365
	Leu Ala Phe Ile Ala Tyr Pro Lys Ala Val Thr Met Met Pro Leu Pro 370 375 380
	Thr Phe Trp Ser Ile Leu Phe Phe Ile Met Leu Leu Leu Leu Gly Leu 385 390 395 400

ES 2 307 911 T3

Asp Ser Gln Phe Val Glu Val Glu Gly Gln Ile Thr Ser Leu Val Asp
 405 410 415
 5
 Leu Tyr Pro Ser Phe Leu Arg Lys Gly Tyr Arg Arg Glu Ile Phe Ile
 420 425 430
 10
 Ala Phe Val Cys Ser Ile Ser Tyr Leu Leu Gly Leu Thr Met Val Thr
 435 440 445
 15
 Glu Gly Gly Met Tyr Val Phe Gln Leu Phe Asp Tyr Tyr Ala Ala Ser
 450 455 460
 20
 Gly Val Cys Leu Leu Trp Val Ala Phe Phe Glu Cys Phe Val Ile Ala
 465 470 475 480
 25
 Trp Ile Tyr Gly Gly Asp Asn Leu Tyr Asp Gly Ile Glu Asp Met Ile
 485 490 495
 30
 Gly Tyr Arg Pro Gly Pro Trp Met Lys Tyr Ser Trp Val Ile Thr Pro
 500 505 510
 35
 Val Leu Cys Val Gly Cys Phe Ile Phe Ser Leu Val Lys Tyr Val Pro
 515 520 525
 40
 Leu Thr Tyr Asn Lys Thr Tyr Val Ser Pro Thr Trp Ala Ile Gly Leu
 530 535 540
 45
 Gly Trp Ser Leu Ala Leu Ser Ser Met Leu Cys Val Pro Leu Val Ile
 545 550 555 560
 50
 Val Ile Arg Leu Cys Gln Thr Glu Gly Pro Phe Leu Val Arg Val Lys
 565 570 575
 55
 Tyr Leu Leu Thr Pro Arg Glu Pro Asn Arg Trp Ala Val Glu Arg Glu
 580 585 590
 60
 Gly Ala Thr Pro Tyr Asn Ser Arg Thr Val Met Asn Gly Ala Leu Val
 595 600 605
 65
 Lys Pro Thr His Ile Ile Val Glu Thr Met Met
 610 615
 <210> 2
 <211> 3969
 <212> ADN
 <213> *Homo Sapiens*

ES 2 307 911 T3

<400> 2

	gaattccgaa agcaaggaga tggccaccaa ggagaagctg cagtgtctga aagatttcca	60
5	caaggacatg gtgaagccct caccagggaa gagcccaggc acgcggcctg aggacgagggc	120
	tgagggaaaa cctccgcaga gggagaagtg gtctagcaag atcgactttg tgctctctgt	180
10	ggctggcggc ttcgtgggct tgggcaacgt ctggcgcttc ccgtacctct gctacaagaa	240
	tggtggaggt gcgtttctca taccgtatct tattttcctg tttgggagcg gcctgcctgt	300
	gtttttcttg gagatcatca taggccagta cacctctgaa gggggcatca cctgctggga	360
15	aaagatctgc cccttgttct ctggtatcgg ctatgcctcc gttgtaattg tgccccctct	420
	gaatgtctac tacatcgtca tcctggcctg ggccacatac tacctgttcc agtccttcca	480
	gaaggagctg ccctgggcac actgcaacca cagctggaac acacctcact gcatggagga	540
20	caccatgcgc aagaacaaga gtgtctggat caccatcagc tccaccaact tcacctcccc	600
	tgctcatcag ttctgggagc gcaacgtgct gagcttgctc cctggaatcg accaccagg	660
25	ctctctgaaa tgggacctcg ctctctgcct tcttttagtc tggctagtgt gtttctcttg	720
	catctgcaag ggcgtcaggt ccactgggaa ggtcgtctac ttcacagcca cttttccatt	780
	cgccatgctc ctggtgctgc tggctcgagg gctgacgtg ccggggcgcg gccgaggcat	840
30	caagtcttat ctgtatcctg acatcacccg ccttgaggac ccacagggtg ggattgacgc	900
	tgggactcag atattcttct ctatgccat ctgcctgggg gctatgacct cgctggggag	960
	ctacaacaag tacaagtata actcgtacag ggactgtatg ctgctgggat gcctgaacag	1020
35	tgggtaccagt tttgtgtctg gcttcgcaat tttttccatc ctgggcttca tggcacaaga	1080
	gcaagggggtg gacattgctg atgtggctga gtcaggctct ggctggcctc tcattgccta	1140
40	cccaaaagct gtgacaatga tgccgctgcc cacatttttg tccattcttt tttttattat	1200
	gcttctcttg ctgggactgg atagccagtt tgttgaagtt gaaggacaga tcacatcctt	1260
	ggttgatctt taccatcctc tcctaaggaa ggggttatcg cgggaaatct tcatcgctct	1320
45	cgtgtgtagc atcagctacc tgctggggct gacgatggtg acggaggggtg gcatgtatgt	1380
	gtttcagctc tttgactact atgcagctag cgggtgatgc cttttgtggg ttgcattctt	1440
	tgaatgtttt gttattgcct ggatatatgg aggtgataac ctttatgatg gtattgagga	1500
50	catgattggc tatcggcccg ggccctggat gaagtacagc tgggtgatca ctccagttct	1560
	ctgtgttgga tgtttcatct tctcgtcgt caagtacgta cccctgacct acaacaaaac	1620
55	atacgtgtcc ccaacttggg ccattgggct gggctggagc ctggcccttt cctccatgct	1680
	ctgcgttccc ttgggtcatc tcatecgct ctgccagact gaggggcccgt tccttgtgag	1740
	agtcaagtac ctgctgacct caagggaacc caaccgctgg gctgtggagc gcgagggagc	1800

ES 2 307 911 T3

	cacaccttac aactctcgca ccgtcatgaa cggcgctctc gtgaaaccga cccacatcat	1860
5	tgtggagacc atgatgtgag ctctctcggg tcgacggggc cggcggcttt cctgctgttt	1920
	actaacatta gattcacata ggaccaggtt tacagagctt tatatttgca ctaggatttt	1980
	tttttttttg taattgtcac agaaaatgta attgtgggta tgtgtgcgtg cgtgtgtgtg	2040
10	tgtgtgtgtg tgtatcgtgt gtgtgtgttt tgttttgatt tgggggatat tttgtacaaa	2100
	aagaaaaccc acgggaagat gtccgtggag aggcagagct ttcatactga attagatgta	2160
15	ttttatggga atttggtaaa ttttcttttg tttttttttt tttacatata agtatatata	2220
	cacttagaga ttgtcatata cttttaccac ttgaattgat cttcttgcca gcaatagatc	2280
	tcattttcaa aagcaattct tcggtgctgt gtagctggca gaaagtcttg tccagtaaac	2340
20	gcaggatgga attttctcgg gactctacac ccattcttaag gtggtatacc ttccaaatcc	2400
	tggttcagat ggaagaaata gcaggagaga ggaccatta gctggcagac ccaggggaag	2460
25	aaaggagggc tgtgaggaga tacctcatta aacttggtt agtgaagaag agagatgcca	2520
	aaggaatgaa ccaacccttc acataaagga gactggctga agctgaatga ggaggcccta	2580
	tagcagaagt ctgattctaa gagcagtaga aacttgtagc agaagcaaaa tcccactttt	2640
30	aattttgaga tgggtgagtgg atagtcagta gaccgtcaga accactggcc agagagggag	2700
	ctgctagaga tccaagaagg ctggcaggaa tgaggctcac aactcagcct cgcaagaggt	2760
35	ggcagaggca caggaggcca cagtccttcc tggggcattc caggcagaga aggagcagag	2820
	gctctcccg caggagctgg ggtctcaggg ctcatagtag tctgttgcac ttgaatgggg	2880
40	tcatagcagg ttctgggtcat tccccaaagca acatctcagc atctcttaaa gttgcctgca	2940
	ggaatgaagc atgacatacc tgttgaggga ctaggggagt ggtggggagg tgagtggacc	3000
	aaaggatata ggccccaggc atgcagatgg gcccggtgtc ggggaggggt gctttctttc	3060
45	ctcatctccc cactccccac tctcagcctg ggagactcct gccaaagccct cattaaagat	3120
	gccaccctgg gctgccctgg cacctagcaa ggcacaccaa gaacagcttt tgagtcgtat	3180
50	cctccactgg ggaagtgtct ccagttcaga acaagggcag cccgtggtgc tgacctagga	3240
	tataacaaag ctcttcactt caaaacccct gcaatagctg ggtttacaga catttaccac	3300
	ctggggaccc aaaagagaag gcctaggaga gttttctaga aggttgggat tgtcagggtc	3360
55	ctggcccccc agaactggct tgatcaaggg ccttatgtgg agcagagggt gtctctgaac	3420
	caggagagaa ggtactatac ctttcaaatc cccagggcag acacaccccc acccagcccc	3480
60	tatttggacc taaactgtgc catttgaaca gtcacttcca agctcagtct aaatgaaacc	3540
	gaaacgtgac cacgcacaaa ggcagtcact gctcgagggg tgcagaccgc agaattttca	3600

65

ES 2 307 911 T3

5 cagcaggggc tcttggaaact ctggaaaccc ccttcttaaa tttgggagga ggagtatgcc 3660
 tttggtgtcc ccctcccaag ggcaattctg aaccccatct ttggcaggca tacatatctc 3720
 10 actgtttcca aagctatcta ctctgcaaaa caacaccag tcctattcca aactctcaac 3780
 gattctatct tgttcctgtt tttctatgta tttatgggtg ccgtttgtgt ctgatttgat 3840
 tttactgttt ttccctgat tttatggagt agcattgtga cctgttttcc tttgtcttat 3900
 ataactttag taaactaacc actgtcaatg attgagggca ggtggcacgt ggggaagagg 3960
 15 gcggaattc 3969

<210> 3

<211> 22

<212> ADN

<213> *Homo Sapiens*

<400> 3

25 atcggctatg cctccgtgt aa 22

<210> 4

<211> 22

<212> ADN

<213> *Homo Sapiens*

<400> 4

35 agttggtgga gctgatgggtg at 22

40

45

50

55

60

65