



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 267 266**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C07H 21/02 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **99921513 .0**

(86) Fecha de presentación : **29.04.1999**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1073682**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **07.02.2001**

(54) Título: **Sondas moleculares específicas de heparanasa y su uso en aplicaciones médicas y de investigación.**

(30) Prioridad: **01.05.1998 US 71739**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2007

(73) Titular/es: **Insight Biopharmaceuticals Ltd.
Kiryat Weizmann Science Park P.P.Box 2128
76121 Rehovot, IL
HADASIT MEDICAL RESEARCH SERVICES AND
DEVELOPMENT Ltd.**

(72) Inventor/es: **Pecker, Iris;
Vlodavsky, Israel;
Friedman, Yael y
Perets, Tuvia**

(74) Agente: **Isern Jara, Jorge**

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

Sondas moleculares específicas de heparanasa y su uso en aplicaciones médicas y de investigación.

5 **Campo y antecedentes de la invención**

La presente invención se refiere a las sondas moleculares específicas de heparanasa y su uso en aplicaciones médicas y de investigación. Más concretamente, la presente invención se refiere al uso de las sondas moleculares específicas de heparanasa, como los anticuerpos antiheparanasa (tanto poli- como monoclonales) y los ácidos nucleicos derivados del gen de heparanasa (*hpa*), incluyendo, entre otros los cebadores de PCR, las sondas oligonucleotídicas antisentido, las sondas de RNA antisentido, las sondas de DNA y otros similares para detectar y monitorizar las malignidades, la metástasis y otras condiciones no malignas, la eficacia de los tratamientos terapéuticos, la administración dirigida de los fármacos y la terapia.

Heparán sulfato proteoglicanos (HSPG): Los HSPG son macromoléculas ubicuas asociadas a la superficie celular y la matriz extracelular (MEC) de un gran campo de células de tejidos de vertebrados e invertebrados (1 a 5). La estructura básica de los HSPG consiste en un centro proteico al que están unidas de forma covalente varias cadenas lineales de heparán sulfato. Las cadenas de polisacáridos normalmente están compuestas por unidades repetitivas hexurónicas y disacáridos de D-glucosamina que son sustituidas en un campo variable con porciones de sulfato ligadas a N y O y grupos acetilo ligados a N (1 a 5). Estudios sobre la implicación de las moléculas de la MEC en la unión, el crecimiento y la diferenciación celular revelaron un papel central de los HSPG en la morfogénesis embrionaria, la angiogénesis, la metástasis, un brote de neuritis y en la reparación de tejidos (1 a 5). Las cadenas de heparán sulfato (HS), únicas en su capacidad para unir una multitud de proteínas, aseguran que una gran variedad de moléculas efectoras se adhiera a la superficie celular (4 a 6). Los HSPG también son componentes destacados de los vasos sanguíneos (3). En los vasos grandes están concentrados mayoritariamente en los medios íntima e interno, mientras que en los capilares se encuentran básicamente en la membrana basal subendotelial donde aguantan las células endoteliales que proliferan y emigran, y estabilizan la estructura de la pared capilar. La capacidad de los HSPG para interactuar con las macromoléculas de la MEC como el colágeno, la laminina y la fibronectina, y con diferentes lugares de adhesión en las membranas plasmáticas sugiere un papel clave para este proteoglicano en el autoensamblaje y la insolubilidad de los componentes de la MEC, además de la adhesión celular y la locomoción. Por lo tanto, la división del HS puede dar como resultado un desensamblaje de la MEC subendotelial y de ahí puede jugar un papel decisivo en la extravasación de las células sanguíneas (7 a 9). Se observa catabolismo del HS en la inflamación, la reparación de heridas, la diabetes y en la metástasis cancerígena, sugiriendo que las enzimas que degradan el HS juegan papeles importantes en los procesos patológicos.

Implicación de la heparanasa en la invasión de células tumorales y la metástasis: Las células tumorales circulantes detenidas en los lechos capilares de los diferentes órganos deben invadir el revestimiento celular endotelial y degradar su membrana basal inicial (MB) para salir hacia el tejido(s) extravascular donde establecen la metástasis (10). Se cree que varias enzimas celulares (p. ej. collagenasa IV, activador de plasminógeno, cathepsina B, elastasa) están involucradas en la degradación de la MB (10). Entre estas enzimas hay una endo- β -D-glucuronidasa (heparanasa) que divide el HS en sitios intracadenales específicos (7,9,11 a 12). Se descubrió que una heparanasa de degradación de HS estaba relacionada con el potencial metastásico del linfoma de ratón (11) y de las células de fibrosarcoma y de melanoma (9). El tratamiento de animales de experimentación con inhibidores de heparanasa (es decir, especies no anticoagulantes de heparina MW baja) redujo notablemente (>90%) la incidencia de metástasis pulmonares inducidas por el melanoma B16, el carcinoma pulmonar de Lewis y las células adenocarcinoma mamarias (8, 9, 13).

La actividad de la heparanasa no se pudo detectar en los fibroblastos estromales normales, mesoteliales y endoteliales y en las células musculares lisas derivadas de biopsias malignas y efusiones (12). Estas observaciones indican que la expresión de la heparanasa puede servir como un marcador para células tumorales y en concreto para esas que son altamente o potencialmente invasivas. Si se puede llegar a la misma conclusión mediante la inmunotinción de muestras tisulares, los anticuerpos de la antiheparanasa se pueden aplicar para la detección temprana y el diagnóstico de poblaciones celulares metastásicas y las micrometástasis.

Nuestros estudios sobre el control de la progresión del tumor mediante su entorno local, se centran en la interacción de las células con la matriz extracelular (MEC) producida por las células corneales cultivadas y las células endoteliales vasculares (CE) (14, 15). Esta MEC se parece mucho al subendotelio *in vivo* en su apariencia morfológica y su composición molecular. Contiene colágenos (la mayoría de los tipos III y IV, con cantidades más pequeñas de los tipos I y V), proteoglicanos (la mayoría proteoglicanos de heparán sulfato y sulfato de dermatano, con cantidades más pequeñas de proteoglicanos de sulfato de condroitina), laminina, fibronectina, entactina y elastina (13, 14). La capacidad de las células para degradar el HS en la MEC se estudió permitiendo que las células interactuaran con una MEC marcada metabólicamente con sulfato, seguido de una filtración de gel (Sefarosa 6B); el análisis de los productos de degradación se liberó en un medio de cultivo (11). Mientras que los HSPG intactos a continuación, se eluden en el volumen vacío de la columna ($K_{av} < 0,2$, $M_R \sim 0,5 \times 10^6$), los fragmentos de degradación marcados de las cadenas laterales del HS se eluden más hacia el V_t de la columna ($0,5 < K_{av} < 0,8$, $M_r = 5-7 \times 10^3$) (11).

Posible participación de la heparanasa en la angiogénesis tumoral: Los factores de crecimiento fibroblastos son una familia de polipéptidos relacionados estructuralmente que se caracterizan por su gran afinidad a la heparina (16). Son muy mitogénicos para las células endoteliales vasculares (CE) y están entre los inductores más potentes de

neovascularización (16, 17). El factor de crecimiento fibroblástico básico (FGFb) se ha extraído de la MEC subendotelial producida *in vitro* y de la MB de la córnea, sugiriendo que la MEC puede servir como depósito para el FGFb (18). Estudios sobre la interacción del FGFb con la MEC revelaron que el FGFb se une a los HSPG en la MEC y se pueden liberar de una forma activa mediante enzimas de degradación de HS (19, 20). La actividad de heparanasa expresada por plaquetas, mastocitos, neutrófilos y células del linfoma liberan el FGFb activo de la MEC y la MB (20), sugiriendo que la heparanasa puede funcionar no solo en la emigración celular y la invasión, sino que también puede obtener una respuesta neovascular indirecta (18). Estos resultados sugieren que los HSPG de la MEC proporcionan un almacén natural para el FGFb y posiblemente otros factores que promueven el crecimiento de unión de heparina. El desplazamiento del FGFb de su almacenamiento dentro de la MEC puede, por lo tanto, proporcionar un mecanismo nuevo para inducir la neovascularización en situaciones normales y patológicas (6, 18).

Búsqueda de metástasis mediante la detección de los biomarcadores cancerígenos: Detectar y monitorizar metástasis cancerígenas, algo que una vez pareció una tarea casi imposible, parece llegar al campo práctico. Los resultados de investigación presentados en el reciente "Annual Meeting of the American Association for Cancer Research and the American Society of Clinical Oncology" identificaron dos propuestas para detectar el inicio de la metástasis cancerígena.

(i) Cuantificando los niveles de dos citocinas, el factor de crecimiento endotelial vascular y el factor de crecimiento fibroblástico básico, que están involucradas en el proceso de angiogénesis que es de vital importancia para las metástasis tumorales; los investigadores han encontrado niveles elevados de ambas citocinas en el suero y la orina de la gente con carcinoma celular renal y cáncer pulmonar de células no pequeñas.

(ii) Los métodos de aislamiento celular y la amplificación del ácido nucleico que se han utilizado para detectar las células tumorales circulantes en la sangre periférica de los pacientes con melanoma y cáncer de próstata, ovarios, colon o pecho.

Se ha demostrado que es posible la utilidad clínica de estas pruebas en la monitorización de las células tumorales en el sistema circulatorio o en la detección de los factores críticos en el proceso de la angiogénesis. Estas pruebas pueden ayudar en la predicción del resultado del paciente, a controlar la respuesta del paciente al tratamiento y a orientar en la selección del mismo. Varias de estas pruebas ofrecen beneficios adicionales al ser bastante rápidas de realizar y mínimamente invasivas.

Por ejemplo, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento fibroblástico básico (FGFb) se midieron en muestras pre- y postoperatorias y en suero de pacientes metastásicos tratados y no tratados utilizando el método cuantitativo "quantikine EIA sándwich" de R&D Systems. La mayoría de pacientes con tumores sólidos metastásicos presentaban niveles séricos de ambas citocinas elevados, el tipo de tumor no era exclusivo de ninguno de los factores y los niveles elevados volvieron a la normalidad después de la quimioterapia o cirugía.

Otro ejemplo es la concentración sérica de Fragmento 19 de Citoqueratina soluble como factor de pronóstico del cáncer de pulmón no microcítico. Se analizó el suero archivado de 79 pacientes con cáncer de pulmón para la CK19 utilizando una ELISA Boehringer Mannheim. La concentración sérica estaba relacionada con el antígeno del carcinoma de células escamosas y se encontró que el periodo de supervivencia era mayor en los pacientes con niveles séricos normales de CK19.

Expresión de heparanasa en células del sistema inmunitario: La actividad de la heparanasa está relacionada con la capacidad de las células del sistema inmunitario activadas para salir de la circulación y proporcionar tanto las respuestas inflamatorias como las autoinmunes. La interacción de plaquetas, granulocitos, linfocitos T y B, macrófagos y mastocitos con la MEC subendotelial está asociada a la degradación del heparán sulfato (HS) por la actividad de la heparanasa (7). La enzima es liberada desde los compartimentos intracelulares (p. ej. Lisosomas, gránulos específicos) en respuesta a varias señales de activación (p. ej., trombina, ionomicina, complejos inmunitarios, antígenos, mitógenos), lo que sugiere su implicación regulada y su presencia en los sitios inflamatorios y lesiones autoinmunitarias. Es poco probable que las enzimas degradantes de heparán sulfato liberadas por plaquetas y macrófagos se encuentren en lesiones ateroscleróticas (21). Por lo tanto, las sondas de DNAC y los anticuerpos antiheparanasa se pueden emplear para la detección y el diagnóstico precoz de estas lesiones.

Clonación y expresión del gen de la heparanasa: La clonación y la expresión del gen humano de la heparanasa están descritas en la patente Estadounidense núm. 5.968.822. Una fracción purificada de heparanasa aislada de células de hepatoma humano se sometió a digestión trípica. Se separaron los péptidos por cromatografía líquida de alta presión y se microsecuenciaron. La secuencia de uno de los péptidos se utilizó para hacer un barrido de las bases de datos para hallar homología con la secuencia de DNA traducido correspondiente. Este procedimiento permitió la identificación de un clon que contenía un inserto de 1020 pares de bases (pb) que incluía un marco de lectura abierto de 963 pb seguido de 27 pb de la región 3' no traducida y una cola de Poli A. Se designó al nuevo gen por *hpa*. La clonación del extremo 5' que faltaba del DNAC de *hpa* se realizó por amplificación por PCR de DNA proveniente de compuesto de DNAC placentario. El plásmido que contenía el DNAC completo de la heparanasa se designó por *phpa*. El fragmento de DNAC unido contenía un marco de lectura abierto que codifica un polipéptido de 543 aminoácidos con un peso molecular (PM) calculado de 61.192 daltons. La capacidad del producto del gen *hpa* para catalizar la degradación del heparán sulfato (HS) *in vitro* se examinó mediante la expresión de todo el marco de lectura abierto de *hpa* en células de insecto Sf21 y células "High five", con el sistema de expresión de Baculovirus. Se ensayó con

extractos de células infectadas en busca de actividad de heparanasa. Con este fin se incubaron lisados celulares con HSPG marcados con sulfato derivados de la MEC (pico I), seguido de análisis por filtración en gel (Sefarosa 6B) de la mezcla de la reacción. Mientras el sustrato en sí mismo consistía en material de alto peso molecular (PM), la incubación del sustrato de HSPG con lisados de células infectadas con *hpa* que contenían virus dio lugar a una conversión completa del sustrato de alto PM en fragmentos de degradación de heparán sulfato marcados de bajo PM.

En los experimentos siguientes, el sustrato de HSPG marcado fue incubado con el medio de cultivo de células “High five” y Sf21 infectadas. La actividad de heparanasa, puesta de relieve por la conversión del sustrato HSPG de alto PM en fragmentos de degradación de HS de bajo PM, se encontró en el medio de cultivo de células infectadas con el virus pFhpa, pero no con el virus pF1 control. El conjunto de estos resultados indica que la enzima heparanasa es expresada de forma activa en células infectadas con Baculovirus que contienen el gen *hpa* humano acabado de identificar. En otros experimentos se ha demostrado que la enzima heparanasa expresada en células infectadas con el virus pFhpa es capaz de degradar el HS que está formando complejos con otros constituyentes macromoleculares (p. ej. Fibronectina, laminina o colágeno) y que está presente en una MEC intacta producida naturalmente en un modo similar al descrito en el caso de las células tumorales altamente metastásicas o células activadas del sistema inmunitario.

Purificación de la enzima heparanasa recombinante: La purificación del gen humano de la heparanasa está descrita en la Patente estadounidense Núm. 5.968.822. Se infectaron células Sf21 de insecto con virus pFhpa y se aplicó el medio de cultivo sobre una columna de heparina-Sefarosa. Se eluyeron fracciones con un gradiente salino (NaCl 0,35-2 M) y se sometieron a pruebas sobre actividad de heparanasa y perfil proteico (SDS-PAGE seguido de tinción con plata). La actividad de heparanasa estaba correlacionada con la aparición de una banda de proteína de unos 63 kDa en las fracciones 19 a 24, lo que era coherente con el PM esperado del producto del gen *hpa*. Las fracciones activas eluidas a partir de la heparina-Sefarosa se mezclaron, se concentraron y se aplicaron sobre una columna de filtración en gel Superdex 75 FPLC. Se analizaron alícuotas de cada fracción para la actividad de la heparanasa y el perfil proteico. Se encontró una correlación entre la aparición de una proteína principal de unos 63 kDa en las fracciones 4 a 7 y la actividad de heparanasa. Esta proteína no estaba presente en el medio condicionado por células Sf21 no infectadas control y sujeto al mismo protocolo de purificación.

La investigación sobre la participación de heparanasa/HS en la metástasis de células tumorales y en la angiogénesis se ha visto adolecida por la falta de instrumentos biológicos (es decir, sondas moleculares, anticuerpos) para explorar un posible papel causante de la heparanasa en la enfermedad. La Patente estadounidense núm. 5.968.822 ofrece por primera vez una buena oportunidad para dilucidar la participación de la enzima en la metástasis tumoral y la angiogénesis y en las aplicaciones diagnósticas relacionadas.

Con los ejemplos descritos más adelante como base se puede afirmar que las sondas de DNAC y RNA, los cebadores de PCR y los anticuerpos antiheparanasa (sondas moleculares específicas de heparanasa) se pueden aplicar en la detección del gen y la proteína de la heparanasa y, por lo tanto, en el diagnóstico precoz de micrometástasis, lesiones autoinmunitarias, insuficiencia renal y lesiones ateroscleróticas utilizando muestras de biopsias, muestras plasmáticas y líquidos corporales.

Especificidad y ventajas sobre otros anticuerpos presentados: Se ha demostrado que varias células tumorales y sanguíneas y ciertas células normales producen cantidades importantes de actividad de heparanasa. La purificación hasta la homogeneidad y la caracterización de las heparanasas de mamífero han sido difíciles, principalmente debido a la falta de un ensayo adecuado. La mayor parte de los informes solo contienen una descripción parcial con información contradictoria. Oosta, *et. al.* (22) describieron la purificación de una heparanasa plaquetaria humana con una masa molecular estimada de 134 kDa que expresaba una actividad endoglucuronidasa. Hoogewert, *et. al.* (23) relataron la purificación de una heparanasa plaquetaria humana de 30 kDa que se demostró que era una endoglucosaminidasa que escinde tanto la heparina como el heparán sulfato básicamente en los disacáridos. Estos investigadores proponían que la holoenzima está formada por cuatro subunidades, cada una relacionada estrechamente con las quimiocinas CXC CTAPIII, NAP-2 y β -tromboglobulina (23). Freeman y Parish (24) han purificado hasta la homogeneidad una heparanasa plaquetaria de 50 kDa que muestra actividad endoglucuronidasa. Del mismo modo la enzima heparanasa purificada de placenta humana y de línea celular de hepatoma (Patente estadounidense núm. 5.362.641) tenía una masa molecular de 48 kDa aproximadamente. Se determinó un peso molecular similar mediante análisis de filtración en gel de enzimas de heparanasa parcialmente purificadas, aisladas de plaquetas humanas, neutrófilos humanos y células de melanoma B16 de ratón (nuestros datos no publicados). Por el contrario, la heparanasa purificada de células de melanoma B16 por Nakajima, *et. Al.* (9, 26) presentaba un peso molecular de 96 kDa. Esta última enzima se ha localizado inmunológicamente en la superficie celular y el citoplasma de lesiones de melanoma humano utilizando un antisuero policlonal (26), y en gránulos terciarios de neutrófilos utilizando anticuerpos monoclonales (26a), ambos dirigidos contra una secuencia amino terminal putativa de heparanasa de células de melanoma B16F10 (26). Sin embargo, se encontró que la secuencia amino terminal de la heparanasa de melanoma era característica de una proteína regulada por glucosa de 94 kDa (GRP94/endoplasmína) que funciona como un chaperón molecular que carece de actividad heparanasa (27). Este resultado y un estudio reciente con un anticuerpo antiendoplasmína (28) sugieren que la proteína de 98 kDa similar a endoplasmína encontrada en preparados de heparanasa de melanoma purificada es un contaminante (27, 28). Esto último pone en cuestión los estudios anteriores sobre la inmunolocalización de la heparanasa llevados a cabo utilizando el antisuero peptídico amino terminal de heparanasa de melanoma B16 (26). Del mismo modo, se aplicó un antisuero dirigido contra la secuencia amino terminal de CTAP III para inmunolocalizar la enzima heparanasa en muestras de biopsia de carcinomas de mama y próstata humanos (29 y 30). De nuevo, la validez

de los resultados es cuestionable ya que no se excluyó la posibilidad de que CTAP III fuera un contaminante de la preparación plaquetaria. Para empezar, los intentos de expresar la proteína CTAPIII/NAP2 activa de heparanasa no tuvieron éxito y las quimiocinas CTAP-III/NAP-2 recombinantes no llegaron a mostrar la actividad de la heparanasa. En segundo lugar, el análisis por transferencia *Western blot* de la enzima plaquetaria purificada por Freeman y Parish (24) con anticuerpos anti β -tromboglobulina humana o antifactor 4 plaquetario humano demostraron que estas y otras proteínas relacionadas (p. ej., CTAP-III y NAP-2) no estaban presentes en las preparaciones de heparanasa plaquetaria (24). Además, mientras la actividad de la heparanasa puede detectarse en preparaciones purificadas de β -tromboglobulina, probablemente sea debido a una contaminación con la "clásica" heparanasa plaquetaria ya que mostraba más una actividad endo-beta-D-glucuronidasa que una actividad endoglucosaminidasa (23), tal como describió Hoogerwerf *et al.*, manuscrito pendiente de publicación).

Los estudios realizados por los autores sobre inmunolocalización de CTAP-III en muestras de biopsias humanas mostraron una localización preferente de CTAP-III en células (es decir, células endoteliales vasculares y queratinocitos) que no expresaron actividad de heparanasa y viceversa. Finalmente, ninguna de las secuencias publicadas por Hoogewerf *et al.* (CTAP-III/NAP-2 plaquetarias) (23) o por Jin *et al.* (B16 melanoma) (26), ni ninguna de las secuencias de las enzimas degradantes de heparán sulfato/heparina bacterianas (hep I & II) (30a) se encontraron en la heparanasa humana recombinante utilizada en estos estudios, que fue clonada y expresada a partir de secuencias derivadas de heparanasas de hepatoma y placenta humanas purificadas.

Hace varios años el mismo equipo preparó anticuerpos policlonales de conejo dirigidos contra una preparación propia parcialmente purificada de heparanasa placentaria humana. Más tarde se encontró que estos anticuerpos, citados en la patente estadounidense número 5.362.641, se dirigían contra el inhibidor del activador del plasminógeno de tipo I (PAI-1) que era copurificada con la heparanasa placentaria. Estos resultados originaron una modificación del protocolo de purificación original para eliminar el contaminante PAI-1.

Es evidente que, en conjunto, hasta entonces nadie había conseguido obtener anticuerpos antiheparanasa.

Contrariamente a la información arriba descrita, los anticuerpos policlonales y los monoclonales que ahora se describen se obtuvieron por primera vez contra una enzima recombinante purificada altamente activa. Como se indica más adelante, estos anticuerpos reconocen específicamente la enzima de heparanasa en lisados celulares y medios condicionados, y no presentan reactividad cruzada con la β -termoglobulina, la NAP-2, el PAI-1 o las heparinasas bacterianas I y III. Sí reconocen la heparanasa B16-F10 murina, las heparanasas plaquetarias humanas y las enzimas de heparanasa producidas por varias líneas de células tumorales humanas y por células de ovario de hámster chino (CHO). En virtud de su especificidad y de su producción contra una enzima recombinante purificada, estos anticuerpos parecen altamente apropiados como métodos de diagnóstico como una inmunohistoquímica de muestras de biopsia o una ELISA cuantitativa de fluidos corporales (p. ej. plasma, orina, efusiones pleurales, etc.). De manera similar, tal como se presenta más adelante en la sección de Ejemplos, tanto las sondas moleculares para la determinación *in situ* de la distribución histórica del gen *hpa*, como los cebadores de DNAC para la detección del RNAm de *hpa* en células normales y malignas de origen humano (p. ej. Células de leucemia y linfoma, células de melanoma) se pueden aplicar por primera vez en el diagnóstico de episodios iniciales de progresión tumoral, extensión metastásica y respuesta al tratamiento.

Resumen de la invención

De acuerdo con una realización de la invención abajo descrita se proporciona un método de detección *in situ* de la localización y distribución de la expresión de la heparanasa en una muestra biológica. Este método presenta un paso que consiste en hacer reaccionar la muestra biológica con una sonda molecular detectable específica de heparanasa y detectar la localización y distribución de la sonda molecular detectable específica de heparanasa.

De acuerdo con otras características de las realizaciones preferidas de la invención descritas más adelante, se proporciona un método de detección de expresión de heparanasa en una muestra biológica que contiene un paso que consiste en hacer reaccionar la muestra biológica con una sonda molecular detectable específica de heparanasa y detectar dicha sonda molecular detectable específica de heparanasa. Se conciben las aplicaciones en transferencia en mancha (dot-blot) de proteínas y ácidos nucleicos.

De acuerdo con aún otras características de las realizaciones preferidas descritas la muestra biológica es seleccionada a partir de un grupo formado por células y tejidos.

De acuerdo con aún otras características de las realizaciones preferidas descritas la muestra biológica es maligna.

De acuerdo con aún otras características de las realizaciones preferidas descritas, el cáncer/tumor maligno es seleccionado a partir de un grupo formado por un tumor sólido y un tumor hematopoyético.

De acuerdo con aún otras características de las realizaciones preferidas descritas, el tumor sólido es seleccionado a partir de un grupo formado por carcinoma, adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas, teratocarcinoma, mesoteloma y melanoma, y donde además el tumor hematopoyético es seleccionado a partir del grupo formado por linfoma y leucemia.

ES 2 267 266 T3

De acuerdo con aún otras características de las realizaciones preferidas descritas el tumor sólido es un tumor primario, o una metástasis del mismo, y está originado a partir de un órgano seleccionado del grupo formado por hígado, próstata, vejiga, mama, ovario, cérvix, colon, piel, intestino, estómago, útero y páncreas.

5 De acuerdo con aún otras características de las realizaciones preferidas descritas, la sonda molecular detectable específica de heparanasa es seleccionada a partir de un grupo formado por una secuencia de ácido nucleico con capacidad de hibridación con ácido nucleico que codifica la heparanasa y por un anticuerpo antiheparanasa capaz de unirse específicamente a la heparanasa.

10 De acuerdo con aún otras características de las realizaciones preferidas descritas la secuencia de ácido nucleico con capacidad de hibridación con ácido nucleico que codifica heparanasa es seleccionada a partir de un grupo formado por un oligonucleótido sintético, un RNA antisentido de heparanasa y un DNA de heparanasa marcado con una fracción detectable.

15 De acuerdo con otras características de las realizaciones de la invención preferidas abajo descritas, se proporciona un método *in vitro* de detección de proteína de heparanasa en un fluido corporal de un paciente con los siguientes pasos: reacción del fluido corporal con un anticuerpo antiheparanasa y seguimiento de la reacción, donde el fluido corporal es seleccionado a partir de un grupo formado por plasma, orina, efusiones pleurales y saliva.

20 De acuerdo con aún otras características de las realizaciones preferidas descritas el fluido corporal proviene de un paciente que padece un trastorno seleccionado del grupo formado por cáncer, insuficiencia renal y diabetes.

De acuerdo con aún otras características de las realizaciones preferidas descritas, la insuficiencia renal está asociada con la diabetes.

25 De acuerdo con aún otras características de las realizaciones preferidas descritas, el anticuerpo antiheparanasa es seleccionado del grupo formado por un anticuerpo monoclonal y un anticuerpo policlonal.

30 De acuerdo con aún otras características de las realizaciones preferidas descritas la reacción del fluido corporal con el anticuerpo antiheparanasa se lleva a cabo en una solución.

De acuerdo con aún otras características de las realizaciones preferidas descritas la reacción del fluido corporal con el anticuerpo antiheparanasa se lleva a cabo sobre un sustrato capaz de absorber las proteínas presentes en el fluido corporal.

35 De acuerdo con aún otras características de las realizaciones preferidas descritas el fluido corporal proviene de un paciente que padece mieloma, carcinoma de mama, carcinoma de mama metastásico, nefritis hemorrágica, síndrome nefrótico, diabetes tipo I con normoalbuminuria, diabetes tipo I con microalbuminuria, insuficiencia renal, inflamación, sepsis y enfermedad inflamatoria y autoinmunitaria.

40 De acuerdo con otras características de las realizaciones de la invención preferidas abajo descritas, se proporciona un método de detección de presencia, ausencia o nivel de proteína heparanasa en una muestra biológica que comprende los siguientes pasos: (a) extracción de proteínas de la muestra biológica para obtener una gran variedad de proteínas; (b) separación de las proteínas por tamaño; (c) interacción de las proteínas separadas por tamaño con un anticuerpo antiheparanasa y (d) detección de la presencia, ausencia o nivel del anticuerpo antiheparanasa que ha interaccionado.

De acuerdo con aún otras características de las realizaciones preferidas descritas, el anticuerpo antiheparanasa es seleccionado del grupo formado por un anticuerpo policlonal y un anticuerpo monoclonal.

50 De acuerdo con aún otras características de las realizaciones preferidas descritas la separación por tamaño se realiza mediante electroforesis.

De acuerdo con otras características de las realizaciones de la invención preferidas abajo descritas, se proporciona un método de administración dirigida de fármacos a un tejido que exprese heparanasa de un paciente. El método 55 consiste en los pasos siguientes: producir un complejo de un fármaco ligado directa o indirectamente a un anticuerpo antiheparanasa y administrar el complejo al paciente.

El uso de una sonda molecular específica de heparanasa en la detección de la presencia, ausencia o nivel de la expresión de heparanasa es un objeto de la presente invención.

60 El uso de una sonda molecular específica de heparanasa en la producción de un agente para el tratamiento de un trastorno asociado a la expresión de heparanasa es otro objeto de la presente invención.

65 El uso de una sonda molecular específica de heparanasa en la cuantificación de heparanasa en un fluido corporal es otro objeto más de la presente invención.

El uso de una sonda molecular específica de heparanasa en la producción de un agente para la administración dirigida de fármacos es aún otro objeto más de la presente invención.

El uso de una sonda molecular específica de heparanasa en la producción de un agente terapéutico es otro objeto de la presente invención.

- La presente invención afronta las limitaciones de las configuraciones actualmente conocidas proporcionando diversas sondas moleculares específicas de heparanasa que pueden utilizarse en aplicaciones médicas y de investigación, incluyendo los diagnósticos y los tratamientos.

Breve descripción de las imágenes

- La invención aquí descrita, solamente a modo de ejemplo, en referencia a las imágenes adjuntas, donde:

La Fig.1 muestra la expresión del gen de la heparanasa humana en líneas celulares de carcinoma de mama humanas con diferentes potenciales metastásicos. El RNA total fue aislado y sometido a RT-PCR cuantitativa (28 ciclos) utilizando cebadores de heparanasa humana (hep) y cebadores para el gen de mantenimiento de GAPDH. Las reacciones en ausencia de transcriptasa inversa demostraron que no había amplificación de contaminación por DNA genómico en las muestras de RNA (no mostrado). Carril 1, células MCF-7 no metastásicas; carril 2, células MDA-231 moderadamente metastásicas; carril 3, células MDA-435 altamente agresivas; carril 4, células ZR-75 mínimamente metastásicas; carril 5, células MCF-ANeoT moderadamente metastásicas; carril 6, células MCF-T₆ 3B altamente metastásicas y carril 7, marcador VI de peso molecular de DNA (Boehringer Mannheim).

Las Fig. 2a y 2b ilustran la actividad heparanasa expresada en líneas celulares de carcinoma de mama humanas con diferentes potenciales metastásicos. Se incubaron lisados celulares de carcinoma de mama de las líneas celulares antes descritas (24 horas, 37°C, pH 6,2) con ³⁵S-HSPG aislado de MEC subendotelial intacta. La conversión facilitada por la heparanasa del sustrato de heparán sulfato (pico I) en fragmentos de degradación de bajo PM (pico II) se analizó mediante filtración en gel sobre Sefarosa 6B. La expresión del gen *hpa* humano está correlacionada con la actividad de heparanasa y la metástasis en animales experimentales.

Las Fig. 3a a 3f ilustran la detección de RNAm de *hpa* mediante hibridación *in situ* en muestras de tejido mamario humano normal y maligno con una sonda de RNA de heparanasa antisentido: carcinoma de mama invasivo, tejido mamario fibroquístico premaligno, adenocarcinoma de mama, carcinoma de mama invasivo rodeando el área de necrosis tumoral (no teñido), mamoplastia de reducción de tejido mamario normal (sonda de *hpa* antisentido) y mamoplastia de reducción de tejido mamario normal (sonda de control de sensibilidad), respectivamente.

La Fig. 4 ilustra la actividad de heparanasa expresada en líneas celulares de carcinoma prostático humanas; expresión del gen *hpa* humano en células prostáticas humanas normales y malignas. El RNA total fue aislado y sometido a RT-PCR utilizando los cebadores de *hpa* humano apropiados (hep) y cebadores para el gen de mantenimiento de GAPDH. Las reacciones en ausencia de transcriptasa inversa demostraron que no había amplificación de contaminación por DNA genómico en las muestras de RNA (no mostrado). Carril 1, células de carcinoma prostático humano DU145 metastásicas; carril 2, células de carcinoma prostático humano PC3 metastásicas; carril 3, tejido prostático humano normal (muestra de biopsia) y, carril 4, marcador VI de peso molecular de DNA (Boehringer Mannheim).

La Fig. 5 ilustra la expresión del gen *hpa* en líneas celulares escasa o altamente metastásicas de carcinoma de vejiga humana y de linfoma T murino. El RNA total fue aislado y sometido a RT-PCR utilizando cebadores de *hpa* humanos. Carril 1, células de carcinoma de vejiga humano MBT2 no metastásicas; carril 2, variante T50 altamente metastásica de células MBT2; carril 3, células de linfoma T murino Eb no metastásicas; carril 4, variante Esb altamente metastásica de las células de linfoma T murino Eb y, carril 5, marcador VI de peso molecular de DNA (Boehringer Mannheim). -RT: control negativo, sin transcriptasa inversa; P: cebadores no amplificados.

Las Fig. 6a a 6c ilustran la actividad de heparanasa expresada en células de carcinoma de vejiga humana escasa y altamente metastásicas. Medios condicionados por las células de carcinoma de vejiga humana escasa (MBT2) y altamente (T50) metastásicas que fueron incubadas (24 horas, 37°C, pH 6,2) con ³⁵S-HSPG aislado a partir de la MEC subendotelial intacta. La conversión facilitada por heparanasa del sustrato de heparán sulfato (pico I, ss 47) en fragmentos de degradación de bajo PM (pico II) se analizó mediante filtración en gel sobre Sefarosa 6B. La expresión del gen *hpa* humano está correlacionada con la actividad de heparanasa y la metástasis en animales experimentales.

La Fig. 7 ilustra la expresión del gen *hpa* en líneas celulares de melanoma murino B16 escasa y altamente metastásicas. El RNA total fue aislado y sometido a RT-PCR utilizando cebadores de *hpa* (hep) y cebadores para el gen de mantenimiento de GAPDH. Las reacciones en ausencia de transcriptasa inversa demostraron que no había amplificación de contaminación por DNA genómico en las muestras de RNA. Carril 1, células de melanoma murino B16-F10 altamente metastásicas; carril 2, células de melanoma murino B16-F1 escasamente metastásicas; carril 3, marcador VI de peso molecular de DNA (Boehringer Mannheim).

La Fig. 8a ilustra la expresión del gen *hpa* en muestras de biopsia provenientes de tumores de melanoma humano maligno y de tejido de nevus benigno no maligno que fueron procesados para cultivo celular. El RNA total fue aislado de cultivos subconfluentes y sometido a RT-PCR utilizando cebadores de *hpa* específicos humanos (hep). Se muestran los casos representativos. Las reacciones en ausencia de transcriptasa inversa demostraron que no había amplificación de contaminación por DNA genómico en las muestras de RNA. Carril 1, melanoma maligno; carril 2, tejido de nevus no maligno; carril 3, plásmido *hpa*-pcDNA (control positivo); carril 4, control negativo (sin RNA) y, carril 5, marcador

VI de peso molecular de DNA (Boehringer Mannheim). Las reacciones en ausencia de transcriptasa inversa (-RT) demostraron que no había amplificación de contaminación por DNA genómico en las muestras de RNA.

La Fig. 8b ilustra la actividad de la heparanasa expresada en células cultivadas derivadas de melanoma maligno (paciente M-24) y tejido de nevus no maligno (paciente M-23). Las células cultivadas se sembraron sobre la MEC marcada con sulfato. Los fragmentos de degradación marcados liberados al medio de incubación se sometieron a filtración en gel sobre Sefarosa 6B.

Las Fig. 9a a 9f ilustran la detección de RNAm de *hpa* mediante hibridación *in situ* en muestras de melanoma maligno y nevus normal humanos. Las figuras 9a, c y d corresponden a melanoma humano metastásico (tres pacientes diferentes) y la figura 9b al tejido de nevus no maligno. El marcaje no se ve en el tejido de nevus comparado con la tinción intensa del melanoma metastásico. Las figuras 9e y 9f corresponden a las mismas secciones de las figuras c y d teñidas con hematoxilina-eosina.

Las Fig. 10a a 10f ilustran la detección del RNAm de *hpa* mediante hibridación *in situ* en muestras de hígado humano normal y maligno. Se muestran respectivamente carcinoma hepatocelular (x 200), carcinoma hepatocelular (x 1000), adenocarcinoma hepático, hígado adulto normal, hígado embrionario y tinción de control de sensibilidad de hígado embrionario. No se ve el marcaje en los hepatocitos normales comparados con la intensa tinción de los hepatocitos malignos y los embrionarios.

Las Fig. 11a a 11f ilustran la detección de RNAm de *hpa* mediante hibridación *in situ* en muestras de tejidos humanos normales y malignos. Se muestran respectivamente adenocarcinoma del ovario, ovario normal, carcinoma de células escamosas en cérvix, cérvix normal, adenocarcinoma de colon y intestino delgado normal.

Las Fig. 12a a 12f ilustran la detección de RNAm de *hpa* mediante hibridación *in situ* en muestras de diversos tumores humanos. La tinción positiva del gen *hpa* se vio claramente en las figuras 12a a 12e que corresponden a adenocarcinoma del estómago, teratocarcinoma, adenocarcinoma endométrico bien diferenciado, adenocarcinoma del páncreas, mesotelioma y intestino delgado normal, respectivamente.

Las Fig. 13a y 13b ilustran la expresión de heparanasa en leucemias y linfomas humanos. Se aislaron leucocitos periféricos de pacientes con varios tipos de leucemia y linfoma y se analizó la posible expresión del gen *hpa* humano en dichas células. Con este fin el RNA total fue aislado y sometido a RT-PCR utilizando cebadores de *hpa* específicos humanos. Las reacciones en ausencia de transcriptasa inversa demostraron que no había amplificación de contaminación por DNA genómico en las muestras de RNA. Se aislaron leucocitos periféricos de pacientes diferentes con leucemia linfocítica crónica (Figura 13a, carriles 1 a 5) y se analizó la posible expresión del gen *hpa* humano en dichas células. Figura 13a: carril 6, plásmido *hpa*-pcDNA (control positivo); carril 7, control negativo (sin transcriptasa inversa); carril 8, marcador VI de peso molecular de DNA (Boehringer Mannheim). En la Figura 13b se muestran pacientes representativos con varios tipos de leucemia y linfoma: carril 1, leucemia mielocítica aguda; carril 2, leucemia linfocítica crónica (células B atípicas); carril 3, leucemia mielocítica aguda (M5); carril 4, leucemia de células pilosas; carril 5, linfoma no Hodgkin (células B maduras); carril 7, leucemia linfocítica crónica (estadio I); carril 8, leucemia mielocítica aguda (M2); carril 9, leucemia mielocítica crónica; carril 10, leucemia linfocítica crónica (estadio II), carril 11, leucemia linfocítica aguda; carril 12, leucemia linfocítica crónica (estadio III); carril 13, leucemia mielocítica aguda (M1); carril 14, leucemia mielocítica aguda (M3); carril 15, plásmido *hpa*-pcDNA (control positivo); carril 16, control negativo (sin transcriptasa inversa) y, carril 17, marcador VI de peso molecular de DNA (Boehringer Mannheim).

La Fig. 14 ilustra la no expresión del gen *hpa* en leucocitos de cordón umbilical humano normales. El RNA total fue aislado y sometido a RT-PCR utilizando cebadores de *hpa* (hep) y cebadores para el gen de mantenimiento de GAPDH. Las reacciones en ausencia de transcriptasa inversa demostraron que no había amplificación de contaminación por DNA genómico en las muestras de RNA. Carriles 1 a 9, preparaciones de leucocitos provenientes de seis cordones umbilicales diferentes; carril 7, plásmido *hpa*-pcDNA (control positivo); carril 8, control negativo (sin transcriptasa inversa) y, carril 9, marcador VI de peso molecular de DNA (Boehringer Mannheim).

La Fig. 15 ilustra la expresión del gen *hpa* en líneas celulares de leucemia y linfoma. El RNA total fue aislado y sometido a RT-PCR utilizando cebadores de *hpa* (hep) y cebadores para el gen de mantenimiento de GAPDH. Las reacciones en ausencia de transcriptasa inversa demostraron que no había amplificación de contaminación por DNA genómico en las muestras de RNA. Carriles 1, línea celular linfoblastoide B normal (Monga); carril 2, Linfoma B de Burkitt (Raji); carril 3, linfoblastos B Burkitt (Daudi); carril 4, linfoblastos B Burkitt (no Ebv, DG-75); carril 5, eritroleucemia (K-562); carril 6, pre-linfoma B (nalm₆) y, M = marcador VI de peso molecular de DNA (Boehringer Mannheim).

Las Fig. 16a a 16h ilustran la actividad de heparanasa urinaria. Se incubaron (24 horas, 37°C, pH 6,2) con ³⁵S-HSPG (50 μl) y se aislaron a partir de la MEC subendotelial intacta (♦) las muestras de orina (○) de un donante sano (16d) y de pacientes con los siguientes trastornos: mieloma múltiple (16a), carcinoma de mama bilateral (16b), carcinoma de mama metastásico (16c), nefritis hemorrágica (16e), síndrome nefrótico (16f) y diabetes de tipo I con normoalbuminuria (16g) y con microalbuminuria (16h). La conversión facilitada por heparanasa del sustrato de heparán sulfato (pico I) en fragmentos de degradación de bajo peso molecular (pico II) se analizó mediante filtración en gel sobre Sefarosa 6B.

Las Fig. 17a y 17b ilustran las transferencias Western (Western blots) de extractos de células que expresan varios segmentos de heparanasa igual que son detectados con anticuerpos policlonales antiheparanasa. La figura 17a corresponde a antisuero de conejo 7640 y la figura 17b a antisuero de conejo 7644. Carril 1, células BL21(DE3)pLysS de *E. coli* transfectadas con pRSET; carril 2, células BL21(DE3)pLysS de *E. coli* transfectadas con pRSET que contienen el marco de lectura abierto completo de la heparanasa (543 aminoácidos, Id. Sec. Núms. 2 y 3), carril 3, células BL21 (DE3)pLysS de *E. coli* transfectadas con pRSET α hpaBK que contienen 414 aminoácidos del marco de lectura abierto completo de la heparanasa (aminoácidos 130-543 de Id. Sec. Núms. 2 y 3); carril 4, células BL21(DE3)pLysS de *E. coli* transfectadas con pRSET α hpaBK que contienen 302 aminoácidos del marco de lectura abierto completo de la heparanasa (aminoácidos 130-141 de ID SEC Núms. 2 y 3); carril 5, marcadores de tamaño molecular; carril 6, medio de células de insecto Sf21 infectadas con Baculovirus pFhpa recombinante que contienen el marco de lectura abierto completo de la heparanasa (543 aminoácidos, ID SEC Núms. 2 y 3) y, carril 7, células de insecto Sf21 infectadas con Baculovirus recombinante sin inserto. Se separaron las proteínas sobre SDS/PAGE al 10%, los antisueros se diluyeron 1:1.000. La detección se llevó a cabo mediante ECL (Amersham) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A la derecha se muestra el tamaño en kDa, determinado mediante estándares SDS/PAGE preteñidos, Bio-Rad, CA.

La Fig. 18 ilustra una transferencia Western (Western blot) utilizando anticuerpos de afinidad policlonales purificados con heparanasa expresada en varios sistemas de expresión. Carril 1, medio de células de insecto Sf2d1 infectadas con Baculovirus pFhpa recombinante; carril 2, extracto celular de un clon de ovario de hámster chino (CHO) transfectado de forma estable con un vector que no contiene ningún inserto; carril 3, extracto celular de un clon estable de CHO transfectado con DNAC de *hpa* y, carril 4, proteínas precipitadas del medio de la levadura *Pichia pastoris* transfectada con DNAC de *hpa*. Se separaron las proteínas sobre SDS/PAGE en gradiente al 4-20%, el anticuerpo se diluyó 1:100. La detección se llevó a cabo mediante ECL (Amersham) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para los clones de CHO y de *Pichia* véase la Patente Estadounidense Núm. 6.348.344. A la derecha se muestra el tamaño en kDa, determinado mediante estándares SDS/PAGE preteñidos, Bio-Rad, CA.

Las Fig. 19a y 19b ilustran una transferencia Western (Western blot) de extractos de diversos tipos celulares utilizando anticuerpos policlonales antiheparanasa. La figura 19a corresponde a antisuero en bruto diluido 1:2.000 y la figura 19b corresponde a anticuerpos de afinidad purificados diluidos 1:100. Carril 1, heparanasa purificada de placenta; carriles 2 y 3, extractos celulares de plaquetas, fracciones insolubles y solubles, respectivamente; carriles 4 y 5, extractos celulares de neutrófilos, fracciones insolubles y solubles, respectivamente; carriles 6 y 7, extractos celulares de células B16-F1 de melanoma murino, fracciones insolubles y solubles, respectivamente. La detección se llevó a cabo mediante ECL (Amersham) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A la derecha se muestra el tamaño en kDa, determinado mediante estándares SDS/PAGE preteñidos, Bio-Rad, CA.

La Fig. 20 ilustra una transferencia Western (Western blot) de heparanasa recombinantes y nativas de diverso origen utilizando un sobrenadante de hibridoma HP-117. Carriles 1 y 2, 293 células de riñón humano no transfectadas y transfectadas con *hpa*-DNAC, respectivamente (15 μ g); carril 3, células CHO transfectadas estables con pShpa (40 μ g); carril 4, células CHO con trasfección falsa (40 μ g); carril 5, heparanasa recombinante purificada producida por células de insecto infectadas con Baculovirus (50 ng); carril 6, extractos celulares de *E. coli* que expresan heparanasa recombinante (50 ng); carril 7, extracto celular de plaquetas humanas (100 μ g) y, carril 8, estándar SDS/PAGE preteñido, Bio-Rad, CA. Se separaron las proteínas sobre SDS/PAGE en gradiente al 4-20% y se transfirieron a una membrana de nylon (Amersham). La membrana fue incubada con sobrenadante de hibridoma Hp117 y la detección se llevó a cabo con anticuerpos antiIgG murina conjugados con fosfatasa alcalina.

Las Fig. 21a y 21b ilustran la inmunotinción de heparanasa en células CHO con anticuerpos policlonales. Las células CHO transfectadas con el *gen hpa* completo (21a) fueron analizadas en busca de sobreexpresión de heparanasa. La tinción se detecta en el citoplasma de las células transfectadas. En las células CHO no transfectadas (21b) no se detecta tinción de heparanasa.

Las Fig. 22a y 22b ilustran la inmunotinción de heparanasa en células CHO con el anticuerpo monoclonal HP-130. Las células CHO transfectadas con el *gen hpa* completo (22a) fueron analizadas en busca de sobreexpresión de heparanasa. La tinción se detecta en el citoplasma de las células transfectadas. En las células CHO no transfectadas (22b) no se detecta tinción de la heparanasa.

Las Fig. 23a a 23c ilustran la inmunotinción de la heparanasa en el frotis sanguíneo de donante normal con anticuerpo monoclonal HP-92. Se encuentra heparanasa en el citoplasma de neutrófilos (23a) y plaquetas (23c) pero no se detecta en linfocitos (23b) y monocitos (23c).

La Fig. 24 ilustra una curva estándar típica de la heparanasa humana recombinante. La curva estándar se construyó trazando el log de la concentración de heparanasa en el eje x frente al log de la absorbancia en el eje y.

La Fig. 25 ilustra el mapeo de epítomos de los anticuerpos monoclonales HP.117 y HP-239. Los diferentes polipéptidos, como se indica más adelante, se fraccionaron sobre SDS-PAGE y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Schleicher and Schull). Se hizo reaccionar a la membrana con el anticuerpo HP-117 o con el HP-239 como arriba se indica. Carril 1: extractos celulares que contienen un segmento de heparanasa de 414 aminoácidos del marco de lectura abierto de la heparanasa (aminoácidos 130-543). Carril 2: extractos celulares que contienen un segmento de heparanasa de 314 aminoácidos del marco de lectura abierto de la heparanasa (aminoácidos 230-543). Carril 3: extractos celulares que contienen un segmento de heparanasa de 176 aminoácidos del marco de lectura abierto de

la heparanasa (aminoácidos 368-543). Carril 4: extractos celulares que contienen un segmento de heparanasa de 79 aminoácidos del marco de lectura abierto de la heparanasa (aminoácidos 465-543). Carril 5: extractos celulares que contienen un segmento de heparanasa de 229 aminoácidos del marco de lectura abierto de la heparanasa (aminoácidos 1-229). Carril 6: extractos celulares que contienen un segmento de heparanasa de 347 aminoácidos del marco de lectura abierto de la heparanasa (aminoácidos 1-347). Carril 7: extractos celulares que contienen un segmento de heparanasa de 465 aminoácidos del marco de lectura abierto de la heparanasa (aminoácidos 1-465). Carril 8, marcadores de tamaño (Bio-Rad).

Las Fig. 26a a 26d ilustran la tinción inmunohistoquímica preferencial de la heparanasa en un pólipo colonial y en adenocarcinoma de colon humano primario y metastásico. Muestras tisulares incluidos en parafina derivados de: (a) epitelio de colon extraído de una región normal localizada lejos de la lesión neoplásica; (b) adenoma tubulovelloso; (c) adenocarcinoma de colon humano primario y (d) carcinoma de colon con metastásis en el hígado, se sometieron a inmunotinción con el anticuerpo antiheparanasa monoclonal HP-92.

15 Descripción de las realizaciones preferidas

La presente especificación describe sondas moleculares específicas de heparanasa que pueden utilizarse en aplicaciones médicas y de investigación. Concretamente, la presente invención se puede utilizar para la detección y seguimiento de cánceres, metástasis y otros trastornos no malignos, eficiencia de tratamientos terapéuticos, administración dirigida de fármacos y tratamiento dirigido, utilizando sondas moleculares específicas de heparanasa como son los anticuerpos antiheparanasa (tanto poli como monoclonales) y los ácidos nucleicos derivados del gen de la heparanasa (hpa), incluyendo, entre otros, cebadores de PCR, sondas oligonucleotídicas antisentido, sondas de RNA antisentido, sondas de DNA y similares.

Los principios y el manejo de la presente invención se comprenderán mejor en referencia a las imágenes y las descripciones adjuntas.

Antes de explicar al menos una de las realizaciones de la invención en detalle, hay que dejar claro que la aplicación de la invención no se limita a los detalles de construcción y disposición de los componentes expuestos en la siguiente descripción o ilustrados en las imágenes. La invención es capaz de otras realizaciones o de ser llevada a cabo de diversas maneras. También hay que entender que el propósito de la fraseología y terminología aquí empleadas es descriptivo y no se debe considerar como una limitación.

Tal como se muestra en la sección de Ejemplos más adelante los anticuerpos específicos de heparanasa y/o ácidos nucleicos revelan la expresión *in situ* (proteína y/o RNA mensajero) de la heparanasa en una variedad de células y tejidos, especialmente en células y tejidos malignos, donde el grado de expresión se corrobora con la metástasis.

Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto de la presente invención se proporciona un método de detección *in situ* de la localización y distribución de la expresión de la heparanasa en una muestra biológica. Este método presenta el paso que consiste en hacer reaccionar la muestra biológica con una sonda molecular detectable específica de heparanasa y detectar la localización y distribución de la sonda molecular detectable específica de heparanasa.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona un método de detección de expresión de heparanasa en una muestra biológica. El método contiene un paso que consiste en hacer reaccionar la muestra biológica con una sonda molecular detectable específica de heparanasa y detectar dicha sonda molecular detectable específica de heparanasa. Se prevén las aplicaciones en transferencia en mancha (dot-blot) de proteínas y ácidos nucleicos.

Tal como se utiliza aquí en la especificación y en la siguiente sección de reivindicaciones, el término “expresión de heparanasa” hace referencia principalmente al proceso de transcripción y traducción que dan lugar a una heparanasa catalíticamente activa con actividad hidrolizante endoglicosidasa que es específica para sustratos proteoglicanos de heparina o heparán sulfato, opuesta a la actividad de enzimas bacterianas (heparinasa I, II y III) que degradan la heparina o el heparán sulfato mediante β -eliminación.

Tal como se utiliza aquí en la especificación y en la siguiente sección de reivindicaciones, el término “muestra biológica” hace referencia a células y tejidos, incluyendo, entre otras, células y tejidos malignos. El término también está relacionado con fluidos corporales, como se detalla más adelante.

Tal como se utiliza aquí en la especificación y en la siguiente sección de reivindicaciones, tanto el término “sonda molecular específica de heparanasa detectable” como su término equivalente “sonda molecular de heparanasa detectable” hacen referencia a una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridar con ácido nucleico que codifica heparanasa o a un anticuerpo antiheparanasa capaz de unirse específicamente a la heparanasa. La secuencia de ácido nucleico capaz de hibridar con ácido nucleico que codifica la heparanasa es, por ejemplo, un oligonucleótido sintético, un RNA de heparanasa antisentido o un DNA de heparanasa antisentido y estará preferiblemente marcada con la fracción detectable.

Tal como se utiliza aquí en la especificación y en la siguiente sección de reivindicaciones, el término “fracción detectable” hace referencia a cualquier átomo, molécula o una porción de la misma, la presencia, ausencia o nivel de la cual es monitorizable directa o indirectamente. Un ejemplo incluye isótopos radiactivos. Otros ejemplos incluyen

(i) enzimas que pueden catalizar reacciones que emiten color o luz y (ii) fluoróforos. La detección de la fracción detectable puede ser directa a no ser que la misma fracción sea detectable por sí misma como, por ejemplo, en el caso de los fluoróforos. Alternativamente, la detección de la fracción detectable puede ser indirecta. En este último caso, se emplea preferiblemente una segunda fracción capaz de reaccionar con la fracción detectable, siendo ella misma directamente detectable. La fracción detectable puede ser inherente a la sonda molecular. Por ejemplo, la región constante de un anticuerpo puede servir como fracción detectable indirecta a la que se puede unir específicamente un segundo anticuerpo con una fracción detectable directa.

Tal como se utiliza aquí en la especificación y en la siguiente sección de reivindicaciones, el término “anticuerpo” hace referencia a cualquier inmunoglobulina monoclonal o policlonal, o a un fragmento de una inmunoglobulina como sFv (proteína de unión a antígeno de cadena única), Fab1 o Fab2. La inmunoglobulina puede también ser un anticuerpo humanizado en el que las regiones variables murinas están fusionadas con regiones constantes humanas, o en el que las regiones determinantes de complementariedad murinas están insertadas sobre una estructura de anticuerpo humana (Wilder, R.B. *et al.*, J. Clin. Oncol., 14:1383-1400, 1996). De manera diferente a lo que sucede con los anticuerpos de ratón o de conejo, los anticuerpos humanizados no suelen experimentar una reacción no deseada con el sistema inmunitario del sujeto. Los términos “sfv” y “proteína de unión a antígeno de cadena única” hacen referencia a un tipo de un fragmento de una inmunoglobulina, un ejemplo de la cual es sFv CC49 (Larson, S.M. *et al.*, Cancer, 80:2458-68, 1997).

De acuerdo con la realización de la invención la muestra biológica es maligna, por ejemplo, es una muestra de tumor sólido o de tumor hematopoyético. El tumor sólido puede por ejemplo ser de los siguientes tipos: carcinoma, adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas, teratocarcinoma, mesotelioma o melanoma; que se muestran aquí más adelante en la sección de Ejemplos para expresar heparanasa en buena correlación con el grado de metástasis. El tumor hematopoyético puede ser, por ejemplo, linfoma o leucemia.

En algunas realizaciones de la presente invención el tumor sólido es un tumor primario, o una metástasis del mismo, y se origina a partir de un órgano como, por ejemplo, hígado, próstata, vejiga, mama, ovario, cérvix, colon, piel, intestino, estómago, útero (embrión incluido) y páncreas.

Tal como se muestra en la sección de Ejemplos más adelante, también se encontró que los fluidos corporales (p. ej. orina) de pacientes con determinados trastornos contienen heparanasa catalíticamente activa. Estos trastornos son: mieloma, carcinoma de mama, carcinoma de mama metastásico, nefritis hemorrágica, síndrome nefrótico, diabetes tipo I con normoalbuminuria, diabetes tipo I con microalbuminuria, insuficiencia renal, inflamación, sepsis y enfermedad inflamatoria y autoinmunitaria.

Por tanto, de acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona un método de detección de proteína heparanasa en un fluido corporal de un paciente. El método comprende los siguientes pasos: reacción del fluido corporal con un anticuerpo antiheparanasa, tanto poli como monoclonal, y seguimiento de la reacción. El fluido corporal puede ser plasma, orina, efusiones pleurales o saliva. El seguimiento de la reacción se puede llevar a cabo con un marcaje del anticuerpo con una fracción detectable, o utilizando su región constante como una fracción detectable inherente a la que se puede unir específicamente un segundo anticuerpo que contiene una fracción detectable.

La heparanasa en orina se detectó en pacientes que padecían trastornos como cáncer, insuficiencia renal o diabetes. En algunos casos la insuficiencia renal estaba asociada a diabetes.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención la reacción del fluido corporal con el anticuerpo antiheparanasa se lleva a cabo en una solución. Alternativamente, la reacción del fluido corporal con el anticuerpo antiheparanasa se lleva a cabo en un sustrato capaz de adsorber proteínas presentes en el fluido. Ambos sistemas son ampliamente conocidos en el campo del diagnóstico basado en anticuerpos.

La RT-PCR, como se muestra más adelante en la sección de Ejemplos, ha resultado ser de utilidad en la detección de la presencia, ausencia o nivel de transcritos de heparanasa en distintas muestras biológicas.

Por tanto, de acuerdo con otro aspecto de la presente invención se proporciona un método de detección de la presencia, ausencia o nivel de transcritos de heparanasa en una muestra biológica. El método comprende los siguientes pasos: En primer lugar, el RNA mensajero (p. ej. como un componente del RNA total) se extrae de la muestra biológica de manera que se obtiene una gran cantidad de RNA mensajeros. En segundo lugar, el total de RNA mensajeros es sometido a transcripción inversa dando lugar a una diversidad de DNA complementarios. Tercero, el total de DNA complementarios se ponen en contacto con un par de cebadores de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) específicos de heparanasa, nucleósidos trifosfato y una DNA polimerasa termoestable (p. ej. DNA polimerasa de *Thermophilus aquaticus*, nativo o recombinante) y se realiza una reacción en cadena de la polimerasa mediante un ciclado de temperaturas, tal como se conoce en el campo. Finalmente, la presencia, ausencia o nivel de producto de la reacción en cadena de la polimerasa se detecta mediante, por ejemplo, electroforesis en gel, seguimiento de la incorporación de una fracción detectable en el producto o cualquier otro método aplicable, tal como se conoce en el campo.

Las transferencias (blots) de proteínas y los anticuerpos antiheparanasa, como se muestra más adelante en la sección de Ejemplos, han resultado ser de utilidad en la detección de la presencia, ausencia o nivel de proteína heparanasa en distintas muestras biológicas.

Por tanto, de acuerdo con la presente invención también se proporciona un método de detección de la presencia, ausencia o nivel de proteína heparanasa en una muestra biológica. El método comprende los siguientes pasos: en primer lugar, las proteínas son extraídas de la muestra biológica para obtener un gran cantidad de proteínas. El extracto proteico puede ser un extracto crudo y puede contener también material no proteináceo. En segundo lugar, las proteínas se separan por tamaño, por ejemplo, mediante electroforesis, filtración en gel, etc. En tercer lugar, estas proteínas separadas por tamaño se hacen interaccionar con un anticuerpo antiheparanasa, tanto poli como monoclonal. Finalmente, se detecta la presencia, ausencia o nivel del anticuerpo antiheparanasa interaccionado. En el caso de una electroforesis en gel la interacción con el anticuerpo se realiza de forma característica después de la transferencia de las proteínas separadas en un soporte sólido (membrana).

Se demostró en muchos casos que la unión, directa o indirecta (p. ej. a través de liposomas), de un fármaco (p. ej. un fármaco anticanceroso como son los radioisótopos) con un anticuerpo que reconozca una proteína expresada específicamente en un tejido sensible al fármaco, y la administración del complejo anticuerpo-fármaco a un paciente, da lugar a una administración dirigida del fármaco al tejido de expresión.

Por tanto, de acuerdo con aún otro aspecto de la presente invención se proporciona un método de administración dirigida de fármacos a un tejido de un paciente, siendo un tejido que expresa heparanasa. El método comprende los siguientes pasos: proporcionar un complejo de un fármaco unido directa o indirectamente a un anticuerpo antiheparanasa y administrar dicho complejo al paciente. También se concibe un método de radioimagen donde el fármaco es sustituido por un radioisótopo detectable. También se contemplan las técnicas de imagen por endoscopia y laparoscopia. En estos últimos casos el fármaco es sustituido de forma característica por una sustancia fluorescente o luminiscente. Estos procedimientos pueden ser efectivos, por ejemplo, en la detección y destrucción de micrometástasis.

En otros casos se demostró que la administración de un anticuerpo capaz de unirse a epítomos asociados a ciertos tejidos proporciona medios para destruir dichos tejidos mediante una respuesta inmunitaria provocada.

Además, la especificación describe un anticuerpo obtenido por una proteína heparanasa (p. ej. recombinante), o una porción inmunogénica de la misma, anticuerpo que se une específicamente a heparanasa. El anticuerpo puede ser poli o monoclonal. Si es policlonal y se ha producido *in vivo* es preferible que sea purificado por afinidad, sin embargo, también se pueden aplicar preparaciones de anticuerpo bruto. Todo ello de la manera que se muestra y describe con más detalle en la sección de Ejemplos a continuación.

La obtención del anticuerpo es, preferiblemente, mediante técnicas *in vivo* o *in vitro*, donde el anticuerpo debe haber sido preparado según un proceso que comprende tres pasos. Primero, exponer células capaces de producir anticuerpos a la proteína heparanasa, o a la parte inmunogénica de la misma, y así generar células productoras de anticuerpos. Después, fusionar las células productoras de anticuerpos con células de mieloma y así generar una diversidad de células de hibridoma productoras de anticuerpos monoclonales. Por último, analizar detalladamente la diversidad de anticuerpos monoclonales para identificar uno capaz que se una específicamente a heparanasa.

De acuerdo con la presente invención también se proporciona un oligonucleótido que contiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridar específicamente con ácido nucleico que codifica heparanasa, sea DNA o RNA de heparanasa. El oligonucleótido puede contener nucleótidos naturales y/o análogos de nucleótido como análogos fosforotioatos u otros. Estos oligonucleótidos se sintetizan rápidamente siempre y cuando se conozca la secuencia. Se pueden deducir, por ejemplo a partir del ID SEC Núm. 3.

De acuerdo con la presente invención también se proporciona una molécula de ácido nucleico antisentido (RNA o DNA) que contiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridar específicamente con el RNA mensajero de heparanasa y una molécula de ácido nucleico codificante (RNA o DNA) que contiene una secuencia de ácido nucleico capaz de hibridar específicamente con el RNA antisentido de heparanasa.

Ejemplos

Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos que, junto con las descripciones anteriores, ilustran la invención sin limitarla.

Materiales y métodos experimentales

Células: Los cultivos de células endoteliales corneales bovinas (BCEC) se establecieron a partir de ojos de buey tal y como se ha descrito anteriormente (19, 31). Los cultivos de cepas se mantuvieron en DMEM (1 gramo de glucosa/litro) suplementado con un 10% de suero de ternero recién nacido y un 5% de suero de ternero fetal (FCS). Se añadió FGFb (1 ng/ml) cada día durante la fase del crecimiento celular activo (14, 15). Las células de hibridoma se cultivaron en frascos T-175 (Corning Costar, Cat. Núm. 430824) dentro de una incubadora enriquecida con CO₂ (8%) a 37°C. El medio DMEM (Beit Haernek, Israel) se añadió con un 10% de suero de caballo (Beit-Haernek Cat. Núm. 04-124-1A). El volumen del cultivo era de 80 ml.

Preparación de los sustratos de sulfato marcados: Las BCEC (segundo a quinto pase) se pusieron en placas de cultivo tisulares de 35 mm a una densidad inicial de 2×10^5 células/ml y se cultivaron en DMEM suplementado con un 10% de FCS y un 5% de dextrano T-40 durante 12 días. Se añadió Na₂³⁵SO₄ (25 µCi/ml) el día 1 y 5 después del

sembrado y los cultivos se incubaron con la marca sin cambio del medio. La MEC subendotelial se expuso mediante la disolución (5 minutos a temperatura ambiente) de la capa celular con PBS formado por un 0,5% de Triton X-100 y NH_4OH 20 mM, seguido de 4 lavados con PBS. La MEC permaneció intacta, libre de detrito celular y firmemente unida al la zona entera de la placa de cultivo tisular (14, 15, 20).

Para preparar proteoglicanos marcados de sulfato solubles (material de pico I), la MEC se digirió con tripsina (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 6 horas, 37°C), la digestión se concentró mediante diálisis inversa, se aplicó sobre una columna de filtración de gel Sefarosa 6B y se recogió (32) el material de peso molecular elevado ($K_{av} < 0,2$, pico I). Más del 80% del material marcado se demostró que estaba compuesto por proteoglicanos de heparán sulfato (11).

Actividad de la heparanasa: Las células ($1 \times 10^6/35\text{-mm}$ plato), los lisados celulares o el medio preparado se incubaron en la parte superior de las MEC marcadas por ^{35}S (18 horas, 37°C) en presencia de fosfato 20 mM o tampón de citrato de fosfato (pH 6,2). Los lisados celulares y los medios preparados también se incubaron con material de pico I marcado de sulfato (10-20 ml). Se recogió el medio de incubación, se centrifugó (18.000 g, 4°C , 3 min.); y el material marcado de sulfato se analizó mediante la filtración de gel en una columna de Sefarosa CL-6B (0,9 x 30 cm). Las fracciones (0,2 ml) se eluyeron con PBS a una tasa de flujo de 5 ml/h y se contaron para la radioactividad utilizando el fluido de centelleo Bio-flúor. El volumen descartado (V_0) se marcó con dextrano azul y el volumen total incluido (V_t) con fenol rojo. Se demostró que el último comigraba con sulfato libre (11, 20). Los fragmentos de degradación de las cadenas laterales de HS se eluyeron a partir de la Sefarosa 6B a $0,5 < K_{av} < 0,8$, (pico II) (11, 20). Un HSPG casi intacto liberado de la MEC mediante tripsina se eluyó al lado del V_0 ($K_{av} < 0,2$, pico I). Las recuperaciones del material marcado aplicadas a las columnas en el intervalo entre 85 a 95% de diferentes experimentos.

Construcción del vector de expresión de la heparanasa: Un fragmento *Bam*HI-*Kpn*I 1,3 kb (nucleótidos 450-1721 de la secuencia *hpa*, Id de sec. Núm.: 1 y 3, Patente Estadounidense núm. 5.968.822 se cortó de *pfasthpa* y se clonó en el vector de expresión bacteriano pRSET-C (Invitrogen). El plásmido recombinante resultante pRSET*hpa*BK codifica una proteína de fusión formada por la marca His, una secuencia de unión y los aminoácidos 130-543 de la proteína de heparanasa (Id. De sec. Núm.: 2 y 3).

Un fragmento de 1,6 kb de *hpa* DNAC se amplificó a partir de *pfasthpa* (una *hpa* DNAC clonada en *pfastBac*, véase la patente Estadounidense núm. 08/922.170), mediante PCR utilizando un cebador de sentido específico: (Hpu-550*Nde*)-5'-CGCATATGCAGGACGTCGTGGACCTG-3' (Id. De sec. Núm.:4) y un cebador antisentido específico de vector: (3'pFast) 5'-TATGATCCTCTAGTACTTCTCGAC-3' (Id. De sec. Núm.: 5). El cebador superior introdujo un sitio *Nde*I y un un codón ATG precediendo al nucleótido 168 de *hpa*. El producto de PCR se digirió con *Nde*I y *Bam*HI y su secuencia se confirmó. pRSET*hpa*BK se digirió con *Nde*I y *Bam*HI y se ligó con el fragmento *Nde*I-*Bam*HI *hpa*. El plásmido resultante, nombrado pRSET*hpa*SI, codificó un marco de lectura abierto de 508 aminoácidos que se predice que sea un péptido señal. Los constructos de expresión se introdujeron en las células *E. Coli* BL21 (DEL3)pLysS (Stratagene), de acuerdo con el protocolo del suministrador.

Preparación del antígeno: Las células *E. Coli* que contenían los plásmidos recombinantes se cultivaron a 37°C durante la noche en el medio de caldo Luria con ampicilina y cloramfenicol. Las células se diluyeron 1/10 en el mismo medio y los cultivos se cultivaron hasta un OD600 de aproximadamente 0,5. Entonces se añadió isopropil-tiogalactósido (IPTG) (Promega) a una concentración final de 1 mM y el cultivo se incubó a 37°C durante 3 horas. Las células de los cultivos inducidos se enfriaron en hielo, se sedimentaron mediante centrifugación a $4,000 \times g$ durante 20 minutos a 4°C y se resuspendieron en 0,5 ml de solución salina fría tamponada con fosfato (PBS). Las células se lisaron mediante sonicación y los restos celulares se sedimentaron mediante centrifugación a $10,000 \times g$ durante 20 minutos. El sedimento se analizó con un 10% de SDS-PAGE. El gel se tiñó con 1 x PBS de azul coomassie y la banda de 45 kDa que contenía la heparanasa recombinante se recortó y se colapsó a través de una aguja (21G) pegada a una jeringuilla. Para la inmunización de los ratones, el gel colapsado se incubó en PBS durante la noche a 4°C y se recogió la proteína difusa en el tampón. Se inyectaron los conejos con el homogenado del gel.

La proteína de 55 kDa (508 aminoácidos) se purificó a partir de los cuerpos de inclusión de *E. Coli* mediante SDS-PAGE preparativo, utilizando una célula del modelo 491 Prep Cell (Bio-Rad) que está diseñada para purificar las proteínas a partir de mezclas complejas y mediante electroforesis de elución continua. Este antígeno se utilizó para el cribaje por ELISA.

Inmunización - anticuerpos policlonales: Se inmunizaron dos conejos (nombrados 7640 y 7644) cada uno con 200 μg de proteína emulsionada con el mismo volumen de adyuvante de Freund completo. Una misma cantidad de proteína emulsionada con Freund incompleto se inyectó a cada conejo 2 semanas a continuación de la primera inyección y otra vez después de otras cuatro semanas. Diez días después de la tercera inyección se sangraron los conejos y el suero se examinó para la reactividad con heparanasa recombinante. Cuatro semanas después del sangrado se inyectó otra inyección y 10 días más tarde se recogió la sangre.

Inmunización - anticuerpos monoclonales: Ratones Balb/C hembra de 6 a 8 semanas de edad se inmunizaron cada uno de forma intradérmica con 50 μg de heparanasa recombinante emulsionada en 50 μl de adyuvante de Freund completo en PBS. Dos semanas más tarde la misma cantidad de emulsión se inyectó de forma subcutánea o intradérmica en múltiples sitios del adyuvante de Freund incompleto. Después de tres semanas se inyectaron por vía intraperitoneal 25 μg de antígeno en una solución acuosa. Entre siete y diez días más tarde se sangraron los animales y se determinó el título de los anticuerpos relevantes. Tres o cuatro semanas más tarde la última inyección, se inyectaron por vía

intraperitoneal uno o dos animales con 20 μ g de antígeno soluble (en PBS) y tres o 4 días más tarde se quitaron los bazos.

Fusión y clonación: Los bazos de los ratones inmunizados se molieron, los esplenocitos se cosecharon y se fusionaron con las células de mieloma NSO añadiendo un 41% de PEG. Las células de hibridoma se cultivaron en un medio de cultivo DMEM de HAT selectivo que contenía: 15% (v/v) HS (Beit Haemek), glutamina 2 mM, solución de Pen-Estrep-Nistatina (penicilina: 10.000 unidades/ml, estreptomycin: 10 mg/ml, nistatina: 1.250 unidades/ml), a 37°C en un 8% de una atmósfera con CO₂. Las células de hibridoma se clonaron limitando la dilución. Los hibridomas que producían los anticuerpos monoclonales a la heparanasa humana se identificaron mediante reactividad con una heparanasa humana inmovilizada en fase sólida.

ELISA: Las placas de polivinilo falcon se cubrieron con 50 ng/pocillo de baculovirus derivado de heparanasa humana (nativa) y 100 ng/pocillo de heparanasa humana derivada de *E. Coli* (55 kDa - inactivo) en PBS (pH 7,2) durante la noche a 40°C. Se añadieron a los pocillos los sobrenadantes de cultivos tisulares de hibridoma y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas. Entonces se detectó la unión de los anticuerpos monoclonales mediante la incubación con IgG antiratón de cabra conjugada con HRP (específica de Fab) (Sigma), seguida por un desarrollo en el sustrato de o-fenilenodiamina (Sigma) y una medición de las absorbancias a 450 nm. El PBS con un 0,05% de Tween se utilizó para lavar las placas entre las incubaciones. La heparanasa humana anticonejo policlonal se utilizó como control positivo y el control negativo incluyó el recubrimiento con PBS o sobrenadante irrelevante.

Purificación de la afinidad de los anticuerpos policlonales: 200 mg de heparanasa recombinante se separaron en un 10% de SDS-PAGE. A continuación de la electroforesis, la proteína se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Schleicher & Scuell). La membrana se tiñó con Ponceau S y la banda se recortó. La tira de la membrana se lavó con NaCl 0,15 M durante 20 minutos y entonces con el PBS durante 20 minutos más. Los anticuerpos se eluyeron con glicina 0,2 M, EDTA 1 mM con el pH 2,8 durante 20 minutos a temperatura ambiente y entonces se neutralizaron mediante la adición de 0,1 volúmenes de Tris 1 M con el pH 8,0 y 0,1 volúmenes de 10 x PBS. Se añadió NaNO₃ a una concentración final del 0,02%.

Transferencia Western blot: Las proteínas se separaron en geles preparados de poliácridamida (Novex) en un gradiente del 4 al 20%, o del 8 al 16%. A continuación de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nylon Hybond-P (Amersham) (350 mA/100 V durante 90 minutos). Las membranas se bloquearon en TBS con un 0,02% Tween-20 y un 5% leche desnatada durante 1 a 16 horas, y luego se incubaron con antiseros diluidos en una solución bloqueante. Luego se lavaron las transferencias (blots) en TBS-Tween, se incubaron con una IgG antiratón/anticonejo conjugada con HRP adecuada y se desarrollaron utilizando reactivos ECL (Amersham) según las instrucciones del fabricante. Alternativamente, se utilizaron anticuerpos IgG antiratón/anticonejo conjugados con fosfatasa alcalina como anticuerpos secundarios y se llevaron a cabo las transferencias con FASTTM BCIP/NBT (Sigma) según las instrucciones del proveedor.

Expresión del gen de heparanasa en diversos tejidos y tipos celulares (RT-PCR): Se aplicó una RT-PCR para evaluar la expresión del gen *hpa* en diversos tipos celulares. Con este fin, el RNA total fue sometido a transcripción inversa y amplificado utilizando los siguientes cebadores de DNAC: *hpa* humano - Hpu-355 5'-TTCGATCCCAA-GAAGGAATCAAC-3' (ID SEC NÚM. 6) y Hpl-229 - 5'GTAGTGATGCCATGTAAGTGAATC-3' (ID SEC NÚM. 7).

Patrón de expresión del transcrito del gen de heparanasa (hibridación in situ): La hibridación *in situ* facilita la determinación de la distribución de los transcritos de *hpa* en tejidos normales y malignos. Con este fin, se procesaron secciones finas de muestras de biopsia para hibridación *in situ* y se hibridaron con una sonda de RNA antisentido para el gen *hpa*. Los experimentos presentan el poder de resolución para identificar inequívocamente el tipo celular de expresión, sean células tumorales, macrófagos tisulares, mastocitos o plaquetas. Se trataron secciones con proteinasa K para exponer el RNA diana y bloquear los sitios de unión no específica antes de la adición de la sonda (34). Para la hibridación *in situ* se prepararon dos sondas de marcaje con digoxigenina, una en la dirección codificante y la otra en la dirección antisentido. Se transcribieron ambas a partir de un fragmento de unas 24 pb de la secuencia del DNAC de *hpa* (nucleótidos 728-1351, ID SEC NÚM.: 1 y 3) clonado en los sitios *EcoRI-HindIII* del vector de transcripción pT3T7-Pac (un vector modificado derivado de pT3T7, Pharmacia), utilizando RNA polimerasa T3 (para la antisentido) o T7 (para la codificante), según el protocolo de los proveedores. Los portaobjetos se hibridaron bajo las condiciones apropiadas con la sonda marcada y la sonda hibridada se visualiza utilizando los reactivos colorimétricos (NBT & BCIP) (34). Las reacciones se pararon cuando se hubo alcanzado la intensidad deseada.

Detección in situ de la heparanasa mediante anticuerpos: Las células CHO transfectadas con *hpa* y las no transfectadas se pusieron en placas sobre portaobjetos de cultivos tisulares de 8 cámaras (Nunc). Las células se fijaron en un 95% de etanol y un 5% de ácido acético durante 5 minutos a 20°C. Se permeabilizaron las células utilizando un tampón de permeabilización (HEPES 20 mM, pH 7,4; sacarosa 300 mM; NaCl 50 mM; MgCl₂ 3 mM; 0,5% de Titon X-100) durante 4 minutos a 4°C. Las peroxidasas endógenas se bloquearon utilizando un 0,3% de H₂O₂ en metanol y los sitios de unión no específicos se bloquearon utilizando un 5% de suero de caballo en PBS. El anticuerpo antiheparanasa monoclonal (sobrenadante de hibridoma) se aplicó e incubó con las células durante la noche a temperatura ambiente. Dicho anticuerpo se quitó y el anticuerpo secundario biotinilado (ratón anticaballo, Vector, sistema Vectastain ABC) se añadió durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se detectó la inmunotinción utilizando diaminobenzidina y H₂O₂ (comprimidos Sigma) hasta que se consiguió la intensidad de tinción deseada. Los portaobjetos se contracoloraron

con la hematoxilina de Mayer. La inmunotinción con los anticuerpos policlonales se realizó bajo las mismas condiciones, el anticuerpo con la afinidad purificada se utilizó en una dilución 1:500. El anticuerpo de caballo biotinilado se utilizó como un anticuerpo secundario (Vector, sistema Vectastain ABC). Los frotis sanguíneos se prepararon de un donante sano y la fijación y la tinción se realizaron tal y como se ha descrito arriba.

Producción de anticuerpos mediante el método de inanición (39): Los cultivos que alcanzaron la densidad celular de 2×10^6 células/ml o superior se utilizaron para la producción de los anticuerpos. Las células se quitaron de los frascos con la pipeta y se centrifugaron a 1.000 rpm durante 5 minutos para sedimentar las células. Los sedimentos celulares se suspendieron en DMEM basal (sin añadir suero) y se centrifugaron a 1.000 rpm durante 5 minutos. Este procedimiento se repitió una vez más y los sedimentos celulares resultantes se suspendieron en el volumen original del medio DMEM basal igual que antes de la centrifugación. La suspensión celular se plaquearon en nuevos frascos T-175 y se situaron dentro de la incubadora. Tras 48 h, se sedimentaron las células mediante centrifugación a 3.500 rpm durante 10 minutos. Los sobrenadantes de cultivo se filtraron a través de un filtro con el tamaño de poro de 0,2 micras (Nalgene, Cat. Núm. 156-4020) y se añadió con azida sódica al 0,05% de concentración final. Los sobrenadantes de cultivo se mantuvieron refrigerados hasta la purificación.

Adaptación de los hibridomas al medio libre de suero: Las células de hibridoma se sembraron a 3×10^5 células/ml en duplicados en una placa de agrupación en un medio libre de suero. El suero se añadió a los pocillos a una concentración final del 5%, 1,25%, 0,63%, 0,31% y 0%. Cada tres días de cultivo, la viabilidad de las células se determinó en los pocillos. Los pocillos que tenían más del 80% de células viables fuera de la población celular total (tal y como se determinó mediante la tinción Trypan Blue) se utilizaron para continuar el proceso de adaptación. Estas células se cambiaron al medio libre de suero que contenía la mitad del porcentaje del suero igual que antes. Después de tres días más el proceso de evaluación de la puntuación de viabilidad de las células y la alimentación con los medios frescos se repitió hasta la eliminación completa del suero a partir de las células. Las células se consideraron adaptadas si tenían más de un 80% de la población celular viable después de como mínimo tres días de cultivo sin suero. Este procedimiento se adaptó de "Los anticuerpos monoclonales" de J. H. Perets *et al.* Springer Publisher.

Purificación de anticuerpos monoclonales: La purificación se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad utilizando Proteína G (39, 40). Se utilizaron 2,5 ml de Proteína G Sefarosa 4 (Fast Flow)(Farmacia Núm.de Cat. 17-0618-01) para maximizar cada columna (Bio Rad, Núm.de Cat.737-1517). El flujo para el empaquetamiento de las columnas fue de 4 ml/min. La columna se equilibró con 100 ml de PBS, pH 7,2. Se cargaron los sobrenadantes (filtrados y suplementados con azida sódica, como se ha descrito anteriormente) en la columna a un flujo de 1 ml/min. La columna, después de ser cargada, se lavó con 80 ml de PBS, pH 7,2, a un flujo de 4 ml/min. La elución se realizó con 12 ml de un tampón de glicina-HCl 0,1 M, pH 2,7, a un flujo de 1 ml/min. Se recogieron fracciones de un ml en tubos que contenían 0,3 ml de Tris 1 M, pH 9,0. Se lavó de nuevo la columna después de la elución con 50 ml del tampón de elución a un flujo de 4 ml/min. Entonces se regeneró la columna pasando 50 ml de tampón regenerador (tampón de glicina-HCl 0,1 M, pH 2,5). Una vez regenerada, se neutralizó inmediatamente con 100 ml de PBS, pH 7,2. Se añadió azida sódica al 0,1% y se guardó la columna en la nevera.

Se analizó el contenido en proteínas de las fracciones eluidas mediante el método de determinación de proteínas Bradford. De acuerdo con los resultados obtenidos, de 4 a 6 fracciones fueron mezcladas y dializadas tres veces (tubos de diálisis Spectrum, MWCO 6.000-8.000, Núm. Cat. 132653) frente a 500 ml de tampón PBS, pH 7,2, con azida sódica al 0,05%, o frente a PBS, pH 7,2, con timerosal al 1% (Sigma, Núm. Cat. T-8784) añadido. Tras la diálisis las muestras se conservaron a 4°C.

Marcaje de HP239 con biotina: Se dializó un anticuerpo que contenía solución PBS a 1,9 mg/ml frente a NaCO₃ 0,1 M (Sigma, Núm. Cat. S-5761), pH 8,3-8,5, dos veces, durante cuatro horas cada vez, a 4°C. Los tubos de diálisis eran de Spectrum (Spectra/Por, MWCO 6.000-8.000). El marcaje del anticuerpo con biotina se realizó añadiendo éster de N-hidroxisuccinimida-biotina amido caproato (Sigma Núm. Cat. B2643) disuelto en DMSO (Merck Núm. Cat. 2950) a la solución de anticuerpo. Se añadieron 80 µl de la solución de éster de N-hidroxisuccinimida-biotina amido caproato a 1 ml de la solución de anticuerpo. La mezcla se agitó inmediatamente en un vórtex, se cubrió con hoja de aluminio para evitar la exposición a la luz y se dejó a temperatura ambiente durante cuatro horas para que tuviera lugar el marcaje. Una vez completado el periodo de marcaje, la solución de anticuerpo se dializó dos veces frente a PBS añadido con azida sódica al 0,05% y se conservó en la nevera.

Ensayo HABA: El ensayo HABA se realizó en anticuerpo biotinilado con el fin de determinar la proporción molar entre las moléculas de biotina y de anticuerpo. El resultado de este ensayo es la proporción B/P que indica el grado de marcaje del anticuerpo. Con este fin se disolvió 1 mg de Avidina (Sigma, Núm. Cat. A-9275) en tampón fosfato 50 mM con NaCl 0,15 M, pH 6,0. Se disolvieron 2,42 mg de ácido 2-(4'-hidroxiazobenceno) benzoico (HABA) (Pierce, Núm. Cat. 28010) en 1 ml de solución de NaOH 10 mM. Se disolvieron 0,5 mg de d-Biotina en 1 ml de tampón fosfato 50 mM con NaCl 0,15 M, pH 6,0. La solución de Biotina se diluyó de 0,5 mg/ml a 0,05 mg/ml en tampón fosfato 50 mM con NaCl 0,15 M, pH 6,0. Se trazó la curva estándar para la Biotina añadiendo 25 µl de solución HABA a 0,5 ml de solución de Avidina y transfiriéndola a cubetas de cuarzo. La DO se determinó a 500, luego se añadieron a la cubeta 5 µl del anticuerpo conjugado y se volvió a determinar la DO a 500 nm. Este proceso se repitió hasta que DO500 descendió hasta el valor obtenido con 1 µg de biotina por muestra en la curva estándar. Además de la curva estándar también se trazó la curva del conjugado y se calculó la cantidad de biotina unida.

Mapeo de epítomos: Un fragmento de 1,7 kb de DNAC de *hpa* (un DNAC de *hpa* clonado en pfastBacHTA, véase la Patente estadounidense Núm. 5.968.822) fue digerido por diversas enzimas de restricción para crear delecciones seriadas en los dos extremos 3' y 5' del marco de lectura abierto (ORF) de la heparanasa de la siguiente manera:

5 (i) delecciones 3': fragmento *EcoRI-BstEII* que codifica los aminoácidos del 1 al 465, delección de un fragmento *NdeI-XbaI* para generar un ORF de 347 aminoácidos (1-347) y una delección del fragmento *AflIII-XbaI* para generar un ORF de 229 aminoácidos (1-229).

10 (ii) delecciones 5': fragmento *BamHI-XhoI* que codifica 414 aminoácidos (130-543), un fragmento *AflIII-XhoI* que codifica 314 aminoácidos (230-543), un fragmento *NdeI-XhoI* que codifica 176 aminoácidos (368-543) y un fragmento *BstEII-XhoI* que codifica 79 aminoácidos del marco de lectura abierto de la heparanasa (465-543).

15 Los segmentos de heparanasa fueron expresados en un sistema de expresión de Baculovirus, básicamente como se describe en la Patente Estadounidense Núm. 6.348.344. Se subclonaron los fragmentos en el vector *pfastBacHT* para generar constructos de fusión identificados con His. Se generaron baculovirus recombinantes que contenían los diversos fragmentos mediante el sistema "Bac to Bac" (GibcoBRL) según las recomendaciones del fabricante. Se analizaron extractos de células Sf21 que expresaban varios segmentos de la proteína de heparanasa. Los segmentos de heparanasa recombinantes fueron detectados mediante transferencias Western (Western blots).

20 *Análisis de subtipos:* El análisis de subtipos de sobrenadantes de cultivos celulares de hibridoma se llevó a cabo utilizando el equipo de isotipificación de anticuerpos monoclonales de inmunotipo de ratón de Sigma y el equipo de isotipificación de anticuerpos monoclonales de ratón Isostrip de Boehringer Mannheim, según las instrucciones del fabricante.

25 *Principio del ELISA tipo sándwich:* el reconocimiento preciso de heparanasa se realiza con dos anticuerpos monoclonales (HP-117 y HP-239) obtenidos tras la inmunización de ratones con proteína de heparanasa. El ELISA de heparanasa p60 está basada en el método sándwich de doble anticuerpo. Se prepararon dos anticuerpos monoclonales contra sitios estéricamente remotos de la molécula de heparanasa: el primero, (HP-117) recubierto en la fase sólida del ELISA; el segundo (HP-239), biotinilado, se utiliza como un anticuerpo detectable (trazador). Las moléculas de heparanasa presentes en los estándares o en las muestras a ensayo quedan atrapadas entre los dos anticuerpos a modo de "sándwich". El exceso de trazador no unido se elimina fácilmente durante el paso de lavado y el ELISA solo retiene la combinación anticuerpo/antígeno/trazador absorbida. La cantidad de color generado es directamente proporcional a la cantidad de heparanasa presente en el estándar o en las muestras. La heparanasa recombinante utilizada como estándar fue producida en baculovirus y purificada del modo que se describe en la solicitud de Patente estadounidense 09/260.038.

35 El ELISA de heparanasa p60 contiene pocillos microtituladas prereducidos en una solución de recubrimiento (tampón de carbonato/bicarbonato 0,05 M pH 9,6) con anticuerpo monoclonal (HP-117) antiheparanasa y bloqueado con solución bloqueante (PBS-1%, BSA-0,05% y Tween-20) para evitar la unión no específica. Se añadió a cada pocillo de ensayo un volumen medido de muestra o de estándar de heparanasa diluido en diluyente de muestra (PBS-1%, BSA-0,05% y Tween-20-0,1% SDS) y se incubaron para permitir la unión de cualquier heparanasa presente a anticuerpos en la placa microtitulada. Los pocillos se lavaron con solución de lavado (PBS-0,05%, Tween-20) y se añadió un anticuerpo biotinilado antiheparanasa que se unía a la heparanasa capturada durante la incubación. Tras el lavado se añadió un reactivo de neutravidina conjugado con peroxidasa, que se unía a la biotina del inmunocomplejo en la placa durante la incubación. Seguidamente, se lavaron los pocillos y se les añadió una solución sustrato (tetra-metilbencidina-TMB) que produjo un color azul en presencia de peroxidasa. Se paro la reacción de color mediante la adición de ácido (ácido sulfúrico 2 M) que cambia el color azul a amarillo. La intensidad del amarillo es proporcional a la cantidad de heparanasa presente en las muestras o estándares. Se midió la absorbancia de cada pocillo a 450 nm en referencia a 630 nm. Se generó una curva estándar representando el log de la absorbancia respecto al log de la concentración del estándar de heparanasa (Figura 24). Se determinó la concentración de heparanasa del espécimen desconocido comparando la densidad óptica del espécimen con la curva estándar. El estándar utilizado en este ensayo es heparanasa humana recombinante calibrada frente a BSA en gel de poli(acrilamida) SDS.

Resultados del experimento

55 Expresión diferencial del gen *hpa* en el carcinoma de mama humano y las líneas celulares de carcinoma de mama: La RT-PCR semicuantitativo se aplicó para evaluar la expresión del gen *hpa* por parte de las líneas celulares de carcinoma de mama humano que muestran diferentes grados de metástasis (35, 36). Mientras que la línea de carcinoma de mama MCF7 no metastásico no expresó los 585 pb de DNAC del gen *hpa* (Figura 1, carril 1), las líneas celulares de carcinoma de mama moderadas (MDA 231, Figura 1, carril 2) y muy metastásicas mostraron un aumento marcado en la expresión del gen *hpa*. La expresión diferencial del gen *hpa* se reflejó con un patrón diferencial similar de la actividad de la heparanasa. Tal y como muestra la figura 2a, los lisados de las células MCF-7 mostraron poca o ninguna actividad de la heparanasa comparada a la actividad moderada y alta expresada por las células MDA-231 y MDA-435, que se caracterizan por la posesión de un potencial metastásico moderado y alto en los ratones desnudos, respectivamente.

El mismo patrón de la expresión del gen *hpa* y de la actividad de degradación del heparán sulfato se observó en otro modelo de cáncer de mama. Mientras que la línea celular de mama displásica ZR75 (=MCF10A) a partir de las

células epiteliales de mama fibroquísticas mostraron poca o ninguna expresión del gen *hpa* (Figura 1, carril 4), la línea celular ZR75 transfectada (MCF10AT y MCF10AT3B) expresó el gen *hpa* (carriles 5 y 6) en correlación con su potencial metastásico. Las células altamente metastásicas MCF10AT3B se obtuvieron a partir de una tercera generación de tumores xenoinjertados (36). La actividad de la heparanasa expresada por las líneas celulares era correlativa a su comportamiento metastásico (Figura 2b).

En los siguientes experimentos, se utilizaron sondas de RNA marcadas con dioxigenina sentido y antisentido (fragmento de 600 pb del DNAC *hpa*) para detectar el tejido de mama humano incrustado en archivales con parafina para la expresión de las transcripciones del gen *hpa* mediante la hibridación *in situ*.

Tal y como se muestra en las figuras de la 3a a la 3f, se observó la expresión masiva de gen *hpa* en el carcinoma de mama invasivo (3a) y en el adenocarcinoma de mama (3c). El gen *hpa* ya había sido expresado por las células epiteliales diferenciadas de mama fibroquística premaligna (3b) y en el tejido de carcinoma de mama que rodeaba la zona de la necrosis tumoral donde apenas se observó tinción (3d). A diferencia del tejido maligno, el tejido de mama normal falló en la expresión de la transcripción de *hpa* tal y como desveló la falta de tinción en el tejido derivado de la mamoplastia de reducción, tanto con las sondas antisentido (3e) y sentido (3f) de *hpa*.

En conjunto, estos resultados muestran una expresión preferencial de las células de carcinoma de mama malignas del gen *hpa*, indicando una posible aplicación en el diagnóstico temprano de la enfermedad, en concreto en vista de la tinción positiva ya detectada en el estadio fibroquístico.

Carcinomas de vejiga y próstata humanos: El análisis de RT-PCR de varias líneas celulares de carcinoma de próstata y de vejiga humanos también sugirieron la expresión diferencial del RNAm del *hpa*. Tal y como muestra la Figura 4, ambas líneas celulares de próstata DU145 (carril 1) y PC3 (carril 2) mostraron una elevada expresión del RNAm del *hpa* a diferencia de la carencia, o no detectable, de expresión en una biopsia de tejido de próstata normal de adulto (carril 3). De una forma parecida, tal y como se demuestra en la figura 5, la variante altamente metastásica (T50) de la línea celular de carcinoma de vejiga humana MBT2 no metastásica mostró una expresión mucho más elevada del gen de *hpa* (carril 2) en comparación con la línea celular MBT2 (carril 1). La diferencia también se reflejó mediante una actividad de heparanasa elevada ocultada en el medio de cultivo de las células T50 agresivas, en comparación con la actividad no detectable en el medio de las células MBT2 parentales (Figuras 6a a 6c). Una vez más, la expresión diferencial observada del gen *hpa* y la actividad enzimática apuntan hacia una posible aplicación en el diagnóstico de los carcinomas metastásicos de próstata y vejigas humanas.

Melanoma de ratón y linfoma T: La expresión diferencial del RNAm del *hpa* y la actividad de degradación de heparán sulfato, en correlación con el potencial metastásico en los ratones también se demostró en los estudios con melanoma B16 y linfoma T de ratón. De hecho, los sistemas celulares de melanoma (9, 37) y de linfoma (11) fueron los primeros sistemas experimentales que apuntaron hacia un papel importante de la heparanasa en la invasión de las células tumorales y la metástasis. La clonación de la presente invención del DNAC de *hpa*, que codifica la enzima de heparanasa, proporciona, por primera vez, la evidencia de que la diferencia en la actividad de la heparanasa es debida en primer lugar a una expresión preferencial del gen *hpa* mediante las células tumorales altamente metastásicas. Por lo tanto, tal y como muestran las Figuras 5 y 7, las líneas celulares del linfoma Esb altamente metastásico (Figura 5, carril 4) y del melanoma B16-F10 (Figura 7, carril 1), expresaron el gen *hpa* hasta una extensión mucho más elevada en comparación con las células parentales poco metastásicas del linfoma Eb (Figura 5, carril 3) y del melanoma B16-F1 (Figura 7, carril 2). Los respectivos niveles bajos y elevados de la actividad de la heparanasa mediante estas líneas celulares ya se comentaron en estudios anteriores (9, 11, 37).

Melanoma humano: La expresión preferencial del gen *hpa* y la actividad enzimática también se observó en las células obtenidas a partir de las biopsias de melanoma humano y de tejido nervioso normal. Las muestras de biopsia de melanoma maligno habitualmente se procesan para el cultivo celular en el departamento de oncología (Hadassah Hospital, Jerusalem) con propósitos de inmunotratamiento. Las células cultivadas obtenidas a partir de 16 de 16 pacientes (véase también la Tabla 1, abajo) expresaron el gen *hpa*, tal y como desveló la RT-PCR (Figura 8a, carril 1, un paciente representativo). Las células de melanoma obtenidas de 3 de estos pacientes se analizaron para la degradación de los proteoglicanos de heparán sulfato solubles y se observó que eran altamente activos (Figura 8b). A diferencia de esto, las células obtenidas a partir de un tejido de nervio no maligno no mostraron ni una expresión detectable del RNAm del *hpa* (Figura 8a, carril 2) ni actividad enzimática (Figura 8b).

Se obtuvieron resultados similares utilizando las muestras de biopsia incrustadas en archivales de parafina y la hibridación *in situ*. Una vez más, el marcaje citoplasmático del RNAm del *hpa* se observó en las secciones tisulares de las muestras metastásicas obtenidas a partir de 3 pacientes distintos con melanoma maligno (Figuras 9a y 9c a 9d), pero no a partir de un nervio no maligno (Figura 9b). En conjunto, estos resultados implican un posible uso de los cebadores específicos del *hpa*, las sondas de ácido nucleico y los anticuerpos en el diagnóstico temprano de la metástasis del melanoma.

Carcinoma de hígado humano: La enzima de heparanasa primero se purificó en el laboratorio a partir de una línea celular de hepatoma humano (Sk-Hep-1). De hecho, las secuencias de aminoácidos obtenidas de la heparanasa de hepatoma purificado se utilizaron para clonar el gen *hpa*. Los estudios de hibridación *in situ* revelaron una expresión intensa del gen *hpa* en las secciones tisulares obtenidas del carcinoma hepatocelular humano (Figuras 10a a 10b) y del adenocarcinoma de hígado (Figura 10c). El tejido de hígado normal adulto no expresó el RNAm del *hpa* (Figura 10d).

Sin embargo, sí se expresó en el hígado humano embrionario (Figura 10e). Cada uno de estos ejemplos claramente apoya el uso de las sondas moleculares específicas de heparanasa como herramientas para el diagnóstico temprano del cáncer humano y su propagación y respuesta a los tratamientos contra el cáncer.

5 *Otros tumores humanos:* Una expresión preferencial del gen *hpa* se observó claramente mediante la hibridación *in situ* realizada con las muestras de biopsias de varios carcinomas humanos diferentes en comparación con sus homólogos de tejidos normales. Tal y como muestran las figuras de la 11a a la 11f, se observó una expresión intensa del gen *hpa* en las secciones tisulares obtenidas a partir del adenocarcinoma de los ovarios (Figura 11a), el carcinoma de células escamosas del cérvix (Figura 11c) y el adenocarcinoma de colon (Figura 11e). A diferencia de esto, hubo
10 poca o ninguna expresión del RNAm del *hpa* en las secciones tisulares humanas obtenidas a partir de ovarios normales (Figura 11b), cérvix (Figura 11d) e intestino delgado (Figura 11f). Las pocas células teñidas en las muestras tisulares normales fueron macrófagos y neutrófilos de infiltración solos.

15 La tinción positiva del gen *hpa* también se vio claramente en el adenocarcinoma del estómago (Figura 12a), el teratocarcinoma (Figura 12b), el adenocarcinoma endometrial bien diferenciado (Figura 12c), el adenocarcinoma del páncreas (Figura 12d) y el mesotelioma (Figura 12e). Cada uno de estos ejemplos apoya claramente el uso de las sondas moleculares específicas de heparanasa como herramientas para el diagnóstico temprano del cáncer humano y su propagación y respuesta a los tratamientos contra el cáncer.

20 *Leucemia y linfoma humano:* Anteriormente se han aplicado mediciones de consumo de tiempo de la actividad de la heparanasa y se demostró que las células leucémicas mieloides humanas crónicas y agudas (AML y CML), a diferencia de las células leucémicas linfocíticas crónicas (CLL), expresan y secretan fácilmente la heparanasa. La capacidad de los cebadores específicos de heparanasa facilita que las células de linfoma y leucemia humanas determinen más rápida y sensitivamente la expresión del gen *hpa*. Para este propósito, los leucocitos (obtenidos a partir de pacientes
25 con leucemia y linfoma) se purificaron en el Ficoll-hypack y se sometieron a un aislamiento total de RNA y a la determinación por RT-PCR del RNAm del *hpa*. En total, se analizaron las células de 69 pacientes. Los pacientes representativos aparecen en las figuras de la 13a a la 13 b y los resultados están resumidos en la Tabla 1 de abajo. Las células de 31 de los 31 pacientes con CLL mostraron una expresión indetectable del gen *hpa* (Figura 13a, carriles 1 a la 5, Figura 13b, carriles 2, 7, 10 y 12) a pesar del estado de la enfermedad. Se obtuvieron resultados similares con
30 las células de 4 de los 4 pacientes con linfoma no-Hodgkin (NHL)(Figura 13b, carriles 5 y 6). Ambas células, as CLL y las NHL representan las células B principalmente diferenciadas. Al contrario, el RNAm del *hpa* lo expresaron las células obtenidas de 14 de los 14 pacientes con AML (Figura 13b, carril 11). Estas células representan los mieloblastos no diferenciados de los neutrófilos y monocitos de origen. El RNAm del *hpa* se expresó en las células de 1 de los 3 pacientes con CML, y en 2 de los 2 pacientes con leucemia linfocítica aguda. Sorprendentemente, los leucocitos
35 obtenidos de la sangre del cordón umbilical mostraron poca (un caso) o ninguna expresión (13 casos más) del gen *hpa* en las muestras de sangre de cordón diferenciadas (Figura 14, Tabla 1, abajo). Estas preparaciones de sangre de cordón se enriquecen con células madre hematopoyéticas. Los estudios con líneas celulares establecidas (Figura 15) revelaron que no existía expresión del RNAm del *hpa* en el linfoma B de Burkitt (es decir, Raji, Daudi, DG-75, carriles 2 a 4, respectivamente), en oposición a la línea celular linfoblastoide normal B (Ebv transformado) madura (es decir,
40 monga, Figura 15, carril 1) y la eritroleucemia (K-562, carril 5).

Aparentemente, la expresión de la heparanasa puede distinguir entre el linfoma celular B diferenciado (CLL y NHL) y la leucemia linfoblastoide y mielocítica no diferenciada (AML y ALL) (Tabla 1). La falta de expresión del gen *hpa* por parte de los leucocitos de cordón umbilical facilitarían la distinción entre los leucocitos normales tempranos
45 (*hpa* negativo) y las células leucémicas tempranas (*hpa* positivo). Además, la presencia de la heparanasa distinguiría entre las células leucémicas linfáticas tempranas (*hpa* positivo) y las células de linfoma y leucemia B tardía (*hpa* negativo).

TABLA 1

50 *Expresión del RNAm de hpa (RT-PCR) en la leucemia humana, el linfoma y el melanoma*

Tipo	Núm. de pacientes	Núm. de <i>hpa</i> positivos	Núm. de <i>hpa</i> negativos
55 CLL	31	0	31
AML	14	14	0
ALL	2	2	0
CML	3	1	2
60 NHL	4	0	4
Sangre del cordón	14	1	13
Melanoma	16	16	0
Nervio (normal)	3	0	3

65 *Actividad de la heparanasa en la orina de pacientes con cáncer:* Se analizó la actividad heparanasa de muestras de orina en un intento de aclarar el grado de implicación de la heparanasa en la progresión tumoral y su importancia en

el cáncer humano. Se determinó la actividad heparanasa mediante incubación de orina con proteoglicanos de sulfato solubles marcados obtenidos de la digestión por tripsina de matriz extracelular subendotelial marcada metabólicamente con $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$. La actividad heparanasa dio como resultado la conversión de un sustrato marcado de sulfato de alto peso molecular (PM) en fragmentos de degradación de heparán sulfato de bajo PM, determinada por análisis de filtración en gel. Se detectó actividad heparanasa en la orina de 21 (carcinoma de células renales, carcinoma de mama, rabdomiosarcoma, cáncer de estómago, mieloma) de los 157 pacientes con cáncer. En las Figuras 16a a 16c se muestran tres ejemplos. En la orina de pacientes con una enfermedad agresiva (principalmente carcinoma de mama, Figuras 16b y 16c, y mieloma múltiple, Figura 16a) se determinaron niveles altos de actividad heparanasa mientras que en la orina de donantes saludables no se detectó actividad alguna (Figura 16d). Se supone que con un ELISA más sensible se detecte la proteína heparanasa en estadios iniciales de la enfermedad. La orina también puede contener inhibidores de heparanasa (es decir, GAG) por lo que un ensayo de actividad puede subestimar el número de pacientes con proteína heparanasa urinaria positiva.

Actividad heparanasa en la orina de pacientes diabéticos: La microalbuminuria y la proteinuria de la nefropatía diabética están causadas por una reducción de los proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG) de la membrana basal glomerular (MBG). Este estudio identificó actividad heparanasa en células mesangiales de rata cultivadas y postuló que la reducción de HSPG glomerular es secundaria respecto a la actividad heparanasa glomerular aumentada y que esto último se manifestará con un incremento de heparanasa urinaria. Se analizó la actividad heparanasa urinaria en muestras de 70 pacientes con diabetes tipo I y en 40 controles de sexo y edad correspondientes, como se ha descrito antes. Los resultados se resumen en la Tabla 2, a continuación. Hubo 50 pacientes normoalbuminúricos (NA) mientras que 20 presentaban microalbuminuria (MA). Se detectó actividad heparanasa urinaria en 13 de 70 (19%) pacientes diabéticos mientras que en el grupo control no se encontró ninguna ($p = 0,002$). El 16% de los pacientes con NA y el 25% de los pacientes con MA mostraron actividad heparanasa urinaria (Figuras 16g y 16h). Es interesante destacar que por encima del 80% de los pacientes que dieron positivo para la heparanasa eran mujeres. Los pacientes que dieron positivo para la heparanasa presentaban niveles de glucosa en sangre ($p = 0,0005$) y HbA1C ($p = 0,03$) significativamente más altos al compararlos con los pacientes diabéticos que dieron negativo para la heparanasa. Este es el primer estudio que sugiere un rol de la heparanasa en la patogenia de la nefropatía diabética. La heparanasa urinaria puede ser un marcador inicial de la participación renal en los pacientes con diabetes tipo I que permita adelantarse a la MA. Lo más probable es que la presencia de actividad heparanasa en la orina de pacientes con IDDM (Diabetes Mellitus Insulinodependientes) micro o normoalbuminúricos se deba a una nefropatía diabética, el trastorno más importante que causa por sí solo la insuficiencia renal en adultos.

TABLA 2

Actividad heparanasa en orina de pacientes con IDDM

	Núm. de pacientes	Edad media	Sexo	Duración de la enfermedad	Presión arterial	GFR	Positivos para heparanasa
Normo- albuminuria	50	26,2 ± 8,5 años	26 hombres 24 mujeres	16,5 ± 7,3 años	112 ± 17	134 ± 25 ml/min/1,73 m ²	8/50 (16%)
Micro- albuminuria	20	26,5 ± 11,3 años	10 hombres 10 mujeres	14,5 ± 7,9 años	115 ± 13	128 ± 26 ml/min/1,73 m ²	5/20 (25%)

La determinación repetida de la heparanasa urinaria en nueve pacientes con IDDM dio resultados similares (seis negativos y 3 positivos) al análisis inicial realizado tres meses antes. Los resultados del presente estudio sugieren que la actividad heparanasa puede desempeñar un papel en la regulación del número de sitios aniónicos de HSPG en la MBG y por tanto modular las propiedades de permeabilidad selectiva de la membrana basal glomerular.

El heparán sulfato contribuye a la unidad e integridad de la MEC al unirse a diversas moléculas de la MEC como el colágeno, la laminina, la fibronectina, la trombospodina y la tenascina. Por esta razón la escisión del heparán sulfato puede provocar la desintegración de la MEC lo que conllevaría una pérdida de sus propiedades de barrera. En este estudio se ha identificado la expresión de actividad heparanasa en células mesangiales (no mostrado). La heparanasa, una vez secretada en las células mesangiales estimuladas, degrada el heparán sulfato de la MBG lo que permite su paso al espacio urinario.

La actividad heparanasa también se detectó en la orina de pacientes proteinúricos que no padecían diabetes (Figuras 16e y f). Entre ellos había pacientes con glomeruloesclerosis focal segmentaria, síndrome nefrótico de cambio mínimo y síndrome nefrótico congénito, lo cual indicaba que la participación de la heparanasa en la generación de proteinuria quizás no se limite a la nefropatía diabética. La actividad heparanasa urinaria parece detectarse con mayor frecuencia a medida que aumenta el grado de proteinuria. Se detectó heparanasa activa en la orina del 15% de los pacientes con diabetes tipo I normoalbuminúricos y en el 25% de los microalbuminúricos. La prevalencia alcanzó el 48% en un grupo de 28 pacientes macroalbuminúricos con NIDDM.

La nefropatía diabética, que se presenta en aproximadamente el 30% de los pacientes con diabetes tipo I, es una de las causas principales de insuficiencia renal terminal. El hecho de que no se sea capaz de discriminar la subpoblación que desarrollará una lesión renal previamente a la aparición de la microalbuminuria, 10 a 15 años tras el diagnóstico de diabetes, provoca que no se pueda cambiar significativamente la historia natural de la enfermedad. La actividad heparanasa urinaria es un parámetro distintivo, que se da en el 30 al 35% de mujeres normoalbuminúricas, dentro de un grupo de pacientes por lo demás homogéneo.

Este es el primer resultado que sugiere un rol de la heparanasa en la patogenia de la proteinuria en la diabetes tipo I. Es evidente que la medición de la actividad heparanasa urinaria lleva mucho tiempo y no es suficientemente precisa. Además, en el presente estudio se ha demostrado la presencia de un inhibidor de la heparanasa de mamífero en la orina de individuos normales. Actualmente se está estudiando la naturaleza de la sustancia inhibidora que posiblemente sean glicosaminoglicanos urinarios. Por tanto, la actividad heparanasa urinaria es el resultado de un equilibrio entre la presencia de la enzima y la de su inhibidor(es) en la orina. Por esta razón, para fines diagnósticos la inmunodetección de la proteína heparanasa representa un enfoque más preciso y directo. En conjunto, los resultados del presente estudio indican que los anticuerpos antiheparanasa que identifican el antígeno de la heparanasa se pueden aplicar en el diagnóstico precoz de metástasis de cáncer o enfermedades renales. Tal como se ha expuesto anteriormente, es posible que la heparanasa traspase la barrera de filtración de la membrana basal glomerular y de la MEC simplemente gracias a su capacidad de degradar las regiones de HS responsables de sus propiedades de permeabilidad selectiva. Por lo tanto, se espera que la heparanasa urinaria refleje la presencia de heparanasa en la circulación y de este modo constituya un marcador preciso de enfermedades metastásicas, inflamatorias y renales. Es de especial importancia la capacidad potencial de seguir el curso de la progresión y extensión tumoral, la respuesta a tratamientos contra el cáncer y posibles recidivas de la enfermedad en un paciente dado. La administración dirigida de fármacos y el tratamiento farmacológico dirigido son otro aspecto del uso de estos anticuerpos.

Anticuerpos policlonales antiheparanasa: Se analizó por transferencia Western-blot la reactividad de antiseros provenientes de conejos inmunizados con diversos segmentos de heparanasa recombinante expresada en *E. coli* y con la heparanasa expresada en Baculovirus (Figuras 17a y b). En ambos casos el anticuerpo monoclonal reconoció en la heparanasa recombinante derivada de *E. coli* proteínas del tamaño esperado, unos 60 kDa para el marco de lectura abierto completo (carriles 2), unos 45 kDa para los 414 aminoácidos codificados por el fragmento de *hpa BamHI-KpnI* (carriles 3) y 35 kDa para los 302 aminoácidos codificados por un fragmento de *hpa BamHI-HindIII* (carriles 4). Se reconoció una proteína de aproximadamente 65 kDa en el medio de células de insecto Sf21 infectadas con el Baculovirus recombinante pF*hpa* (carriles 7).

La especificidad de los anticuerpos policlonales purificados por afinidad se determinó por transferencia Western-blot con heparanasa recombinante expresada en varios sistemas de expresión: células de insecto infectadas con baculovirus, la levadura *Pichia pastoris* y células CHO transfectadas con el DNAC de *hpa*. Para ver detalles acerca de los clones de *Pichia* y CHO véase la Patente estadounidense Núm. 6.348.344.

La especificidad del anticuerpo purificado se muestra en la Figura 18. El anticuerpo purificado identificó una proteína sencilla de unos 65 kDa expresada en *Pichia pastoris* (Figura 18, carril 4) y una banda principal de tamaño similar expresada en células Sf21 infectadas con baculovirus recombinante (Figura 18, carril 1). En un clon de CHO transfectado estable se detectaron bandas de 65 kDa y 50 kDa (Figura 18, carril 3) al compararlas con el control negativo (Figura 18, carril 2). En varios experimentos se identificaron las dos formas de heparanasa recombinante donde la forma mayor aparecía como 60 a 65 kDa y la menor como 45 a 50 kDa. El anticuerpo 7644 era más específico y detectó principalmente las bandas de la heparanasa recombinante. El 7460 detectó otras varias bandas de reacción cruzada.

Tal como se muestra en la Figura 19a, los anticuerpos policlonales brutos reconocieron bandas múltiples en plaquetas humanas (carriles 2 y 3), extractos celulares de neutrófilos (carriles 4 y 5) y en la línea celular de melanoma murino B16 (carriles 6 y 7). Sin embargo, como se muestra en la Figura 19b, los anticuerpos purificados por afinidad reconocieron las formas de 65 kDa y 50 kDa de heparanasa purificada de placenta (carril 1), dos bandas mayores en extracto plaquetario, una banda superior de aproximadamente 50 kDa que se corresponde con la banda inferior de la proteína purificada y una banda inferior de unos 30 kDa (carriles 2 y 3). En células de melanoma murino aparece la proteína de 50 kDa, dos bandas de mayor peso molecular y varias bandas menores que representan proteínas de reacción cruzada y otras especies de heparanasa (carriles 6 y 7).

Anticuerpos monoclonales: Se analizó por ELISA la reactividad de ochocientos hibridomas, generados tras tres fusiones, contra heparanasa humana (nativa y desnaturalizada). Se seleccionaron ocho hibridomas positivos. La siguiente Tabla 3 resume las características de estos ocho hibridomas.

TABLA 3

Reactividad relativa de sobrenadantes de hibridomas con heparanasa humana recombinante nativa y desnaturalizada

Hibridoma		ELISA		Transferencia Western
	Nativa		Desnaturalizada	
HP-6	-		+	n.d.
HP-40	+++		++	n.d.
HP-45	+		++	n.d.
HP-92	++		+++	n.d.
HP-117	++++		+++	60,45,42 kDa
HP-130	++++		+++	n.d.
HP-239	++++		+++	n.d.
HP-303	-		++	n.d.

n.d. - no determinada

Se realizó una inmunotransferencia (inmunoblot) de heparanasa recombinante y nativa expresada en diversos tipos celulares utilizando el sobrenadante del hibridoma HP-117 (Figura 20). En un extracto de células CHO transfectadas estables (carril 3) y en extractos plaquetarios (carril 6) se detectó una banda mayor de aproximadamente 50 kDa. En comparación con el control negativo (carril 2 y 1 respectivamente) esta banda también se detecta en las células transfectadas 293. En todos los extractos celulares de mamíferos se observó una banda de aproximadamente 42 kDa, incluso en el control negativo. Probablemente, esta banda representa una proteína de reacción cruzada o una forma endógena de heparanasa. La heparanasa recombinante de 65 kDa purificada a partir de un medio de células de insecto infectadas por baculovirus se observa claramente en la carril 5 además de una banda de 53 kDa en la carril 6 que es el tamaño esperado de los 508 aminoácidos de polipéptido de heparanasa expresados en las células *E. Coli*.

Tanto los anticuerpos policlonales como los monoclonales se utilizaron con éxito para la detección de la heparanasa en las células intactas mediante la inmunohistoquímica. Los anticuerpos policlonales mostraron una tinción específica de las células CHO transfectadas con el vector de expresión p*ShaCdhfr* tal y como se describe en la Patente Estadounidense núm. 6/34.344, en comparación con las células CHO no transfectadas que no se tiñeron (Figuras 21a y 21b). Con varios anticuerpos monoclonales se obtuvieron resultados similares. Las Figuras 22a y 22b muestran la tinción específica de la heparanasa en el citoplasma de las células CHO transfectadas, con el sobrenadante del HP-130 del hibridoma. En las células no transfectadas no se observó ninguna tinción. El HP-92 del anticuerpo monoclonal mostró una tinción específica de los neutrófilos y las plaquetas del frotis sanguíneo del donante sano (Figuras 23a a 23c). Este patrón de expresión es consecuente con los altos niveles de la característica actividad de heparanasa de estas células.

La disposición de los anticuerpos de antiheparanasa hará posible el desarrollo de ensayos inmunológicos para cribar los tejidos y los fluidos del cuerpo para la heparanasa. Un ELISA proporcionará un medio más sensible y práctico para la detección, en comparación con los ensayos actualmente disponibles de la actividad de heparanasa que no parecen ser bastante sensibles para la detección de la enzima en el plasma y los fluidos del cuerpo no concentrados.

El ELISA proporcionará una herramienta de diagnóstico poderosa para la determinación cuantitativa de las concentraciones de heparanasa en el suero, el plasma, la orina y otros fluidos biológicos. Aunque las plaquetas y las células activadas del sistema inmunológico (11) pueden expresar la actividad de la heparanasa bajo ciertas condiciones, se ha detectado poca o ninguna actividad de heparanasa en el plasma humano normal. La posibilidad manifiesta que los pacientes con cáncer, en concreto con leucemia y linfoma, la heparanasa se oculta en el frotis sanguíneo. De hecho, los estudios realizados en esta invención indican que tanto las células leucémicas mieloides humanas crónicas como las agudas (AML y CML), pero no las células leucémicas linfocitarias (CLL), secretan cantidades sustanciales de heparanasa durante la corta incubación en PBS a 4°C.

Tal y como se ha descrito anteriormente, los niveles elevados de heparanasa se detectaron en el suero de animales con tumor metastásico y pacientes con melanoma (13) y en biopsias de tumores de pacientes con cáncer (15). Se midieron niveles elevados de actividad de heparanasa en la orina de los pacientes con una enfermedad metastásica agresiva y no se detectó actividad en la orina de los donantes sanos.

Cuantificación de los niveles de heparanasa mediante la utilización de anticuerpos monoclonales (Mab): Se aislaron cinco hibridomas. La tabla 4 resume las características de los distintos anticuerpos de ese modo producidos y secretados tal y como se detalla más abajo.

Mapeo de los epítomos: Para algunos fines es necesario determinar si los anticuerpos monoclonales individuales dirigida contra el mismo antígeno se unen a epítomos idénticos o solapados. Se utilizó un método lineal para mapear el epítomo reconocido por cada anticuerpo dentro de la proteína de heparanasa. Las mutaciones de delecciones seriadas se realizaron y ensayaron para la producción de los fragmentos que un anticuerpo podía reconocer. En la práctica, este método solo puede localizar los sitios de unión en una región pequeña. Los sobrenadantes de dos anticuerpos monoclonales, HP-117 y HP-239 se analizaron mediante Western blot para la reactividad con varios segmentos de la heparanasa recombinante expresada en las células de insectos infectadas por el baculovirus. Como se puede ver en la Figura 25, el anticuerpo monoclonal HP-117 reconoció un segmento de 79 aminoácidos en el C terminal del marco de lectura abierto de la heparanasa (aminoácidos 465 al 543). El anticuerpo monoclonal HP-239 reconoció un epítomo interno situado en los aminoácidos 130 al 160.

TABLA 4

Características de 4 Mab

Mab	W	IH	IP	EL	Neut	Epítomo (aa)	Subclase
117	+			+	+	465 a 543	IgG1
239	+			+		130 a 160	IgG2a
130	+	+	++	+	++	465 a 543	IgG1
92		++		+		160 a 230	IgM

ELISA en sándwich de heparanasa p60: Los niveles de heparanasa p60 de orina se midieron en 21 personas normales y en 10 pacientes con una enfermedad nefrológica utilizando el ELISA en sándwich de heparanasa p60 cuantitativo. Las muestras de orina se diluyeron 1:5 y 1:10 con diluyente de muestras. El rango medio para las personas normales fue de 0 ng/ml, en comparación con los 11 a 160 ng/ml para los pacientes nefrológicos. Estos resultados clínicos preliminares de fallo renal muestran que un ensayo de heparanasa p60 puede servir como herramienta útil en el diagnóstico de estos pacientes.

Expresión preferencial de la heparanasa en los tumores humanos: La expresión preferencial de la heparanasa en los tumores humanos en comparación con los tejidos normales correspondientes se demostró mediante la tinción por inmunohistoquímica de las muestras de biopsias incrustadas en parafina. Tal y como muestran las Figuras de la 26a a la 26d, las secciones de tejidos de las muestras de las biopsias de los pacientes con cáncer de colon (adenoma de células epiteliales vellosas - 26a-b; adenocarcinoma de colon - 26c-d) se tiñeron con un anticuerpo antiheparanasa monoclonal. La tinción primero se observó en las células epiteliales vellosas (26b-c) y en un grado menor en las células tisulares conectivas (26b-c). El epitelio de colon normal situado lejos de la lesión neoplásica en el paciente con adenoma de células epiteliales vellosas presentó poca o ninguna tinción (Figura 26a). Tuvo una importancia particular la inmunotinción intensa de las células del carcinoma de colon que habían realizado la metástasis en el hígado, en comparación con el tejido de hígado normal que lo rodeaba (Figura 26d). La sobreexpresión de la heparanasa, por lo tanto sería una propiedad característica de las células de tumores metastásicos.

Los resultados arriba presentados utilizando la técnica de diagnóstico ELISA en sándwich ayudarían a mejorar el tratamiento del cáncer detectando mejor el estado de la enfermedad y cómo los pacientes responden al tratamiento. Por ejemplo, en un ensayo clínico se demostró que el radioinmunoensayo TRUQANT BR de Biomira Diagnostics para el antígeno CA 27.29 predecía la progresión o remisión del cáncer de mama en el estado IV. Los investigadores informaron en el encuentro nacional de la American Society of Clinical Oncology (ASCO) que un 50% de aumento o disminución en los niveles del marcador son indicadores significativos de la progresión o regresión de la enfermedad. Además, los valores del CA 27.29 cambiaron hasta 105 días antes de que los cambios se pudieran observar en la enfermedad del paciente (38).

Los niveles de los antígenos séricos pueden predecir, si la quimioterapia o la radioterapia funcionan. Contestar a esta pregunta sería muy difícil si los médicos únicamente confían en los síntomas clínicos o los estudios por imágenes para determinar si los tumores están en progreso o en recesión. En algunos casos, sin embargo, la detección de los antígenos asociados a tumores puede servir como signo temprano de que el tratamiento no es eficaz y que la enfermedad está empeorando, en este caso el tratamiento debería cambiarse, o que el tratamiento es eficaz.

Aunque la invención se a descrito en conjunto con sus realizaciones específicas, está claro que muchas alternativas, modificaciones y variaciones serán evidentes para los especialistas en el campo. Por consiguiente, se pretende

incorporar todas esas alternativas, modificaciones y variaciones que recaen en el espíritu y el amplio alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Lista de referencias

1. **Wight**, T.N., **Kinsella**, M.G., and **Qwarnstromn**, E.E. (1992). The role of proteoglycans in cell adhesion, migration and proliferation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 4: 793-801.
2. **Jackson**, R.L., **Busch**, S.J., and **Cardin** A.L. (1991). Glycosaminoglycans: Molecular properties, protein interactions and role in physiological processes. *Physiol. Rev.* 71: 481-539.
3. **Wight**, T.N. (1989). Cell biology of arterial proteoglycans. *Arteriosclerosis* 9:1-20.
4. **Kjellen**, L., and **Lindahl**, U. (1991). Proteoglycans: structures and interactions. *Annu. Rev. Biochem.* 60: 443-475.
5. **Ruoslahti**, E., and **Yamaguchi**, Y. (1991). Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell* 64: 867-869.
6. **Vlodavsky**, I., **Bar-Shavit**, R., **Korner**, G., and **Fuks**, Z. (1993). Extracellular matrix-bound growth factors, enzymes and plasma proteins. In Basement membranes: Cellular and molecular aspects. (eds. D.H. Rohrbach and R. Timpl), pp 327-343. *Academic press Inc.*, Orlando, Fl.
7. **Vlodavsky**, I., **Eldor**, A., **Haimovitz-Friedman**, A., **Matzner**, Y., **Ishai-Michaeli**, R., **Levi**, E., **Bashkin**, P., **Lider**, O., **Naparstek**, Y., **Cohen**, I.R.; and **Fuks**, Z. (1992). Expression of heparanase by platelets and circulating cells of the immune system: Possible involvement in diapedesis and extravasation. *Invasion & Metastasis* 12: 112-127.
8. **Vlodavsky**, I., **Mohsen**, M., **Lider**, O., **Ishai-Michaeli**, R., **Ekre**, H.- P., **Svahn**, C.M., **Vigoda**, M., and **Peretz**, T. (1995). Inhibition of tumor metastasis by heparanase inhibiting species of heparin. *Invasion & Metastasis* 14: 290-302.
9. **Nakajima**, M., **Irimura**, T., and **Nicolson**, G.L. (1988). Heparanase and tumor metastasis. *J. Cell. Biochem.* 36:157-167.
10. **Liotta**, L.A., **Rao**, C.N., and **Barsky**, S.H. (1983). Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab. Invest.* 49: 639-649.
11. **Vlodavsky**, I., **Fuks**, Z., **Bar-Ner**, M., **Ariav**, Y., and **Schirmacher**, V. (1983). Lymphoma cell mediated degradation of sulfated proteoglycans in the subendothelial. extracellular matrix: Relationship to tumor cell metastasis. *Cancer Res.* 43: 2704-2711.
12. **Vlodavsky**, I., **Ishai-Michaeli**, R., **Bar-Ner**, M., **Fridman**, R., **Horowitz**, A.T., **Fuks**, Z. and **Biran**, S. (1988). Involvement of heparanase in tumor metastasis and angiogenesis. *Is. J. Med.* 24: 464-470.
13. **Parish**, C.R., **Coombe**, D.R., **Jakobsen**, K.B., and **Underwood**, P.A. (1987). Evidence that sulphated polysaccharides inhibit tumor metastasis by blocking tumor cell-derived heparanase. *Int. J. Cancer* 40:511-517.
14. **Vlodavsky**, I., **Liu**, G.M., and **Gospodarowicz**, D. (1980). Morphological appearance, growth behavior and migratory activity of human tumor cells maintained on extracellular matrix vs. plastic. *Cell* 19:607-616.
15. **Gospodarowicz**, D., **Delgado**, D., and **Vlodavsky**, I. (1980). Permissive effect of the extracellular matrix on cell proliferation *in-vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4094-4098.
16. **Burgess**, W.H., and **Maciag**, T. (1989). The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 575-606.
17. **Folkman**, J., and **Klagsbrun**, M. (1987). Angiogenic factors. *Science* 235: 442-447.
18. **Vlodavsky**, I., **Bar-Shavit**, R., **Ishai-Michaeli**, R., **Bashkin**, P., and **Fuks**, Z. (1991). Extracellular sequestration and release of fibroblast growth factor: a regulatory mechanism ? *Trends Biochem. Sci*: 16 268-271.
19. **Cardon-Cardo**, C., **Vlodavsky**, I., **Haimovitz-Friedman**, A., **Hicklin**, D., and **Fuks**, Z. (1990). Expression of basic fibroblast growth factor in normal human tissues. *Lab. Invest.* 63: 832-840.
20. **Ishai-Michaeli**, R., **Eldor**, A., and **Vlodavsky**, I. (1990). Heparanase activity expressed by platelets, neutrophils and lymphoma cells releases active fibroblast growth factor from extracellular matrix. *Cell Reg.* 1:833-842.

21. **Campbell, K.H., Rennick, R.E., Kalevich, S.G., and Campbell, G.R. (1992).** *Exp. Cell Res.* 200: 156-167.
22. **Oosta, G.M., Favreau, L.V., Beeler, D.L. and Rosenberg, R.D. (1982).** Purification and properties of human platelets heparitinase. *J. Biol. Chem.* 257: 11,249-11,255.
23. **Hoogewerf, A.J., Leone, J.W., Reardon, M., Howe, W.J., Asa, D., Heinrikson, R.L., and Ledbetter, S.R. (1995).** CXC chemokines connective tissue activating peptide-III and neutrophil activating peptide-2 are heparin/heparan sulfate-degrading enzymes. *J. Biol. Chem.* 270: 3268-3277.
24. **Freeman, C., and Parish, C.R. (1988).** Human platelet heparanase: Purification, characterization and catalytic activity. *Biochem. J.* 330: 1341-1350.
25. **Goshen, R., Hochberg, A., Korner, G., Levi, E., Ishai-Michaeli, R., Elkin, M., de Grot, N., and Vlodavsky, I. (1996).** Purification and characterization of placental heparanase and its expression by cultured cytotrophoblasts. *Mol. Human Reprod.* 2: 679-684.
26. **Jin, L., Nakajima, M. and Nicolson, G.L. (1990).** Immunochemical localization of heparanase in mouse and human melanoma. *Int. J. Cancer* 45: 1088-1095.
- 26a. **Mollinedo, F., Naagima, M., Leorens, A., Barbosa, E., Carriljo, S., Gajate, C., and Fabras, A. (1997).** Major co-localization of the extracellular-matrix degradative enzymes heparanase and gelatinase in tertiary granules of human neutrophils. *Biochem. J.* 327:917-923.
27. **De Vouge, M.W., Yamazaki, A., Bennett, S.A.L., Chen, J.-H., Shwed, P.S., Couture, C., and Birnboim, H.C. (1994).** Immuno selection of GRP94/endoplasmic reticulum protein from a KNRK cell specific IgT11 library using antibodies directed against a putative heparanase amino terminal peptide. *Int. J. Cancer* 56: 286-294.
28. **Graham, L.D., and Underwood, P.A. (1996).** Comparison of the heparanase enzyme from mouse melanoma cells, mouse macrophages and human platelets. *Biochem. and Mol. Biol. International* 39:563-571.
29. **Kosir, M.A., Quinn, C.C.V., Zukowski, K.L., Grignon, D. J., and Ledbetter, S. (1997)** *J. Surg. Res.* 67: 98-105.
30. **Kosir, M.A., Quinn, C.C.V., Pandey, P., Berzinskas-Welle, E., Ledbetter, S., Fridman, R., and Wisscher, D. (1996)** *Cancer Res.* 37: 495 (Ab. # 3378).
- 30a. **Ernst, S., Langer, R., Cooney, Ch.L., and Sasisekharan, R. (1995)** Enzymatic degradation of glycosaminoglycans. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*: 30(5): 387-444.
31. **Gospodarowicz, D., Mescher, A.L., Birdwell, C.R. (1977).** Stimulation of corneal endothelial cell proliferation *in vitro* by fibroblast and epidermal growth factors. *Exp Eye Res* 25: 75-89.
32. **Haimovitz-Friedman, A., Falcone, D.J., Eldor, A., Schirmacher, V., Vlodavsky, I., and Fuks, Z. (1991).** Activation of platelet heparitinase by tumor cell derived factors. *Blood* 78: 789-796.
33. **Yelton, D.E., Scharff, M.D. (1981).** Monoclonal antibodies: a powerful new tool in biology and medicine. *Annu. Rev. Biochem.* 50: 657-680.
34. **Friedmann, Y., and Daniel, C.W. (1996).** Regulated expression of homeobox genes Msx-1 and Msx-2 in the mouse mammary gland suggests a role in epithelial-stromal interactions, hormone action and neoplasia. *Devel. Biol.* 177: 347-355.
35. **Soule, H.D., Maloney, T.M., Wolman, S.R., Peterson, W.D., et al. (1990).** *Cancer Res.* 50: 6075-6086.
36. **Mill, F.R., Soul, H.D., Tait, L., Pauley, R.J., Wolman, S.R., Dawson, P.J., and Heppner, G. H. (1993).** *J. Nat. Cancer Inst.* 85: 1725-1732.
37. **Nakajima, M., Irimura, T., Di Ferrante, D., Diferrante, N., and Nicolson, G.L. (1983).** heparan sulfate degradation: relation to tumor invasion and metastatic properties of mouse B16 melanoma sublines. *Science* 220: 611-613.
38. **The Genesis report. (1996, 1997).**
39. **Iscoe, N.N., Melchers, F.** Complete replacement of serum by albumin, transferrin, and soybean lipid in cultures of lipopolysaccharide-reactive B lymphocytes. *J. Exp. Med.* 147: 923-933.
40. **Bjorck, L., Kronvall, G.** Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG-binding reagent. *J. Immunol* 1984; 133: 969-974.

REIVINDICACIONES

1. Un método para detectar *in situ* la situación y la distribución de la expresión de la heparanasa en una muestra biológica que comprende los pasos de reaccionar la muestra biológica con una sonda molecular específica de heparanasa detectable y detectar la situación y la distribución de dicha sonda molecular específica de heparanasa detectable.

2. El método de la reivindicación 1, en el que dicha muestra biológica se selecciona del grupo formado por células y tejidos.

3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que dicha muestra biológica es maligna.

4. El método de la reivindicación 3, en el que dicha malignidad se selecciona del grupo formado por un tumor sólido y un tumor hematopoyético.

5. El método de la reivindicación 4, en el que dicho tumor sólido se selecciona del grupo formado por el carcinoma, el adenocarcinoma, el carcinoma de células escamosas, el teratocarcinoma, el mesotelioma y el melanoma, y más en el que dicho tumor hematopoyético se selecciona del grupo formado por linfoma y leucemia.

6. El método de la reivindicación 4, en el que dicho tumor sólido es un tumor primario o una metástasis del mismo y se origina a partir del órgano seleccionado del grupo formado por los siguientes órganos: hígado, próstata, vejiga, mama, ovario, cérvix, colon, piel, intestino, estómago, útero y páncreas.

7. El método de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 6 en el que dichas sondas moleculares específicas de heparanasa detectable es una secuencia de ácido nucleico que se puede hibridar con la heparanasa, que codifica el ácido nucleico en el que dicha secuencia de ácido nucleico específica de heparanasa detectable se puede deducir del Id. De sec. Núm.: 3 o un anticuerpo específico de heparanasa se **caracteriza** por unirse específicamente a la heparanasa.

8. El método de la reivindicación 7, en el que dicha secuencia de ácido nucleico que se puede hibridar con heparanasa que codifica el ácido nucleico se selecciona del grupo formado por un oligonucleótido sintético y un RNA de heparanasa antisentido y un DNA de heparanasa, marcados por una porción detectable.

9. Un método *in vitro* para detectar la proteína de heparanasa en un fluido corporal de un paciente que comprende los pasos de reaccionar dicho fluido corporal con un anticuerpo de antiheparanasa que específicamente se une a la heparanasa en una solución y monitorizar dicha reacción, donde dicho fluido corporal se selecciona del grupo formado por plasma, orina, efusión pleural y saliva.

10. El método de la reivindicación 9, donde dicho fluido corporal es de un paciente con una enfermedad seleccionada del grupo formado por cáncer, enfermedad renal, diabetes o inflamación.

11. El método de la reivindicación 10, en el que dicha enfermedad renal está asociada con la diabetes.

12. El método de cualquiera de las reivindicaciones de la 9 a la 11, en el que dicho anticuerpo antiheparanasa se selecciona del grupo formado por un anticuerpo monoclonal y un anticuerpo policlonal.

13. El método de cualquiera de las reivindicaciones de la 9 a la 12, en el que reaccionar dicho fluido corporal con dicho anticuerpo antiheparanasa se realiza en un sustrato capaz de absorber las proteínas presentes en dicho fluido corporal.

14. El método de cualquiera de las reivindicaciones de la 9 a la 13, en el que dicho fluido corporal es de un paciente que padece mieloma, carcinoma de mama, carcinoma de mama metastásico, nefritis hemorrágica, síndrome nefrótico, diabetes del tipo I normoalbuminúrica, diabetes del tipo I microalbuminúrica, alteraciones del riñón, inflamación, sepsis, enfermedad inflamatoria o autoinmunitaria.

15. Un método de detección de la presencia, ausencia o nivel de la proteína de heparanasa en una muestra biológica que comprende por los siguientes pasos:

(a) extraer las proteínas de la muestra biológica, obteniendo así varias proteínas;

(b) separar por tamaño dichas proteínas;

(c) interactuar dichas proteínas separadas por tamaño con un anticuerpo antiheparanasa, donde dicho anticuerpo de antiheparanasa se **caracteriza** en que específicamente se une a la heparanasa; y

(d) detectar la presencia, ausencia o nivel de dicho anticuerpo antiheparanasa interactuado.

16. El método de la reivindicación 15, en el que dicho anticuerpo antiheparanasa se selecciona del grupo formado por un anticuerpo policlonal y un anticuerpo monoclonal.

ES 2 267 266 T3

17. El método de la reivindicación 15 o 16, en el que dicha separación por tamaño se realiza mediante electroforesis.

18. El uso de un complejo de un fármaco directamente ligado o indirectamente ligado a un anticuerpo antiheparanasa que específicamente se une a la heparanasa para la preparación de una composición farmacéutica para la liberación del fármaco específico en el tejido de un paciente, el tejido que expresa la heparanasa, donde dicho anticuerpo específico de heparanasa se **caracteriza** en que es específico para la heparanasa.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1

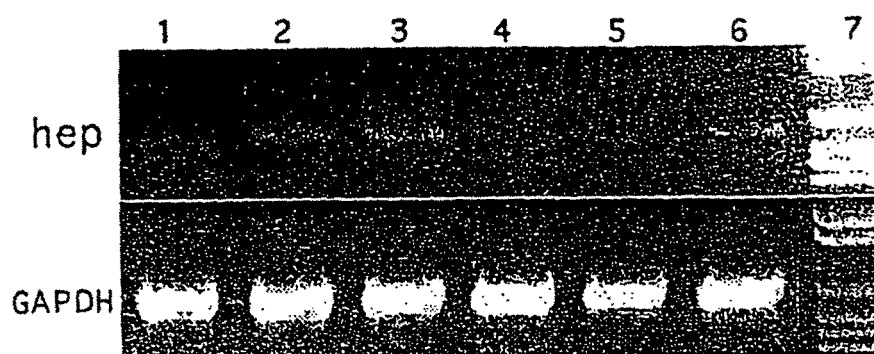


FIG. 2A

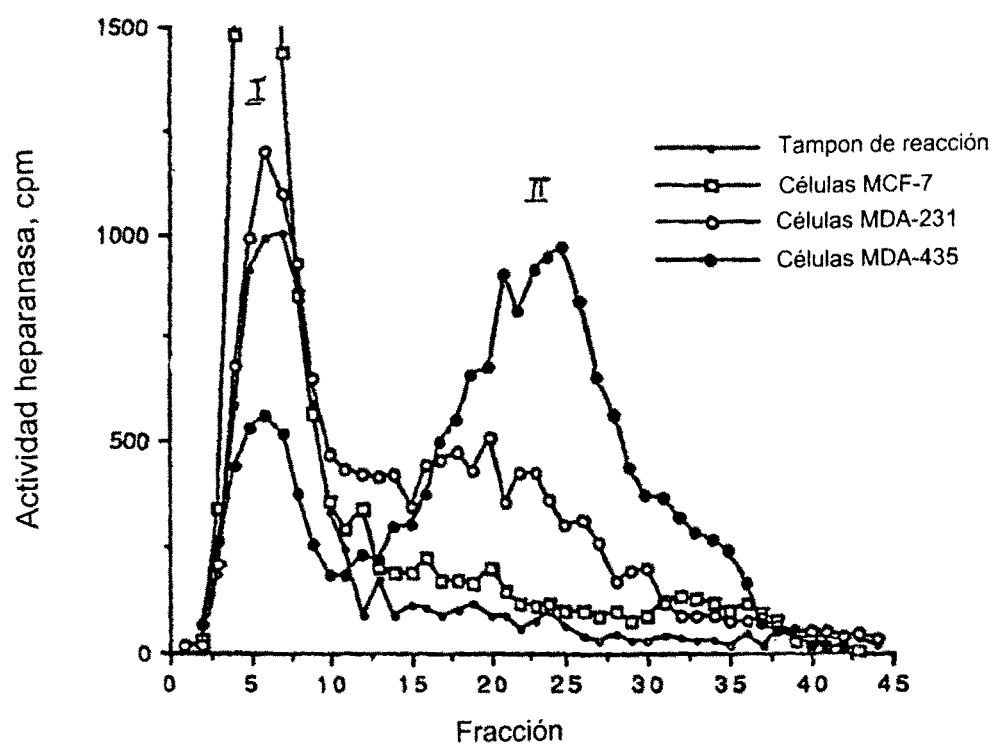
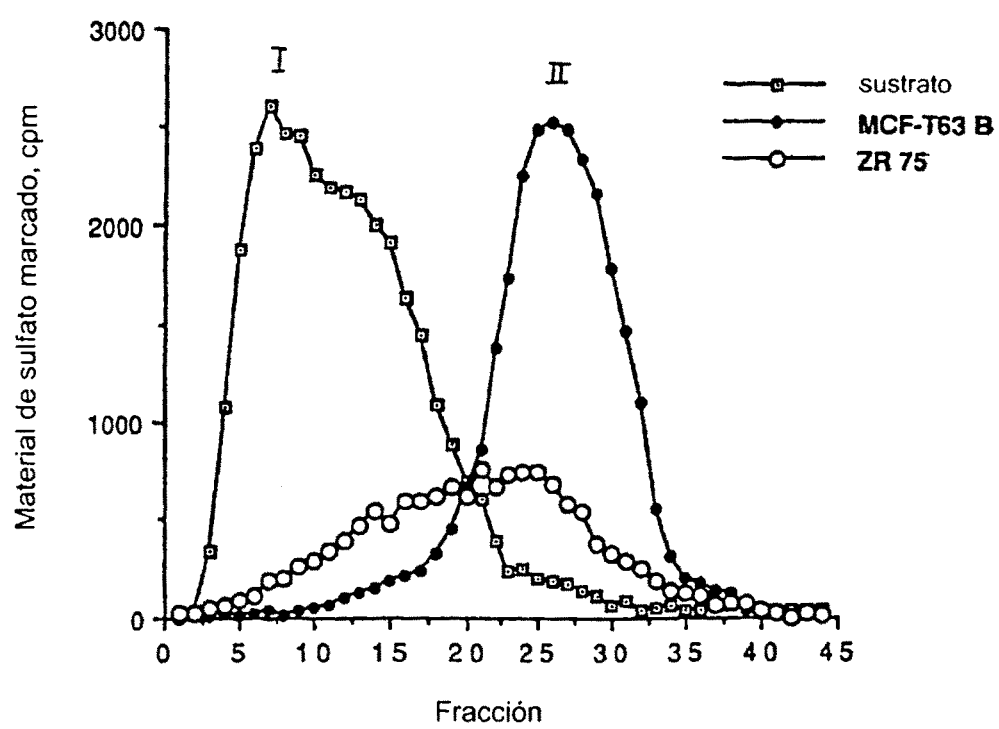
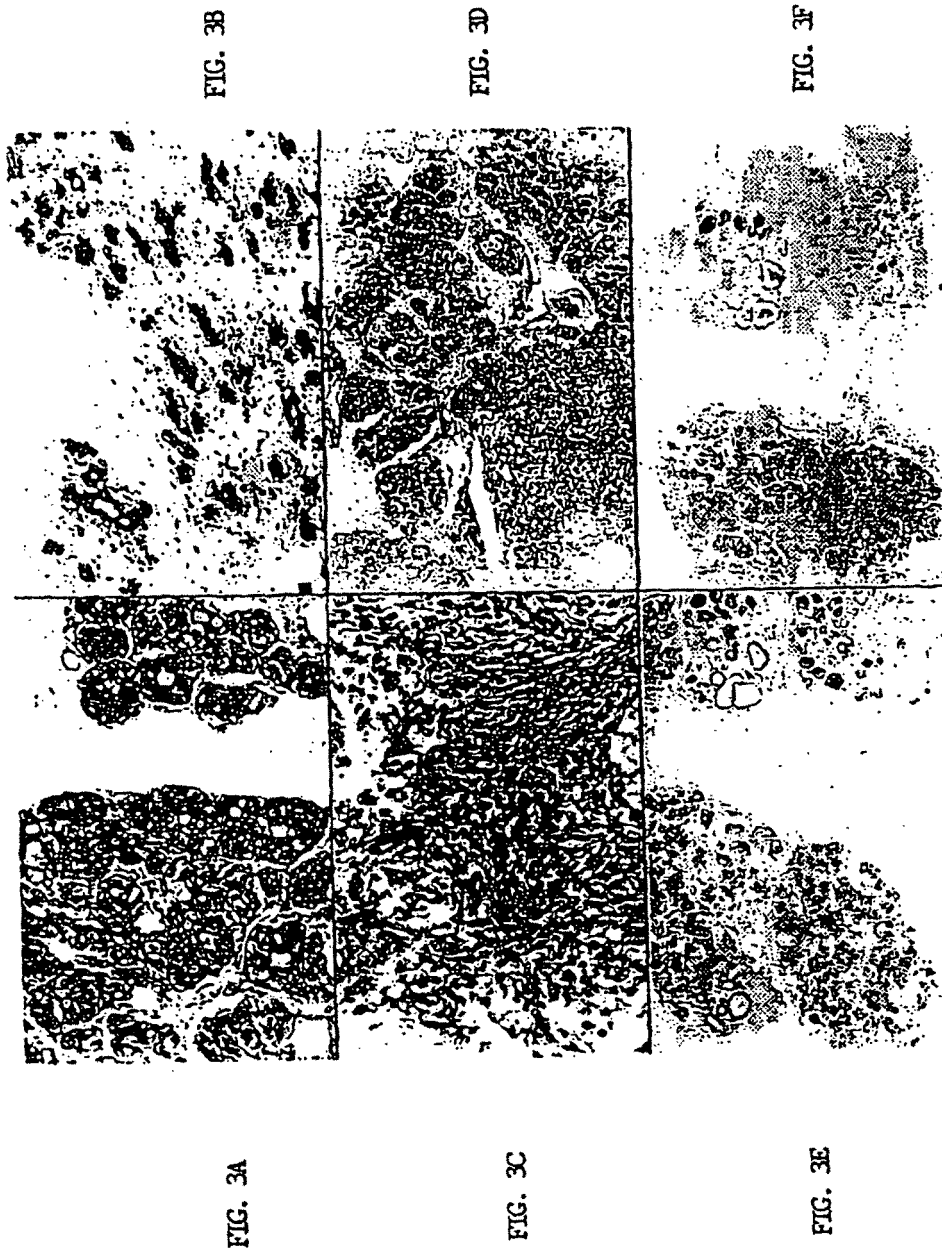


FIG. 2B





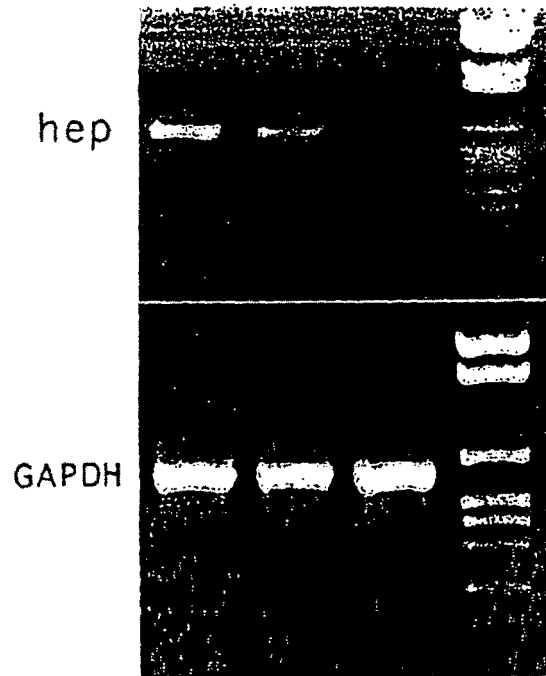


FIG. 4

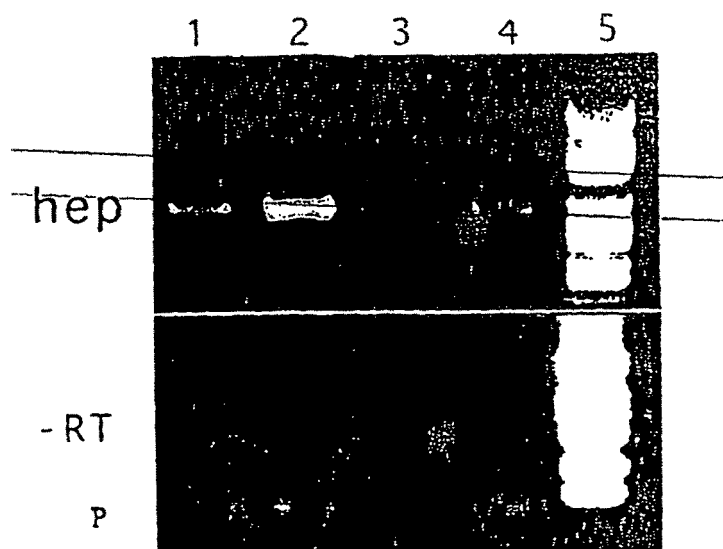


FIG. 5

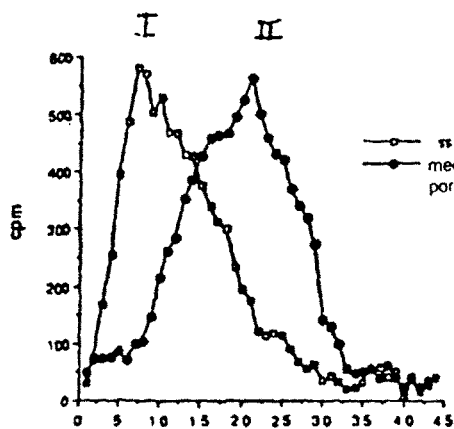


FIG. 6A

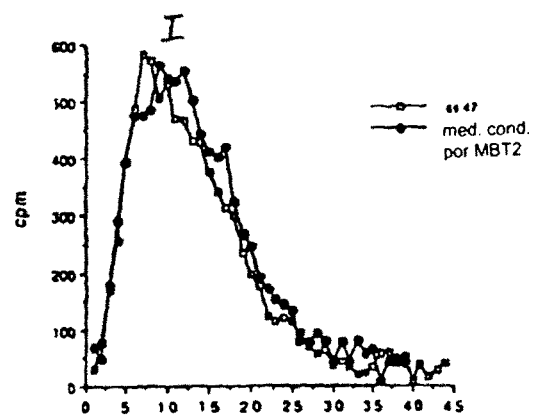


FIG. 6B

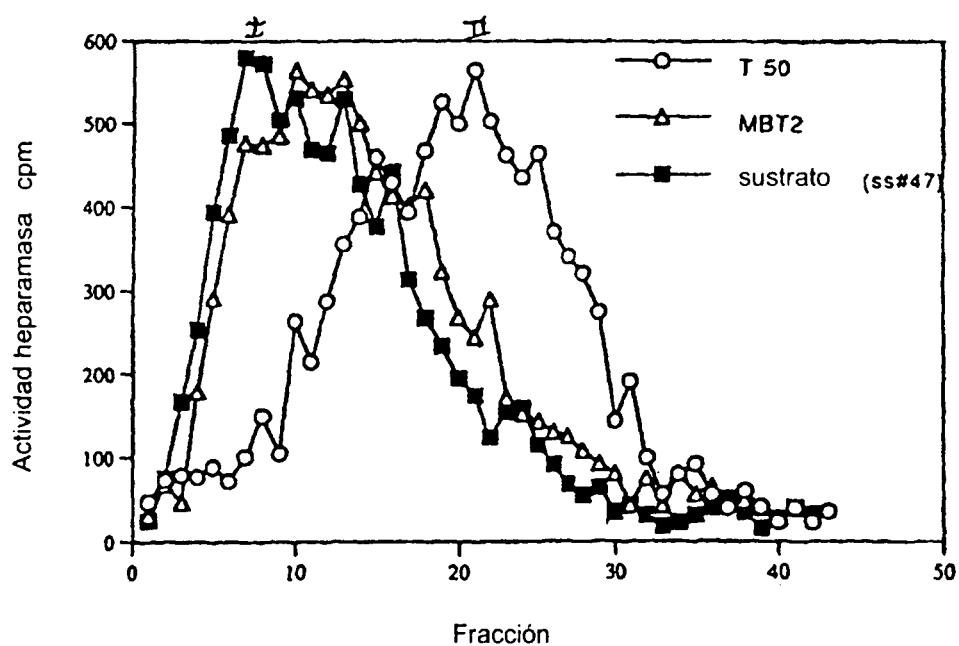


FIG. 6C

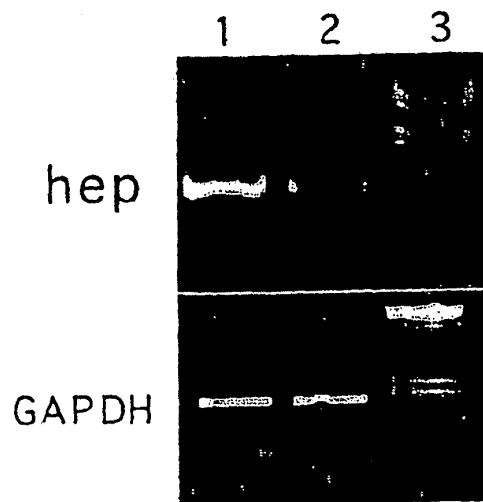


FIG. 7

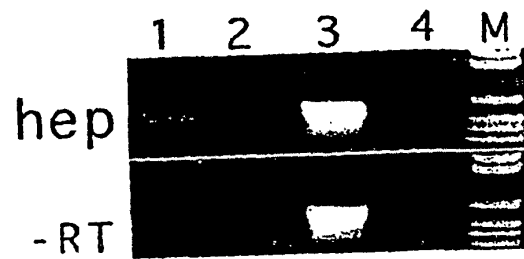


FIG. 8A

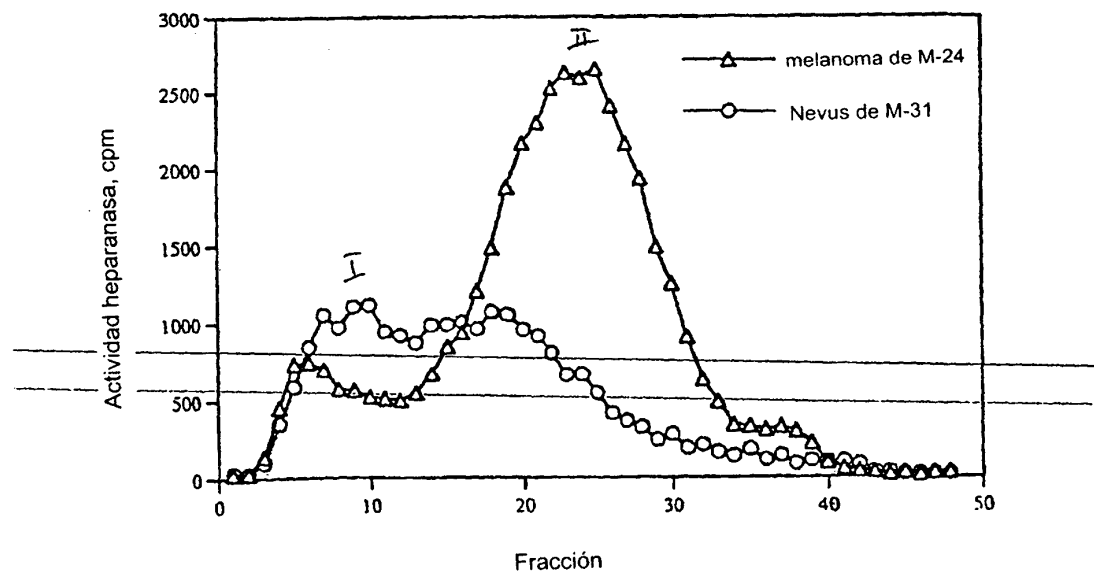
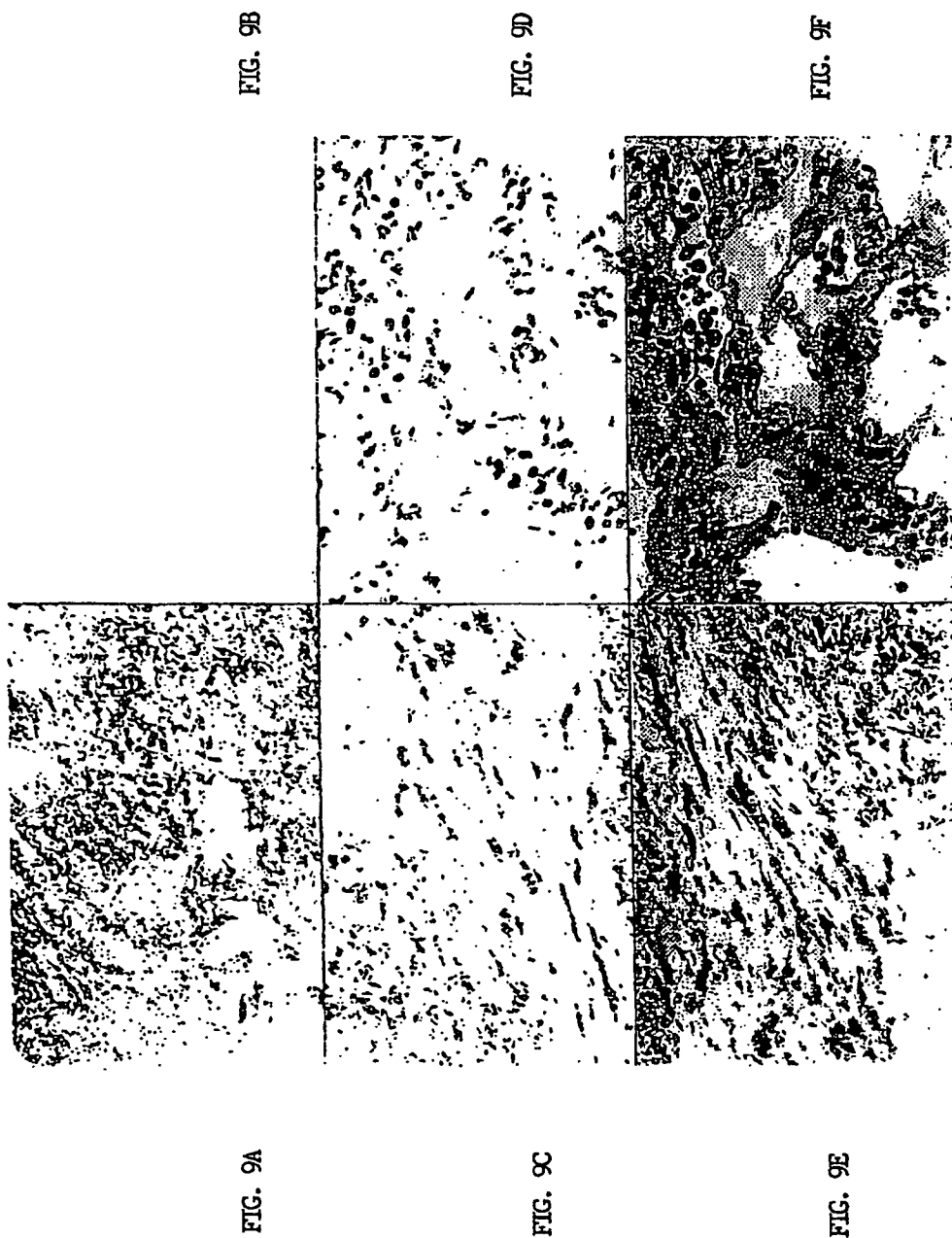
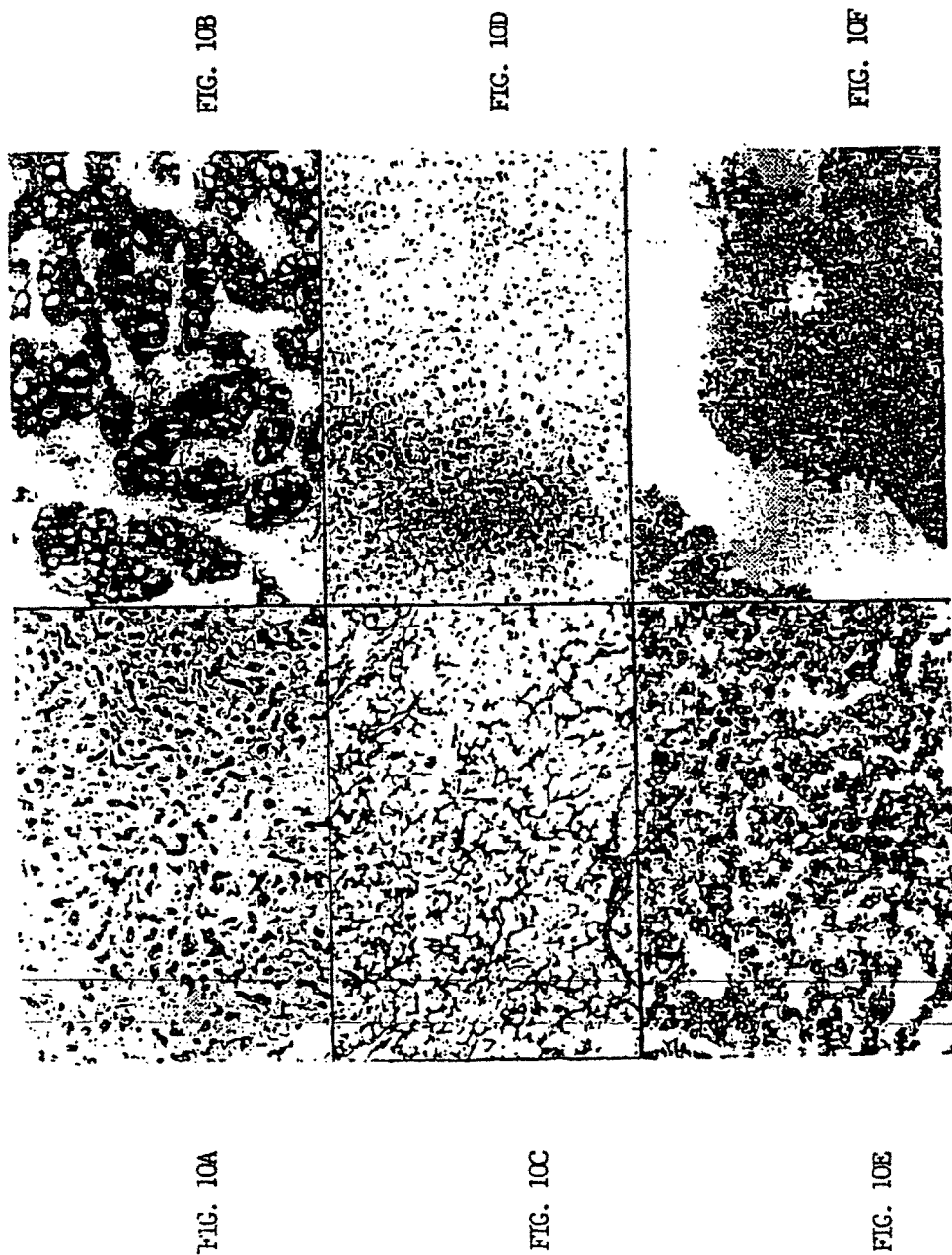
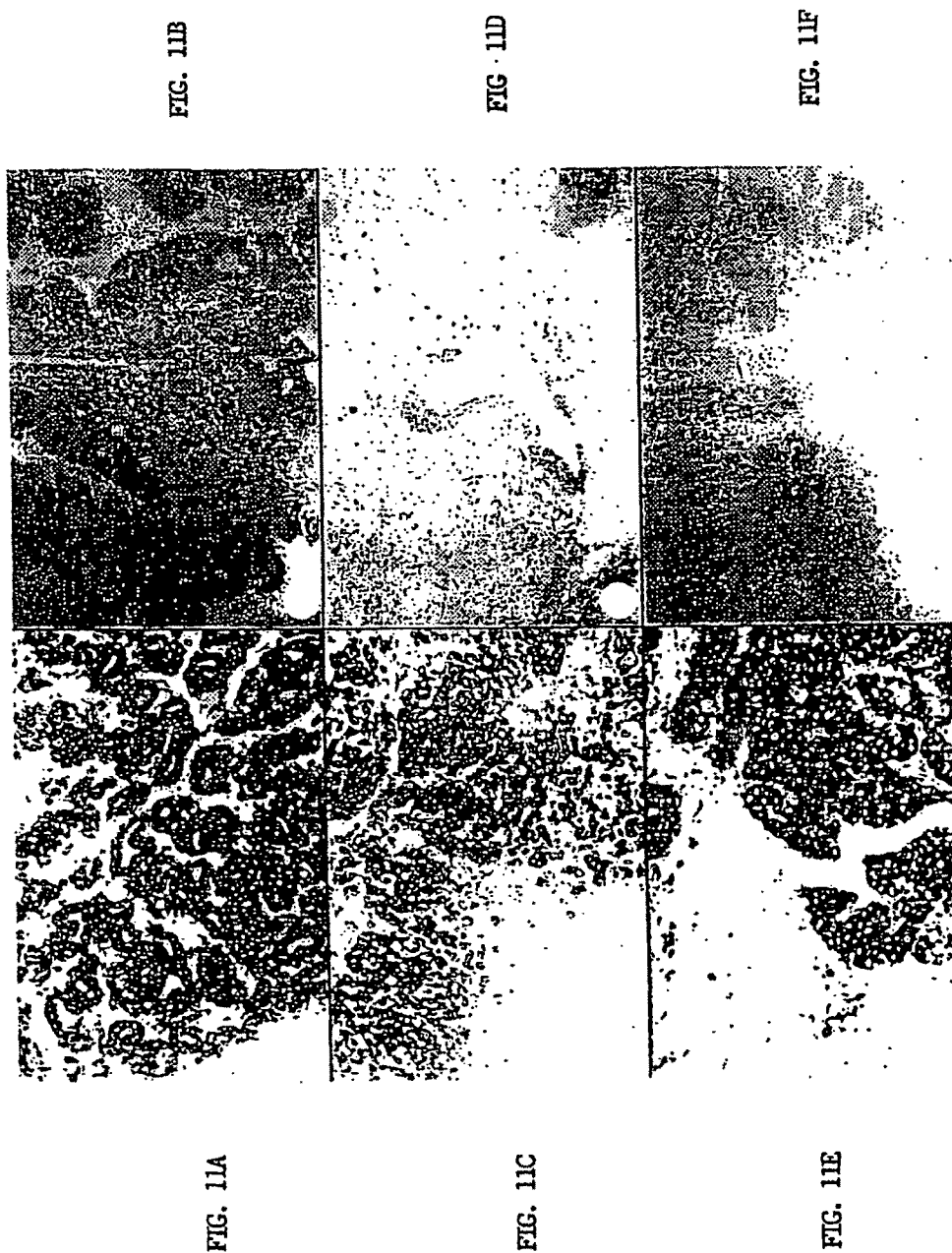
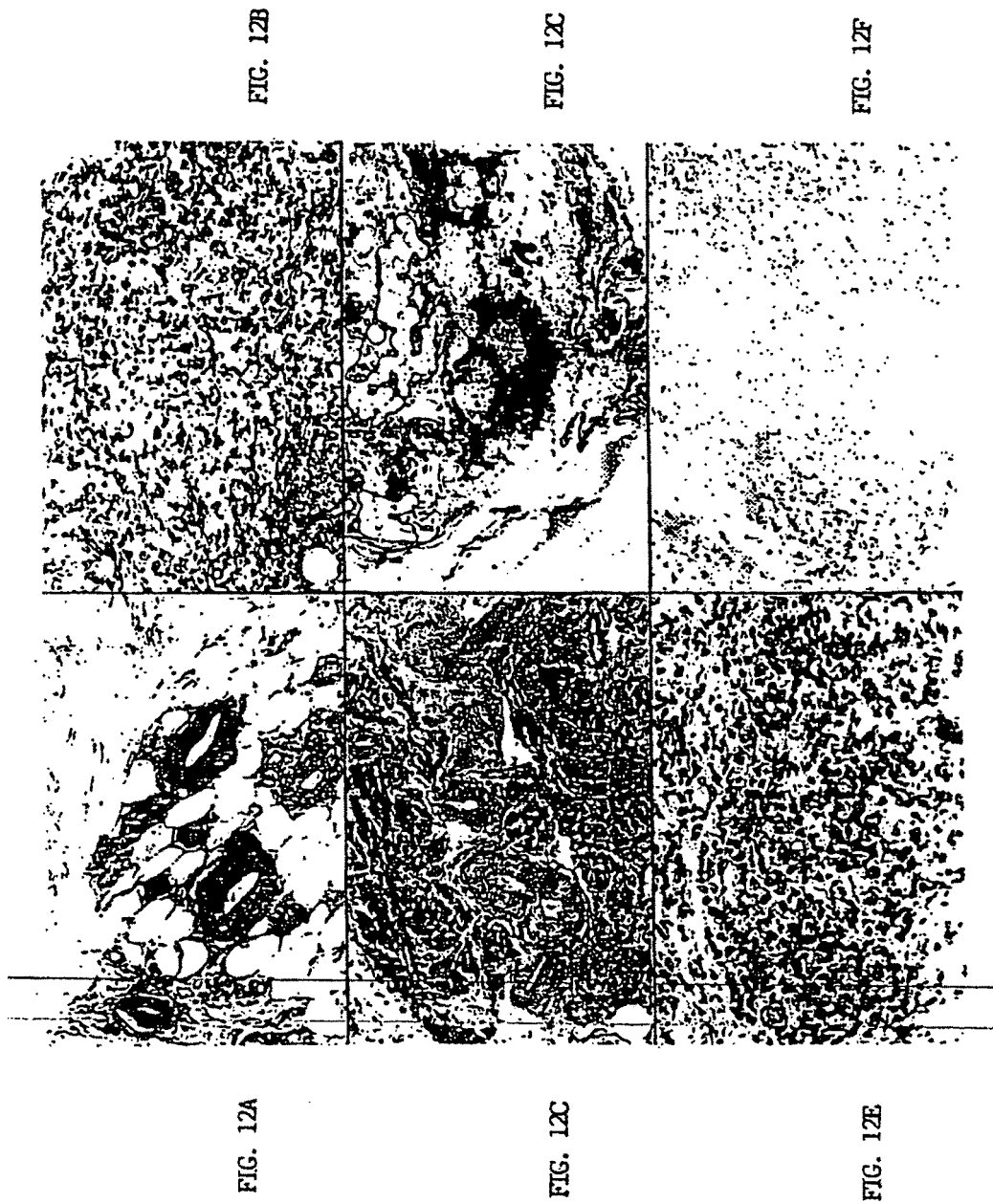


FIG. 8B









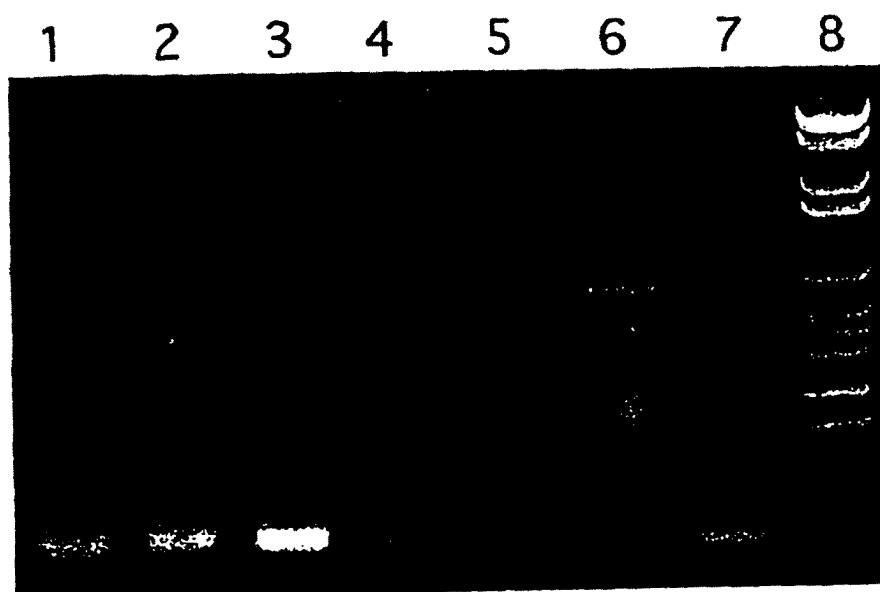


FIG. 13A

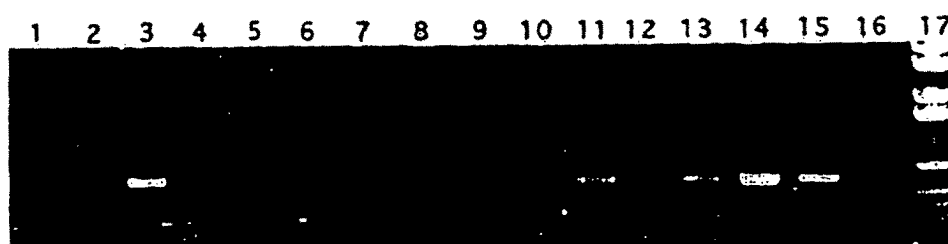


FIG. 13B

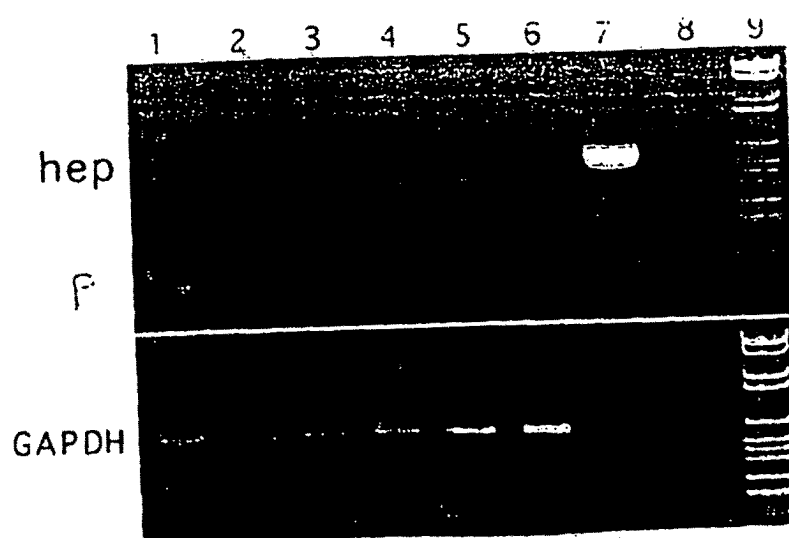


FIG. 14

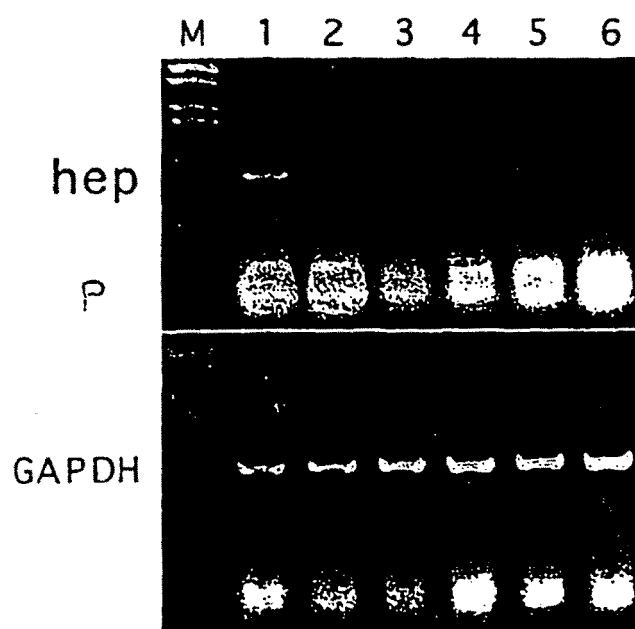
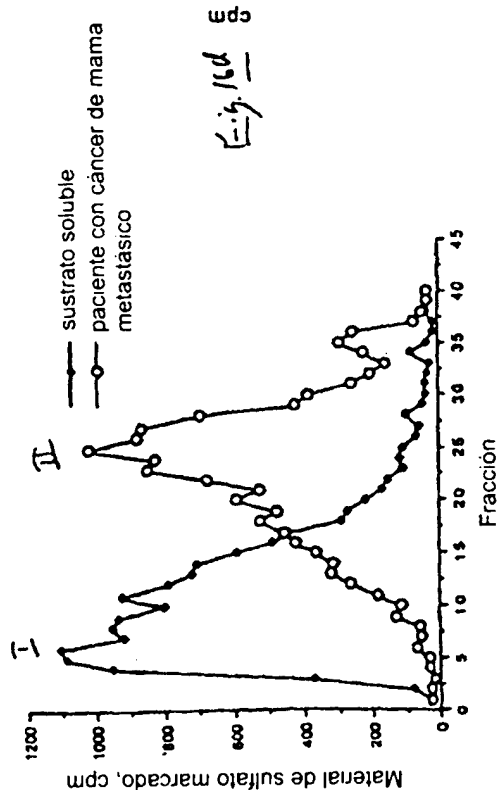
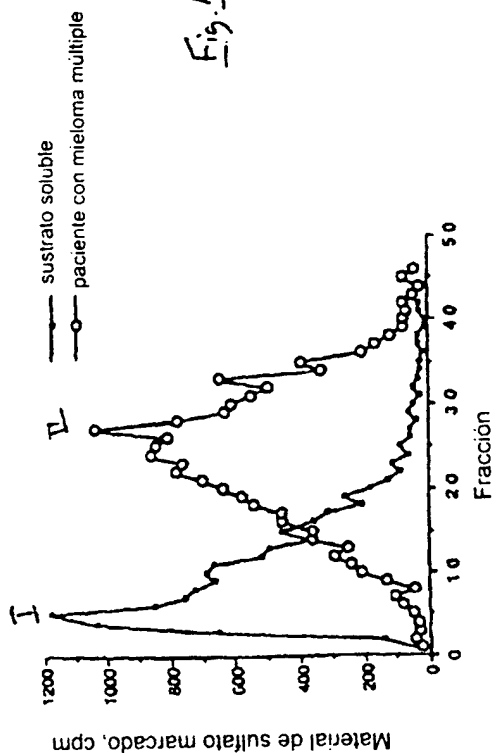
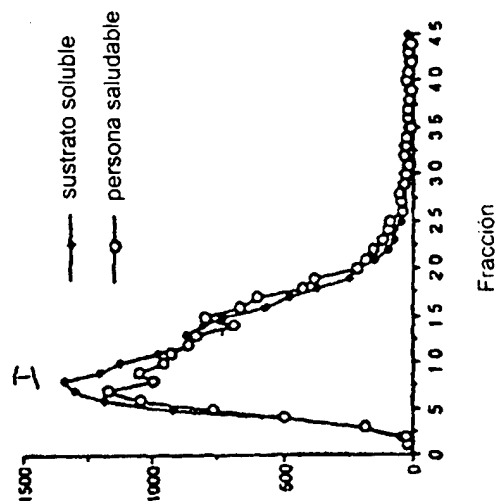
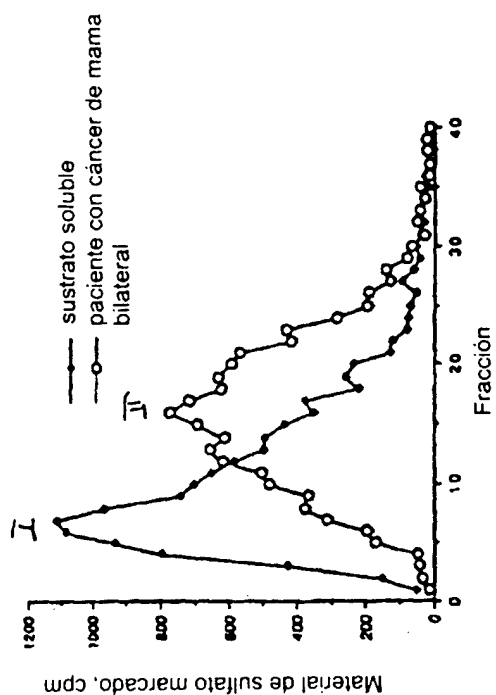
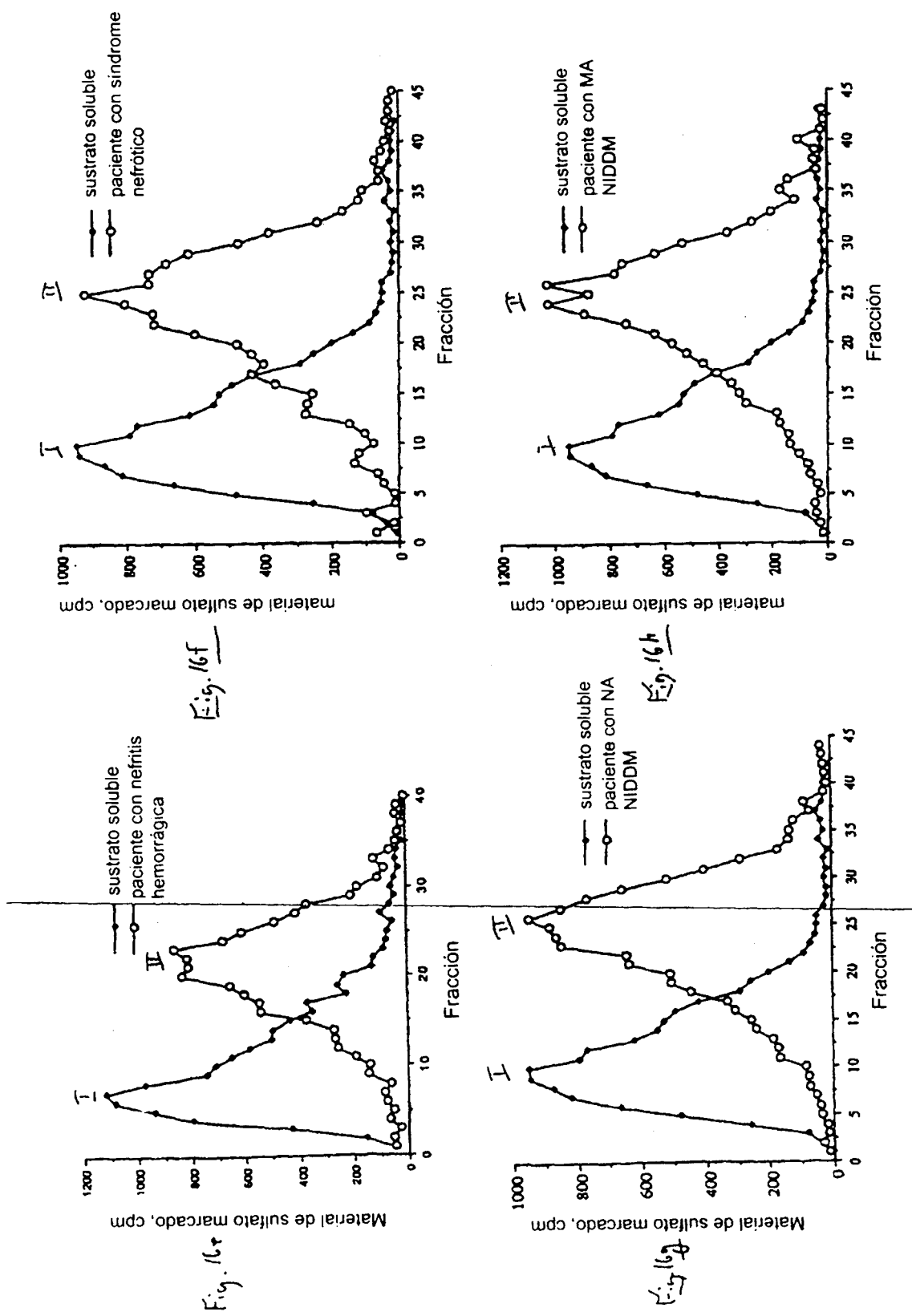


FIG. 15





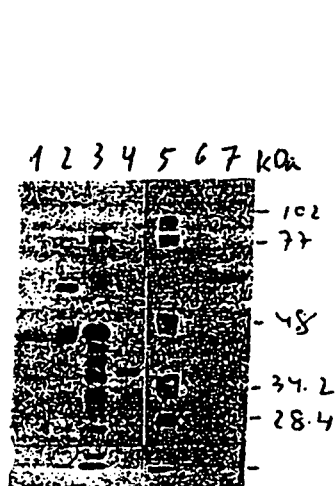


FIG. 17A

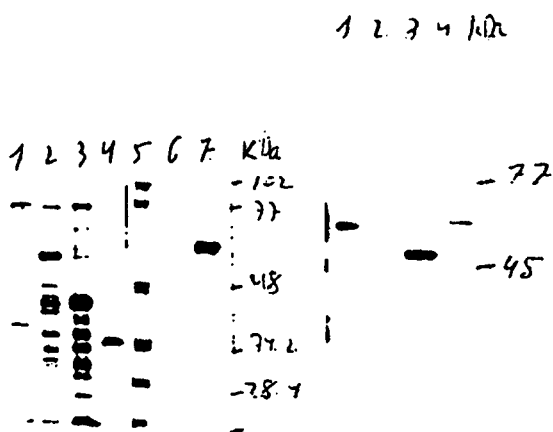


FIG. 17B

1 2 3 4 kDa

FIG. 18

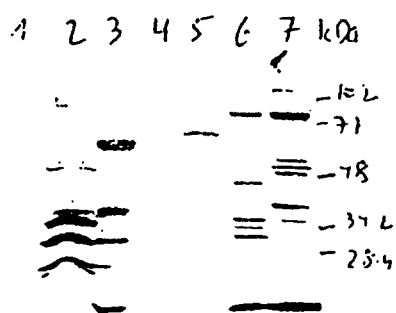


FIG. 19A

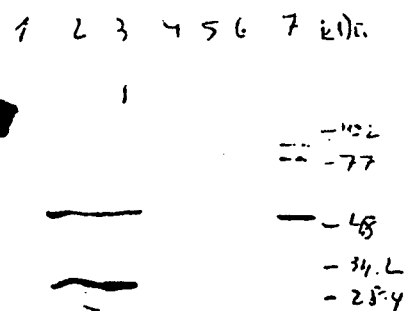


FIG. 19B

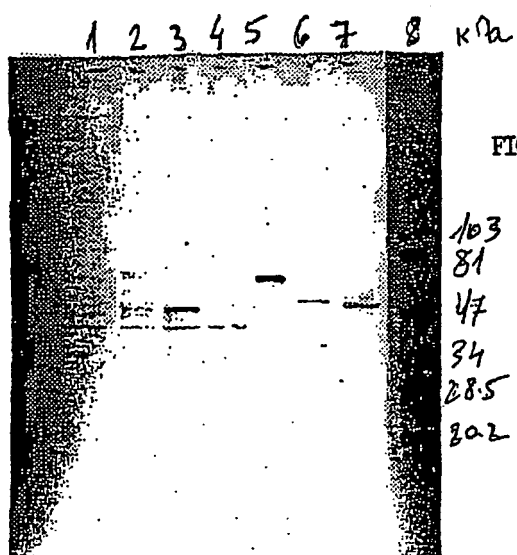


FIG. 20

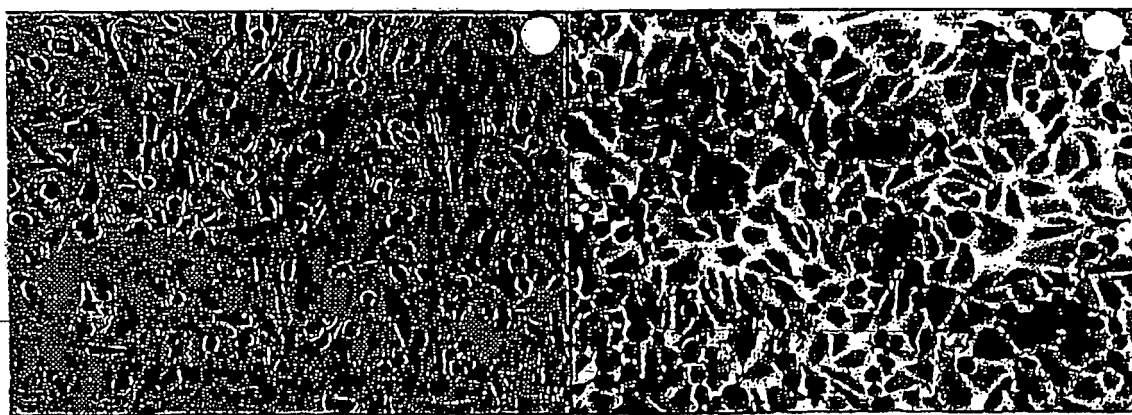


FIG. 21A

FIG. 21B



FIG. 22B

FIG. 22A

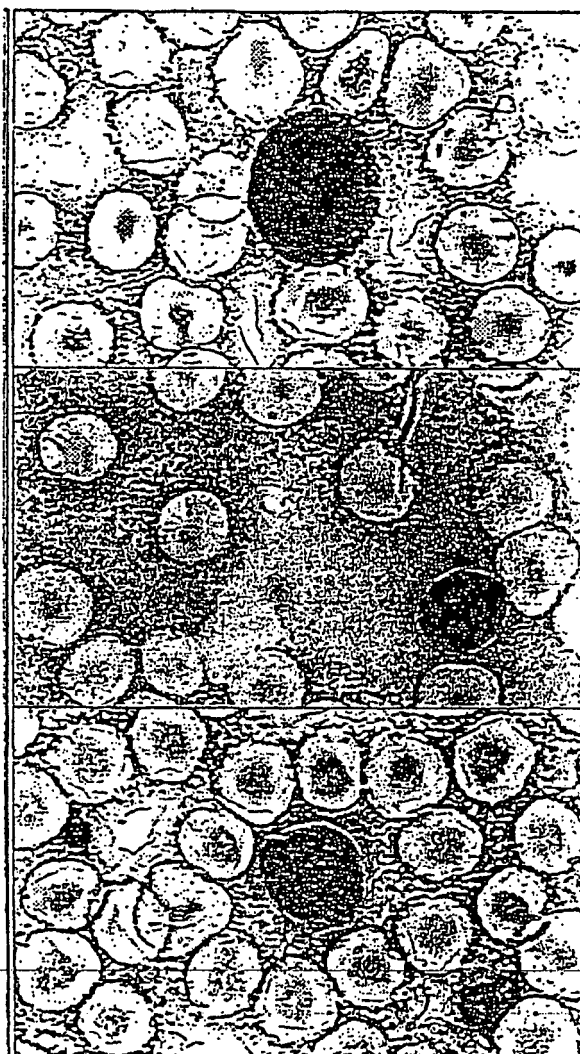


FIG. 23A

FIG. 23B

FIG. 23C

FIG. 24

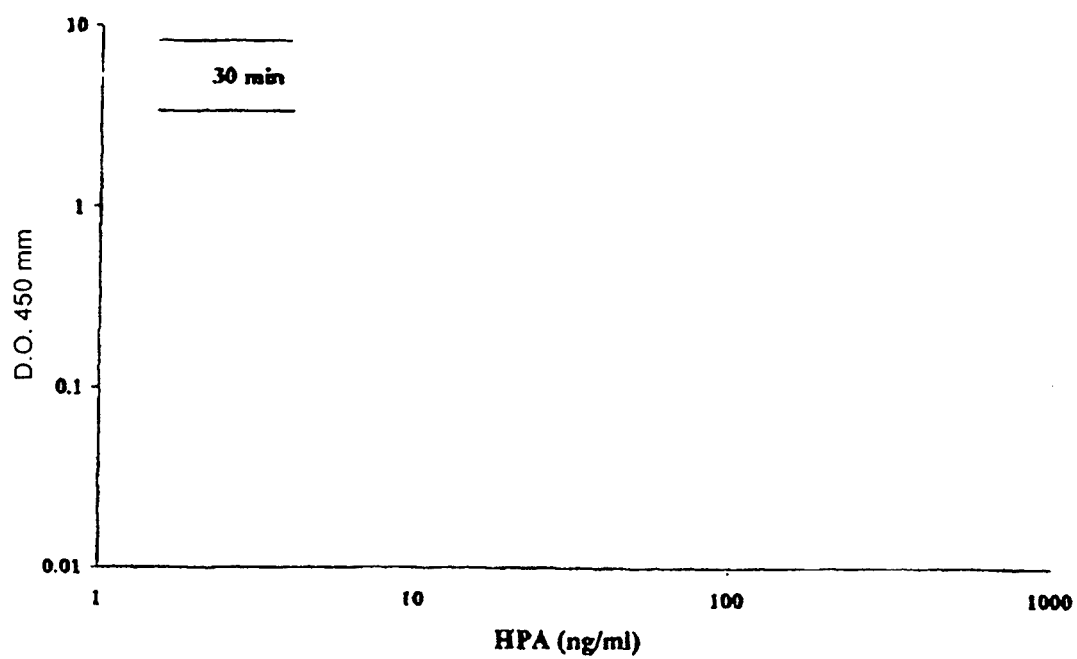
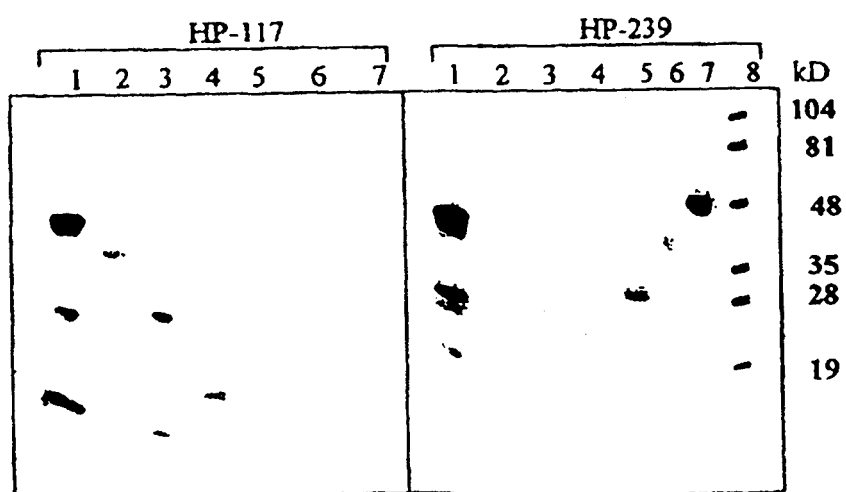


FIG. 25



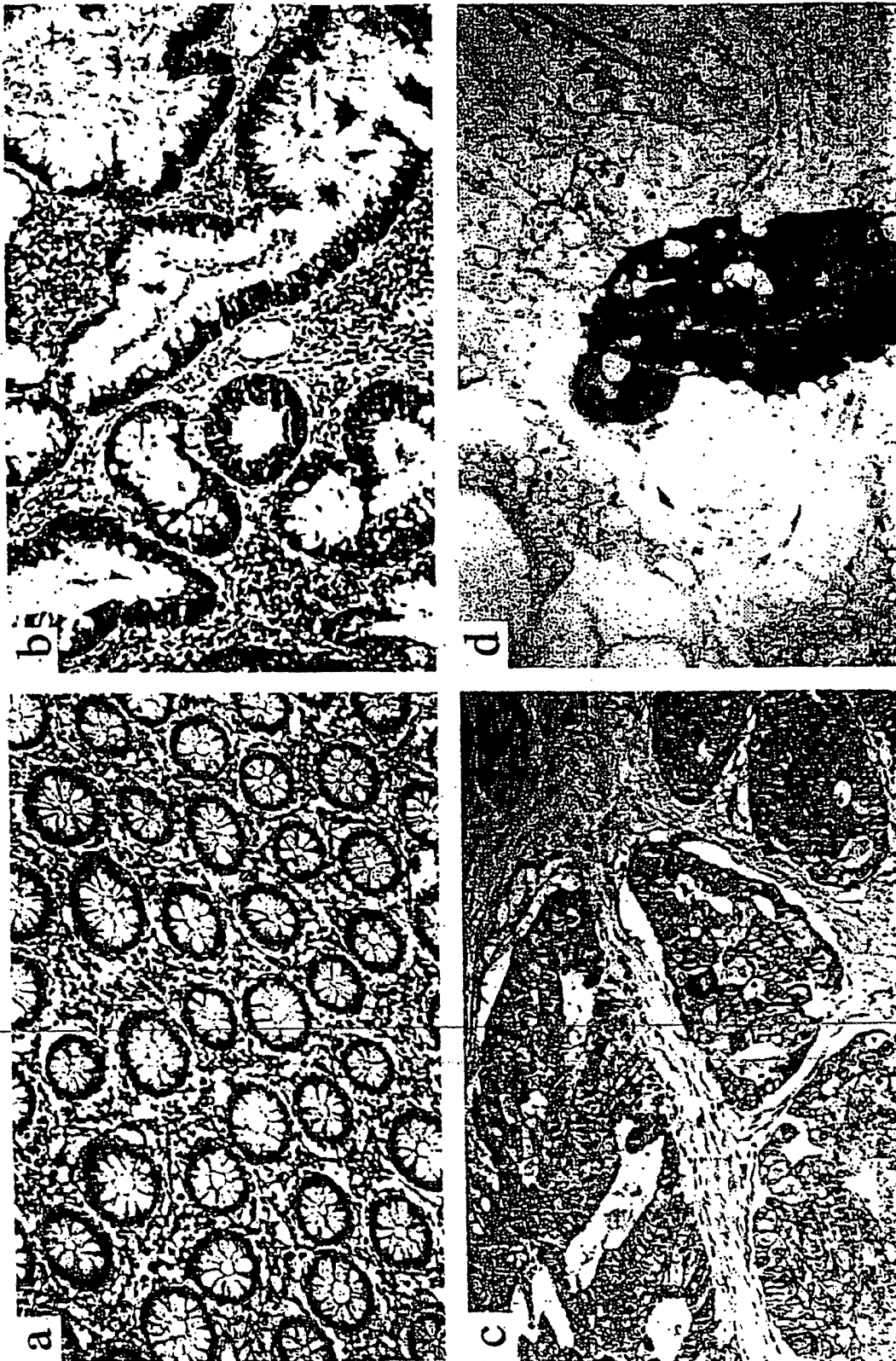


FIG. 26

ES 2 267 266 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTES: Iris Pecker *et al.*
- (ii) TÍTULO DE LA INVENCION: SONDAS MOLECULARES ESPECÍFICAS DE HEPARANASA Y USO DE LAS MISMAS EN APLICACIONES MÉDICAS Y DE INVESTIGACIÓN
- 10 (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 7
- (iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:
- (A) DIRECCIÓN: Mark M. Friedman c/o Anthony Castorina
- (B) CARRIL: 20001 Jefferson Davis Highway, Suite 207
- 15 (C) CIUDAD: Arlington
- (D) ESTADO: Virginia
- (E) PAÍS: ESTADOS UNIDOS
- 20 (F) CÓDIGO POSTAL: 22202
- (v) FORMULARIO DE LECTURA INFORMÁTICA:
- (A) TIPO DE MEDIO: 1,44 megabyte, 3,5" microdisk
- 25 (B) ORDENADOR: Twinhead® Slimnote-890TX
- (C) SISTEMA OPERATIVO: MS DOS versión 6.2,
Windows versión 3.11
- (D) SOFTWARE: Word para Windows versión 2.0 convertido en archivo ASCII
- 30 (vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
- (B) FECHA DE ARCHIVO:
- 35 (C) CLASIFICACIÓN:
- (vii) DATOS DE LA SOLICITUD PREVIA:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
- 40 (B) FECHA DE ARCHIVO:
- (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
- (B) FECHA DE ARCHIVO:
- 45 (viii) INFORMACIÓN DEL AGENTE/ABOGADO:
- (A) NOMBRE: Friedman, Mark M.
- (B) NÚMERO DE REGISTRO: 33.883
- (C) NÚMERO DE REFERENCIA/LISTA: 910/5
- 50 (ix) INFORMACIÓN TELEFÓNICA:
- (A) TELÉFONO: 972-3-5625553
- (B) TELEFAX: 972-3-5625554
- 55 (C) TELEX:

(2) INFORMACIÓN DEL ID. SEC. NÚM.: 1:

- 60 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 1721
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: doble
- 65 (D) TOPOLOGÍA: linear
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. NÚM.: 1:

ES 2 267 266 T3

```

CTAGAGCTTT CGACTCTCCG CTGGCGGGCA GCTGGCGGGG GGAGCAGCCA GGTGAGCCCA 60
AGATGCTGCT GCGCTCGAAG CCTGCGCTGC GCGCGCGGCT GATGCTGCTG CTCTGGGGC 120
CGCTGGGTCC CCTCTCCCTT GCGCGCCTGC CCGGACCTGC GCAAGCACAG GACGTGCTGG 180
ACCTGGACTT CTTCACCCAG GAGCCGCTGC ACCTGGTCAG CCGCTCGTTC CTGTCCGTCA 240
CCATTGACGC CAACCTGGCC ACGGACCGGC GGTTCCTCAT CTCTCTGGGT TCTCCAAAGC 300
TTGGTACCTT GGCAGAGGC TTGTCTCTG COTACCTGAG GTTGGTGGC ACCAAGACAG 360
ACTTCTTAAT TTTGATSCC AAGAAGGAAT CAACCTTTGA AGAGAGAAGT TACTGGCAAT 420
CTCAAGTCAA CCAAGATATT TGCATATATG GATCCATCCC TCCTGATGTG GAGGAGAAGT 480
TACGGTTGGA ATGGCCCTAC CAGGAGCAAT TOCTACTCCG AGAACACTAC CAGAAAAAGT 540
TCAAGAACAG CACCTACTCA AGAAGCTCTG TAGATGTGCT ATACACTTTT GCAAACTGCT 600
CAGGACTGGA CTGTATCTTT GGCTAAATG CGTTATTAAG AACAGCAGAT TTGAGTGGG 660
ACAGTCTTAA TGCTCAGTTC CTCTGGACT ACTGCTCTTC CAGGGGGTAT AACATTTCTT 720
GGGAACTAGG CAATGAACCT AACAGTTTCC TTAAGAAGGC TGATATTTTC ATCAATGGGT 780
CGCAGTTAGG AGAAGATTAT ATTCAATTGC ATAAACTTCT AAGAAAAGTCC ACCTTCAAAA 840
ATGCAAAACT CTATGCTCTT GATGTTGGTC AGCCTCGAAG AAGACGGCT AAGATGCTGA 900

```

```

AGAGCTTCCT GAAGGCTGGT GGAGAAGTGA TTGATTCAAT TACATGGCAT CACTACTATT 960
TGAAATGACG GACTGCTACC AGGGAAGATT TTCTAAACCC TGATGTATTG GACATTTTAA 1020
TTTCATCTGT GCAAAAATT TTCCAGGTGG TTGAGAGCAC CAGGCTTGGC AAGAAGGTCT 1080
GGTTAGGAGA AACAGCTCT GCATATGGAG GCGGAGCGCC CTTCCTATCC GACACCTTTG 1140
CAGCTGGCTT TATGTGGCTG GATAAATTGG GCTGTGAGC CCGAATGGGA ATAGAAGTGG 1200
TGATGAGGCA AGTATTCTTT GAGCAGGAA ACTACCATTT AGTGGATGAA AACTTCGATC 1260
CTTTACCTGA TTATTGGCTA TCTCTTCTGT TCAAGAAATT GGTGGGCACC AAGGTGTIAA 1320
TGGCAAGCOT GCAAGGTTCA AAGAGNAGGA AGCTTCGAGT ATACCTTCAT TGCAACAACA 1380
TCGACAAATC AAGGTATAAA GAAAGGAGTT TAACTCTGTA TGCCATAAAC CTCCATAACG 1440
TCACCAAGTA CTGCGGTTA CCTATCCTT TTCTAACAA GCAAGTGGAT AAATACCCTC 1500
TAAGACCTTT GGGACCTCAT GGATTACTTT CCAATCTGT CCAACTCAAT GGTCTAATC 1560
TAAGATGGT GGATGATCAA ACCTTGCCAC CTTTAATGGA AAAACCTCTC CGGCCAGGAA 1620
GTTCACTGGG CTGCCAGCT TTTCATATA GTTTTTTGT GATAAGAAAT GCCAAGTTG 1680
CTGCTTGCAAT CTGAAAATAA AATATACTAG TCCTGACACT G 1721

```

(2) INFORMACIÓN DEL ID. SEC. NÚM.: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 543
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: linear

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. NÚM.: 2:

ES 2 267 266 T3

Met Leu Leu Arg Ser Lys Pro Ala Leu Pro Pro Pro Leu Met Leu Leu
 5 5 10 15
 Leu Leu Gly Pro Leu Gly Pro Leu Ser Pro Gly Ala Leu Pro Arg Pro
 20 25 30
 Ala Gln Ala Gln Asp Val Val Asp Leu Asp Phe Phe Thr Gln Glu Pro
 35 40 45
 Leu His Leu Val Ser Pro Ser Phe Leu Ser Val Thr Ile Asp Ala Asn
 50 55 60
 Leu Ala Thr Asp Pro Arg Phe Leu Ile Leu Leu Gly Ser Pro Lys Leu
 65 70 75 80
 Arg Thr Leu Ala Arg Gly Leu Ser Pro Ala Tyr Leu Arg Phe Gly Gly
 85 90 95
 Thr Lys Thr Asp Phe Leu Ile Phe Asp Pro Lys Lys Glu Ser Thr Phe
 100 105 110
 Glu Glu Arg Ser Tyr Trp Gln Ser Gln Val Asn Gln Asp Ile Cys Lys
 115 120 125
 Tyr Gly Ser Ile Pro Pro Asp Val Glu Glu Lys Leu Arg Leu Glu Trp
 130 135 140
 Pro Tyr Gln Glu Gln Leu Leu Leu Arg Glu His Tyr Gln Lys Lys Phe
 145 150 155 160
 Lys Asn Ser Thr Tyr Ser Arg Ser Ser Val Asp Val Leu Tyr Thr Phe
 165 170 175
 Ala Asn Cys Ser Gly Leu Asp Leu Ile Phe Gly Leu Asn Ala Leu Leu
 180 185 190
 Arg Thr Ala Asp Leu Gln Trp Asn Ser Ser Asn Ala Gln Leu Leu Leu
 195 200 205
 Asp Tyr Cys Ser Ser Lys Gly Tyr Asn Ile Ser Trp Glu Leu Gly Asn
 210 215 220
 Glu Pro Asn Ser Phe Leu Lys Lys Ala Asp Ile Phe Ile Asn Gly Ser
 225 230 235 240
 Gln Leu Gly Glu Asp Tyr Ile Gln Leu His Lys Leu Leu Arg Lys Ser
 245 250 255
 Thr Phe Lys Asn Ala Lys Leu Tyr Gly Pro Asp Val Gly Gln Pro Arg
 260 265 270
 Arg Lys Thr Ala Lys Met Leu Lys Ser Phe Leu Lys Ala Gly Gly Glu

ES 2 267 266 T3

275 280 285
 Val Ile Asp Ser Val Thr Trp His His Tyr Tyr Leu Asn Gly Arg Thr
 290 295 300
 Ala Thr Arg Glu Asp Phe Leu Asn Pro Asp Val Leu Asp Ile Phe Ile
 305 310 315 320
 Ser Ser Val Gln Lys Val Phe Gln Val Val Glu Ser Thr Arg Pro Gly
 325 330 335
 Lys Lys Val Trp Leu Gly Glu Thr Ser Ser Ala Tyr Gly Gly Gly Ala
 340 345 350
 Pro Leu Leu Ser Asp Thr Phe Ala Ala Gly Phe Met Trp Leu Asp Lys
 355 360 365
 Leu Gly Leu Ser Ala Arg Met Gly Ile Glu Val Val Met Arg Gln Val
 370 375 380
 Phe Phe Gly Ala Gly Asn Tyr His Leu Val Asp Glu Asn Phe Asp Pro
 385 390 395 400
 Leu Pro Asp Tyr Trp Leu Ser Leu Leu Phe Lys Lys Leu Val Gly Thr
 405 410 415
 Lys Val Leu Met Ala Ser Val Gln Gly Ser Lys Arg Arg Lys Leu Arg
 420 425 430
 Val Tyr Leu His Cys Thr Asn Thr Asp Asn Pro Arg Tyr Lys Glu Gly
 435 440 445
 Asp Leu Thr Leu Tyr Ala Ile Asn Leu His Asn Val Thr Lys Tyr Leu
 450 455 460
 Arg Leu Pro Tyr Pro Phe Ser Asn Lys Gln Val Asp Lys Tyr Leu Leu
 465 470 475 480
 Arg Pro Leu Gly Pro His Gly Leu Leu Ser Lys Ser Val Gln Leu Asn
 485 490 495
 Gly Leu Thr Leu Lys Met Val Asp Asp Gln Thr Leu Pro Pro Leu Met
 500 505 510
 Glu Lys Pro Leu Arg Pro Gly Ser Ser Leu Gly Leu Pro Ala Phe Ser
 515 520 525
 Tyr Ser Phe Phe Val Ile Arg Asn Ala Lys Val Ala Ala Cys Ile
 530 535 540 543

45 (2) INFORMACIÓN DEL ID. SEC. NÚM.: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 1721
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: doble
- (D) TOPOLOGÍA: linear

55 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. NÚM.: 3:

60

65

ES 2 267 266 T3

[illegible]

ES 2 267 266 T3

ACC TTC AAA AAT GCA AAA CTC TAT GGT CCT GAT GTT GGT CAG CCT CGA 878
 Thr Phe Lys Asn Ala Lys Leu Tyr Gly Pro Asp Val Gly Gln Pro Arg
 260 265 270
 5
 AGA AAG ACC GGT AAG ATG GTG AAG AGC TTC CTG AAG GGT GGT GGA GAA 926
 Arg Lys Thr Ala Lys Met Leu Lys Ser Phe Leu Lys Ala Gly Gly Glu
 275 280 285
 10
 GTG ATT GAT TCA GTT ACA TGG CAT CAC TAC TAT TTG AAT GGA CGG ACT 974
 Val Ile Asp Ser Val Thr Trp His His Tyr Tyr Leu Asn Gly Arg Thr
 290 295 300
 15
 GCT ACC AGG GAA GAT TTT CTA AAC CCT GAT GTA TTG GAC ATT TTT ATT 1022
 Ala Thr Arg Glu Asp Phe Leu Asn Pro Asp Val Leu Asp Ile Phe Ile
 305 310 315 320
 20
 TCA TCT GTG CAA AAA GTT TTC CAG GTG GTT GAG AGC ACC AGG CCT GGC 1070
 Ser Ser Val Gln Lys Val Phe Gln Val Val Glu Ser Thr Arg Pro Gly
 325 330 335
 25
 AAG AAG GTC TGG TTA GGA GAA ACA AGC TCT GCA TAT GGA GGC GGA GCG 1118
 Lys Lys Val Trp Leu Gly Glu Thr Ser Ser Ala Tyr Gly Gly Gly Ala
 340 345 350
 30
 CCC TTG CTA TCC GAC ACC TTT GCA GCT GGC TTT ATG TGG CTG GAT AAA 1166
 Pro Leu Leu Ser Asp Thr Phe Ala Ala Gly Phe Met Trp Leu Asp Lys
 355 360 365
 35
 TTG GGC CTG TCA GCC CGA ATG GGA ATA GAA GTG GTG ATG AGG CAA GTA 1214
 Leu Gly Leu Ser Ala Arg Met Gly Ile Glu Val Val Met Arg Gln Val
 370 375 380
 40
 TTC TTT GGA GCA GGA AAC TAC CAT TTA GTG GAT GAA AAC TTC GAT CCT 1262
 Phe Phe Gly Ala Gly Asn Tyr His Leu Val Asp Glu Asn Phe Asp Pro
 385 390 395 400
 45
 TTA CCT GAT TAT TGG CTA TCT CTT CTG TTC AAG AAA TTG GTG GGC ACC 1310
 Leu Pro Asp Tyr Trp Leu Ser Leu Leu Phe Lys Lys Leu Val Gly Thr
 405 410 415
 50
 AAG GTG TTA ATG GCA AGC GTG CAA GGT TCA AAG AGA AGG AAG CTT CGA 1358
 Lys Val Leu Met Ala Ser Val Gln Gly Ser Lys Arg Arg Lys Leu Arg
 420 425 430
 55
 GTA TAC CTT CAT TGC ACA AAC ACT GAC AAT CCA AGG TAT AAA GAA GGA 1406
 Val Tyr Leu His Cys Thr Asn Thr Asp Asn Pro Arg Tyr Lys Glu Gly
 435 440 445
 60
 GAT TTA ACT CTG TAT GCC ATA AAC CTC CAT AAC GTC ACC AAG TAC TTG 1454
 Asp Leu Thr Leu Tyr Ala Ile Asn Leu His Asn Val Thr Lys Tyr Leu
 450 455 460
 65
 CGG TTA CCC TAT CCT TTT TCT AAC AAG CAA GTG GAT AAA TAC CTT CTA 1502
 Arg Leu Pro Tyr Pro Phe Ser Asn Lys Gln Val Asp Lys Tyr Leu Leu
 465 470 475 480
 70
 AGA CCT TTG GGA CCT CAT GGA TTA CTT TCC AAA TCT GTC CAA CTC AAT 1550
 Arg Pro Leu Gly Pro His Gly Leu Leu Ser Lys Ser Val Gln Leu Asn
 485 490 495
 75
 GGT CTA ACT CTA AAG ATG GTG GAT GAT CAA ACC TTG CCA CCT TTA ATG 1598
 Gly Leu Thr Leu Lys Met Val Asp Asp Gln Thr Leu Pro Pro Leu Met
 500 505 510
 80
 GAA AAA CCT CTC CGG CCA GGA AGT TCA CTG GGC TTG CCA GCT TTC TCA 1646
 Glu Lys Pro Leu Arg Pro Gly Ser Ser Leu Gly Leu Pro Ala Phe Ser
 515 520 525
 85
 TAT AGT TTT TTT GTG ATA AGA AAT GCC AAA GTT GCT GCT TGC ATC TGA 1694
 Tyr Ser Phe Phe Val Ile Arg Asn Ala Lys Val Ala Ala Cys Ile
 530 535 540 543
 90
 AAA TAA AAT ATA CTA GTC CTG ACA CTG 1721

ES 2 267 266 T3

(2) INFORMACIÓN DEL ID. SEC. NÚM.: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 26
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: linear

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. NÚM.: 4:

CGCATATGCA GGACGTCGTG GACCTG

26

(2) INFORMACIÓN DEL ID. SEC. NÚM.: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 24
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: linear

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. NÚM.: 5:

TATGATCCTC TAGTACTTCT CGAC

24

(2) INFORMACIÓN DEL ID. SEC. NÚM.: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 23
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: linear

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. NÚM.: 6:

TTCGATCCCA AGAAGGAATC AAC

23

(2) INFORMACIÓN DEL ID. SEC. NÚM.: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 24
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: linear

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. NÚM.: 7:

GTAGTGATGC CATGTAACTG AATC

24