



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 349 162**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**C12N 15/12** (2006.01)

**C12P 21/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03739341 .0**

96 Fecha de presentación : **28.06.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1572931**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.09.2005**

54

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

30

Prioridad: **29.06.2002 US 392652 P**  
**06.09.2002 US 408739 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**28.12.2010**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**28.12.2010**

73

Titular/es: **GENENTECH, Inc.**  
**1 DNA Way**  
**South San Francisco, California 94080-4, US**

72

Inventor/es: **Desnoyer, Luc y**  
**Filvaroff, Ellen**

74

Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 349 162 T3

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

**Descripción****Campo de la invención**

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

**Antecedentes de la invención**

10 [0002] El factor de crecimiento de tejido conjuntivo (CTGF) es un factor de crecimiento inducido en fibroblastos por muchos factores que incluyen TGF- $\beta$ , y es esencial para la capacidad de TGF- $\beta$  para inducir crecimiento independiente de anclaje (AIG), una propiedad de células transformadas. El CTGF también es mitogénico y quimiotáctico para las células, y de ahí que se crea que los factores de crecimiento  
15 pertenecientes a esta familia desempeñan una función en el desarrollo, crecimiento y reparación normales del tejido humano. Se han aislado, clonado, secuenciado y caracterizado como pertenecientes a la familia de genes CCN cinco proteínas relacionadas con CTGF que incluyen Cyr61, Nov, WISP-1, WISP2 y WISP-3. Oemar y Luescher, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 17: 1483-1489 (1997); Brigstock, Endocrine Rev., 20:189-206 (1999). Se ha encontrado que el gen que codifica Cyr61 promueve la angiogénesis, el crecimiento tumoral y la vascularización. Babic y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 6355-6360 (1998). El gen nov se expresa en el riñón, esencialmente en la fase embrionaria, y se han detectado alteraciones de la expresión de nov con respecto al riñón normal tanto en nefroblastomas aviares como en tumores  
20 de Wilms humanos. Martinerie y col., Oncogene, 9: 2729-2732 (1994). Wtl regula por defecto la expresión de nov humana, regulación por defecto que puede representar un elemento clave en la nefrogénesis normal y tumoral. Martinerie y col., Oncogene, 12: 1479-1492 (1996).

[0003] Los diferentes miembros de la familia CCN interactúan con diversas  
30 macromoléculas solubles o asociadas a la matriz en glicoconjugados sulfatados particulares (Bork, FEBS Letters, 327:125-130). Esta interacción se usó para purificar Cyr61 y CTGF por cromatografía de afinidad en heparina-agarosa (Frazier y col., J. Invest. Dermatol., 107:404-411 (1996); Kireeva y col., Mol. Cell. Biol., 16:1326-1334 (1996)). Cyr61 es secretado y se asocia tanto a la matriz extracelular como a la  
35 superficie celular debido a su afinidad por el sulfato de heparano (Yang y col., Cell.

Growth Diff., 2: 351-357 (1991)). Recientemente se mostró que WISP-1 interactuaba con decorina y biglicano, dos proteoglicanos de sulfato de dermatano secretados. (Desnoyers, y col., J. Biol. Chem., 276:97599-97607 (2001)).

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

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

**[0006]** El proto-oncogén *Wnt-1* (*int-1*) se identificó originalmente a partir de  
tumores mamarios inducidos por el virus del tumor mamario de ratón (MMTV) debido  
a una inserción de la secuencia de ADN viral. Nusse y Varmus, Cell, 31: 99-109  
30 (1982). En ratones adultos, el nivel de expresión de ARNm de *Wnt-1* se detecta sólo en  
los testículos durante etapas tardías del desarrollo de esperma. La proteína Wnt-1 tiene  
aproximadamente 42 KDa y contiene una región hidrófoba en el extremo amino que  
puede funcionar como una secuencia señal para la secreción (Nusse y Varmus,  
anteriormente, 1992). La expresión de *Wnt-2* se detecta en tejidos fetales y adultos de  
35 ratón y su distribución no se solapa con el patrón de expresión de Wnt-1. *Wnt-3* está

asociado a tumorigénesis mamaria de ratón. La expresión de Wnt-3 en embriones de ratón se detecta en los tubos neurales y en las yemas de las extremidades. Las transcripciones de *Wnt-5a* se detectan en las extremidades delanteras y traseras en desarrollo a los 9,5 a 14,5 días y los mayores niveles se concentran en ectodermo apical en la punta distal de las extremidades. Nusse y Varmus, anteriormente (1992). Recientemente se ha descrito un factor de crecimiento de Wnt, llamado Wnt-x, (documento WO95/17416) junto con la detección de la expresión de *Wnt-x* en tejidos óseos y en células derivadas de hueso. Por tanto, se describió la función de Wnt-x en el mantenimiento de osteoblastos maduros y el uso del factor de crecimiento Wnt-x como agente terapéutico o en el desarrollo de otros agentes terapéuticos para tratar enfermedades relacionadas con los huesos.

**[0007]** Los Wnt pueden desempeñar una función en la señalización local de células. Peifer y Polakis, Science, 287:1606-1609 (2000). Los estudios bioquímicos han demostrado que gran parte de la proteína Wnt secretada puede encontrarse asociada a la superficie celular o matriz extracelular en vez de libremente difusible en el medio. Papkoff y Schryver, Mol. Cell. Biol., 10: 2723-2730 (1990); Bradley y Brown, EMBO J., 9: 1569-1575 (1990).

**[0008]** Los estudios de mutaciones en genes *Wnt* han indicado una función para los Wnt en el control del crecimiento y el diseño de tejido. En *Drosophila*, wingless (wg) codifica un gen relacionado con Wnt (Rijsewik y col., Cell, 50: 649-657 (1987)) y mutaciones de wg alteran el patrón de ectodermo embrionario, neurogénesis y excrecencia de disco imaginal. Morata y Lawrence, Dev. Biol., 56: 227-240 (1977); Baker, Dev. Biol., 125: 96-108 (1988); Klingensmith y Nusse, Dev. Biol., 166: 396-414 (1994). En *Caenorhabditis elegans*, lin-44 codifica un homólogo de Wnt necesario para las divisiones de células asimétricas. Herman y Horvitz, Development, 120: 1035-1047 (1994). Las mutaciones de genes inactivados en ratones han demostrado que los Wnt son esenciales para el desarrollo cerebral (McMahon y Bradley, Cell, 62: 1073-1085 (1990); Thomas y Cappechi, Nature, 346: 847-850 (1990)), y la excrecencia de primordios embrionarios para riñón (Stark y col., Nature, 372: 679-683 (1994)), yema de la cola (Takada y col., Genes Dev., 8: 174-189 (1999)) y yema de las extremidades. Parr y McMahon, Nature, 374: 350-353 (1995). La expresión en exceso de *Wnt-1* en la glándula mamaria puede dar como resultado hiperplasia mamaria (McMahon, anteriormente (1992); Nusse y Varmus, anteriormente (1992)), desarrollo alveolar precoz (Bradbury y col., Dev. Biol., 170: 553-563 (1995)) y adenocarcinomas mamarios (Li y col., Oncogene, 19:1002-1009 (2000)).

**[0009]** *Wnt-5a* y *Wnt-5b* se expresan en el mesodermo posterior y lateral y el mesodermo extraembrionario del embrión murino de 7-8 días. Gavin y col., anteriormente (1990). Estos dominios embrionarios contribuyen a la región AGM y tejidos de saco vitelino de los que se derivan precursores hematopoyéticos multipotentes y HSC. Dzierzak y Medvinsky, Trends Genet., 11: 359-366 (1995); Zon y col., en Gluckman y Coulombel, ed., Colloque, INSERM, 235: 17-22 (1995), presentado en the Joint International Workshop on Foetal and Neonatal Hematopoiesis and Mechanism of Bone Marrow Failure, París, Francia, 3-6 de abril de 1995; Kanatsu y Nishikawa, Development, 122: 823-830 (1996). Se han detectado *Wnt-5a*, *Wnt-10b* y otros *Wnt* en yemas de las extremidades que indica posibles funciones en el desarrollo y el diseño del microentorno óseo temprano como se muestra para *Wnt-7b*. Gavin y col., anteriormente (1990); Christiansen y col., Mech. Devel., 51: 341-350 (1995); Parr y McMahon, anteriormente (1995).

**[0010]** Para una revisión sobre Wnt véase Cadigan y Nusse, Genes & Dev., 11: 3286-3305 (1997).

**[0011]** Pennica y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 95:14717-14722 (1998) describen la clonación y caracterización de dos genes, *WISP-1* y *WISP-2*, que están regulados por exceso en la línea celular epitelial mamaria de ratón C57MG transformada por *Wnt-1*, y un tercer gen relacionado, *WISP-3*. (Véanse también el documento WO 99/21998 publicado el 6 de mayo de 1999; el documento WO 99/21999 publicado el 6 de mayo de 1999). Pennica y col. informan que estos genes *WISP* pueden estar aguas debajo de la señalización de *Wnt-1* y que niveles anómalos de la expresión de *WISP* en cáncer de colon pueden desempeñar una función en tumorigénesis de colon. *WISP-1* se ha identificado recientemente como un gen regulado por  $\beta$ -catenina y la caracterización de su actividad oncogénica demostró que *WISP-1* puede contribuir a la tumorigénesis mediada por  $\beta$ -catenina (Xu y col., Gene Develop., 14:585-595 (2000)). La expresión en exceso de *WISP-1* en células de riñón de rata normal (NRK-49F) indujo transformación morfológica, crecimiento celular acelerado y densidad de saturación potenciada. Además, estas células forman fácilmente tumores cuando se inyectan en ratones atímicos sugiriendo que *WISP-1* puede desempeñar alguna función en la tumorigénesis (Xu y col., anteriormente, 2000). *WISP-1* también está expresada en exceso en líneas celulares de cáncer de mama humano transformadas y en aproximadamente el 47% de cáncer de mama humano primario asociado a ciertas características avanzadas. Xie y col., Cancer Res., 61:8917-8923 (2001); Saxena y col., Mol. Cell Biochem., 228:99-104 (2001); Michaelson y col., Oncogene, 20:5093-5099

(2001). También se ha informado que una variante de WISP-1 se expresa en exceso en aproximadamente el 86% de células de carcinoma gástrico escirroso humano. Tanaka y col., *Oncogene*, 20:5525-5532 (2001).

**[0012]** Hurvitz y col., *Nature Genetics*, 23:94-97 (1999) describen un estudio en el que participa *WISP3* en el que se encontró que nueve mutaciones diferentes de *WISP3* en individuos sin parentesco estaban asociadas a un trastorno esquelético recesivo autosómico, la displasia pseudorreumatoide progresiva (PPD). La expresión de *WISP3* por RT-PCR fue observada por Hurvitz y col. en sinoviocitos humanos, condrocitos de cartílago articular y células progenitoras mesenquimatosas derivadas de médula ósea.

10 **[0013]** La solicitud PCT WO98/2123 publicada el 22 de mayo de 1998 desvela un gen 3 del factor de crecimiento del tejido conjuntivo humano (CTGF-3) que codifica un miembro de 26 kD perteneciente a la superfamilia del factor de crecimiento. El documento WO98/21236 desvela que la secuencia de aminoácidos de CTGF-3 se dedujo a partir de un clon de ADNc de osteoblasto humano y que CTGF-3 se expresó  
15 en múltiples tejidos como ovario, testículo, corazón, pulmón, músculo esquelético, médula adrenal, corteza adrenal, timo, próstata, intestino delgado y colon.

**[0014]** El ácido hialurónico (también denominado en lo sucesivo HA, hialuronato o hialuronano) es reconocido en la bibliografía como un componente importante de la matriz extracelular (véanse, por ejemplo, Hardingham y col., *FASEB J.*, 6:861-870  
20 (1992); Laurent y col., *FASEB J.*, 6:2397-2404 (1992)). El HA es un componente de la piel y tejidos mesenquimatosos en el que se facilita la migración de células durante la cicatrización, inflamación y morfogénesis embrionaria. (Knudson y col., *FASEB J.*, 7:1233-1241 (1993); Knudson y col., *CIBA Found. Symp.*, 143:150-169 (1989)). También se ha informado que el HA desempeña una función en ciertos tipos de  
25 metástasis. (Naor y col., *CD44: Structure, Function and Association with the Malignant Process*, *Advances in Cancer Research*, Academic Press (1997), páginas 241-319). Las mayores concentraciones de HA se encuentran en la piel y el sistema musculoesquelético que representan más del 50% del HA total del cuerpo. (Banerji y col., *J. Cell Biol.*, 144:789-801 (1999)).

30 **[0015]** Diversos investigadores han informado de receptores que se unen a HA. Uno de los receptores identificados para HA es la proteína CD44. (Véanse, por ejemplo, Culty y col., *J. Cell Biology*, 111:2765-2774 (1990); Aruffo y col., *Cell*, 61:1303-1313 (1990); Naor y col., *CD44: Structure, Function and Association with the Malignant Process*, *Advances in Cancer Research*, Academic Press (1997), páginas  
35 241-319); Ropponen y col., *Cancer Res.*, 58:342-347 (1998); Masaki y col., *Cancer*,

92:2539-2546 (2001). CD44 es una familia de glicoproteínas de la superficie de la célula generada a partir de un único gen por corte y empalme alternativo y glicosilación diferencial. (Wielenga y col., Am. J. Pathology, 154:515-523 (1999)). Se cree que CD44 funciona como un receptor de adhesión a células, uniendo las  
 5 moléculas extracelulares, específicamente hialuronato, a la célula y el citoesqueleto (Wielenga y col., anteriormente). CD44 se expresa en células epiteliales, mesenquimatosas y linfoides. (Lesley y col., Adv. Immunol., 54:271-335 (1994)). Wielenga y col. informan que la expresión de CD44 puede regularse por la ruta de WNT basándose en ciertos experimentos que analizan la expresión de CD44 en la  
 10 mucosa intestinal de ratones y seres humanos con defectos genéticos tanto en APC como en *Tcf-4*. (Wielenga y col., anteriormente).

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

**[0017]** Otro receptor que se une a HA fue descrito por Banerji y col. (Banerji y col., anteriormente). Banerji y col. informan de un receptor en las paredes de los vasos linfáticos, denominado en lo sucesivo "LYVE-1", que es un polipéptido de la membrana integral de tipo I de 322 restos que tiene una similitud del 41% con el receptor CD44. A diferencia del receptor CD44 para HA, la proteína LYVE-1 está ausente en vasos sanguíneos. Además, la layilina (Bono y col., Mol. Biol. Cell.  
 20 12:891-900 (2001)) y HARE (Zhou y col., J. Biol. Chem., 275:37733-37741 (2000)) también se describieron como receptores de HA.

#### Resumen de la invención

**[0018]** El solicitante ha encontrado sorprendentemente que WISP-1 puede inducir la expresión de ARNm de HAS2 (hialuronano sintasa 2), CD44 y RHAMM, síntesis  
 30 de proteína CD44 y secreción de HA. La inducción o secreción de tales moléculas pueden promover o aumentar el crecimiento de células cancerosas, la motilidad y/o el potencial metastásico. Por tanto, la presente invención se refiere a antagonistas de WISP-1 y a procedimientos de uso de tales antagonistas. Los antagonistas descritos en este documento encuentran utilidad para, entre otras cosas, diagnóstico *in vitro*, *in situ*  
 35 o *in vivo* o tratamiento de células cancerosas de mamífero u otras afecciones

patológicas asociadas a la inducción o secreción de HAS2, HA, CD44 o RHAMM.

**[0019]** En realizaciones de la invención se proporcionan usos médicos de antagonistas de WISP-1 aislados que son anticuerpos de WISP-1 que bloquean o neutralizan la inducción por WISP-1 o la secreción de HAS2, HA, CD44 o RHAMM como se define en las reivindicaciones. Tales anticuerpos antagonistas pueden ser, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Los procedimientos contemplan el uso de un único tipo de molécula antagonista o una combinación de dos o más tipos de antagonistas.

**[0020]** Los usos médicos de la invención incluyen el uso de anticuerpos antagonistas de WISP-1 para la preparación de un medicamento para procedimientos para tratar afecciones o enfermedades patológicas en mamíferos asociadas a o resultantes de WISP-1 que incluyen inducción o secreción de HAS2, HA, CD44 o RHAMM por WISP-1 como se define en las reivindicaciones. En los procedimientos de tratamiento, los antagonistas de WISP-1 pueden administrarse al mamífero que padece tal afección o dolencia patológica. Por ejemplo, la invención proporciona un procedimiento *in vitro* que comprende exponer una célula(s) de mamífero, que es una célula(s) cancerosa(s), a uno o más antagonistas de WISP-1 en una cantidad eficaz para disminuir, neutralizar o bloquear la inducción por WISP-1 o la secreción de HAS2, HA, CD44 o RHAMM y usos médicos correspondientes como se definen en las reivindicaciones. La célula puede estar en cultivo celular o en un mamífero que padece cáncer.

**[0021]** La invención también se refiere al uso de composiciones que comprenden uno o más antagonistas de WISP-1 como se define en las reivindicaciones. Opcionalmente, las composiciones incluirán vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Preferentemente, las composiciones incluirán uno o más antagonistas de WISP-1 en una cantidad que es terapéuticamente eficaz para tratar una afección o enfermedad patológica.

**[0022]** En este documento también se describen artículos de fabricación y kits que incluyen uno o más antagonistas de WISP-1.

**[0023]** En este documento también se describen procedimientos para realizar ensayos de cribado para identificar moléculas candidatas tales como compuestos de moléculas pequeñas, polipéptidos o anticuerpos que actúan de antagonistas con respecto al bloqueo o la neutralización de la inducción por WISP-1 o secreción de HAS2, HA, CD44 o RHAMM.

**[0024]** Más realizaciones particulares de la invención incluyen usos médicos de

antagonistas de WISP-1 aislados que inhiben o neutralizan la inducción o secreción de HAS2, HA, CD44 o RHAMM por polipéptido WISP-1 natural en al menos un tipo de célula cancerosa mamífera, siendo dicho antagonista un anticuerpo dirigido contra WISP-1. El antagonista puede comprender un anticuerpo dirigido contra WISP-1 que se une a polipéptidos WISP-1 humanos naturales que comprenden los aminoácidos 23-367 de las Figuras 9A-9C o uno o más dominios de WISP-1 que comprenden los aminoácidos codificados por las secuencias de SEQ ID NO:3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; u 11 en este documento. El anticuerpo dirigido contra WISP-1 puede ser un anticuerpo quimérico, humanizado o humano.

10 **[0025]** La invención también se refiere a procedimientos para inhibir o neutralizar la inducción por WISP-1 o secreción de HAS2, HA, CD44 o RHAMM en células cancerosas de mamífero que comprenden exponer dicha célula de mamífero a una cantidad eficaz de antagonista de WISP-1, en los que dicho antagonista de WISP-1 es un anticuerpo de WISP-1. Los anticuerpos dirigidos contra WISP-1 empleados en los procedimientos pueden unirse al WISP-1 humano natural que comprende los aminoácidos 23-367 de las Figuras 9A-9C, o uno o más de los dominios de WISP-1 descritos en los ejemplos siguientes. En los procedimientos, las células de mamífero comprenden células cancerosas, y opcionalmente las células comprenden células de cáncer de colon o colorrectal, células de cáncer de mama, células de cáncer de pulmón o células de cáncer de cerebro (tal como glioma o glioblastoma).

**[0026]** En otras realizaciones se proporcionan usos médicos que se refieren a procedimientos para tratar cáncer en un mamífero como se definen en las reivindicaciones que comprenden administrar a dicho mamífero una cantidad eficaz de antagonista de WISP-1, en los que el antagonista inhibe o neutraliza la inducción o secreción de HAS2, HA, CD44 o RHAMM por polipéptido WISP-1 humano natural en al menos un tipo de célula de mamífero y dicho antagonista es un anticuerpo dirigido contra WISP-1. El antagonista puede actuar para inhibir la metástasis de células cancerosas. El cáncer en el mamífero puede comprender células de cáncer de colon o colorrectal, células de cáncer de mama, células de cáncer de pulmón o células de cáncer de cerebro (tal como glioma o glioblastoma). Opcionalmente, el (los) antagonista(s) empleados(s) en los procedimientos inhibe(n) o reduce(n) el crecimiento o la metástasis de células cancerosas. Por tanto, en los procedimientos, la quimioterapia, la radiación, el profármaco, el agente citotóxico, el agente inhibidor del crecimiento o la citocina también pueden administrarse al mamífero.

35 **[0027]** En realizaciones particulares adicionales se proporcionan usos médicos de

anticuerpos que se unen específicamente a uno o más dominios de polipéptido WISP-1 (descrito adicionalmente en los ejemplos más adelante) que comprende los aminoácidos codificados por las secuencias de SEQ ID NO:3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; u 11 en este documento. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

5 Opcionalmente, el anticuerpo monoclonal comprende el anticuerpo 3D11, 11C2, 9C10, 5D4 o 9C11 secretado por el hibridoma depositado con el número de registro de ATCC PTA-4624, PTA-4628, PTA-4626, PTA-4625 o PTA-4627, respectivamente.

**[0028]** Por tanto, se proporcionan usos médicos de anticuerpos que se unen al mismo epítipo que el epítipo al que se une el anticuerpo monoclonal 3D11, 11C2, 10 9C10, 5D4 o 9C11 producido por la línea celular de hibridoma depositada con el número de registro de ATCC PTA-4624, PTA-4628, PTA-4626, PTA-4625, o PTA-4627, respectivamente.

**[0029]** En este documento también se describe la línea celular de hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal 3D11, 11C2, 9C10, 5D4 o 9C11 y se deposita con el 15 número de registro de ATCC PTA-4624, PTA-4628, PTA-4626, PTA-4625 o PTA-4627, respectivamente, y el anticuerpo monoclonal 3D11, 11C2, 9C10, 5D4 o 9C11 secretado por el hibridoma depositado con el número de registro de ATCC PTA-4624, PTA-4628, PTA-4626, PTA-4625 o PTA-4627, respectivamente.

**[0030]** En este documento también se describen anticuerpos monoclonales 20 dirigidos contra WISP-1 aislados que comprenden anticuerpos que se unen al polipéptido WISP-1 e inhiben competitivamente la unión del anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma depositado con el n° de registro de ATCC PTA-4624, PTA-4628, PTA-4626, PTA-4625 o PTA-4627 a dicho polipéptido WISP-1.

**[0031]** También se proporcionan usos médicos de anticuerpos dirigidos contra 25 WISP-1 quiméricos o humanizados que se unen específicamente al polipéptido WISP-1 y comprenden (a) una secuencia derivada del anticuerpo 3D11, 11C2, 9C10, 5D4 o 9C11 secretado por el hibridoma depositado con el número de registro de ATCC PTA-4624, PTA-4628, PTA-4626, PTA-4625 o PTA-4627, respectivamente, como se define en las reivindicaciones. Tales anticuerpos pueden comprender una cadena pesada, 30 cadena ligera o regiones variables derivadas del anticuerpo 3D11, 11C2, 9C10, 5D4 o 9C11.

**[0032]** Los anticuerpos dirigidos contra WISP-1 pueden ligarse a uno o más polímeros no proteináceos seleccionados del grupo que está constituido por polietilenglicol, polipropilenglicol, y polioxialquileno, o a un agente citotóxico o 35 enzima, o a un radioisótopo, compuesto fluorescente o compuesto quimioluminiscente.

**Breve descripción de los dibujos****[0033]**

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

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

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

Las Figuras 4A-4C muestran que la adición de WISP-1 induce la expresión de ARN de HAS2 y la migración haptotáctica de células NRK. A, Análisis

por RT-PCR en tiempo real de HAS2 y expresión de CD44 en células NRK sembradas sobre superficie recubierta. En ciertos casos, los sustratos recubiertos se incubaron adicionalmente con WISP-1 (tratamiento). Los resultados se facilitan en veces de inducción con respecto a la expresión en células NRK sembradas en placa sobre superficie sin tratar sin recubrir. La parte inferior de los filtros de la cámara de Boyden modificada se recubrieron y las células NRK (B) o las células SW480 (C) se añadieron a la cámara superior. En ciertos casos, las adiciones se hicieron directamente a la cámara inferior. La motilidad celular se evaluó contando las células que migraron al lado inferior del inserto.

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

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

Las Figuras 7A-7L muestran que la expresión de WISP-1 promueve la colonización de pulmón metastásico y el crecimiento de tumores. El efecto de WISP-1 se analizó inyectando células NRK/control, NRK/WISP-1L o NRK/WISP-1H en la vena de la cola de ratones atímicos. En varios momentos después de la inyección, los pulmones se sometieron a obtención

de imágenes por IRM (A, D, G, J), se extirparon y se registró su aspecto macroscópico (B, E, H, K) y las características histológicas (C, F, I, L). La gravedad de la invasión pulmonar por tumores se clasificó como normal (A, B, C); grado I (D, E, F); grado II (G, H, I) o grado III (J, K, L).

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

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

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

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

20 Las Figuras 12A-G muestran diagramas de diversos dominios del polipéptido WISP-1 y los resultados de ensayos realizados para identificar los epítomos reconocidos por los anticuerpos de WISP-1 11C2, 5D4, 9C11 y 3D11, respectivamente.

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

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

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

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

35 Las Figuras 17A-E muestran los resultados de un estudio *in vivo* de los efectos de anticuerpos de WISP-1. Después de 3 semanas, la gravedad de las lesiones encontradas en animales tratados con el anticuerpo de WISP-1 se

había atenuado enormemente en comparación con el control (Fig. 17 a, b). El número de nódulos y el área promedio de los focos metastásicos encontrados en ratones tratados con anticuerpos de WISP-1 (n=5) se redujeron en comparación con animales tratados con un anticuerpo de control (Fig. 17 c, d). El área pulmonar total cubierta por las lesiones se redujo un 82-97% en comparación con animales tratados con un anticuerpo isotipo de control (Fig. 17e).

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

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

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

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

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

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

**Descripción detallada de la invención****I. Definiciones**

**[0034]** El término "polipéptido WISP" se refiere a la familia de proteínas WISP humanas y de ratón de secuencia natural y a variantes descritas en este documento  
 5 cuyos genes se inducen al menos por Wnt-1. Este término incluye WISP-1 y variantes de la misma. Tales proteínas WISP-1 se describen adicionalmente más adelante y en la solicitud PCT WO99/21998 publicada el 6 de mayo de 1999, el documento US 6.387.657 B1 concedido el 14 de mayo de 2002, y en Pennica y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 95:14717-14722 (1998).

10 **[0035]** Las expresiones "polipéptido WISP-1", "homólogo de WISP-1" y variantes gramáticas de los mismos como se usan en este documento engloban proteína WISP-1 de secuencia natural y variantes (que se definen adicionalmente en este documento). El polipéptido WISP-1 puede aislarse de una variedad de fuentes tales como de tipos de tejido humano o de otra fuente, o prepararse por procedimientos recombinantes o  
 15 sintéticos, o mediante cualquier combinación de estas técnicas y similares.

**[0036]** La expresión "polipéptido WISP-1 de secuencia natural" comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que un polipéptido WISP-1 derivado de la naturaleza. Tales polipéptidos WISP-1 de secuencia natural pueden aislarse de la naturaleza o pueden producirse por medios recombinantes o sintéticos.  
 20 La expresión "polipéptido WISP-1 de secuencia natural" engloba específicamente formas truncadas o secretadas que se producen naturalmente de un polipéptido WISP-1 desvelado en este documento, formas variantes que se producen naturalmente (por ejemplo, formas cortadas y empalmadas alternativamente o variantes de corte y empalme) y variantes alélicas que se producen naturalmente de un polipéptido WISP-  
 25 1. En una realización de la invención, el polipéptido WISP-1 de la secuencia natural es un polipéptido WISP-1 humano de la secuencia natural maduro o de longitud completa que comprende los aminoácidos 23 a 367 de la Figura 9 o los aminoácidos 1 a 367 de la Figura 9, respectivamente, con o sin metionina del extremo N.

**[0037]** En otra realización de la invención, el polipéptido WISP-1 de secuencia  
 30 natural es el polipéptido WISP-1 humano de secuencia natural de longitud completa o maduro que comprende los aminoácidos 23 a 367 ó 1 a 367 de la Figura 9 en la que el resto de valina en la posición 184 o el resto de alanina en la posición 202 ha/han sido cambiado(s) por un residuo de isoleucina o de serina, respectivamente, con o sin metionina del extremo N. En otra realización de la invención, el polipéptido WISP-1  
 35 de la secuencia natural es el polipéptido WISP-1 humano de la secuencia natural de

longitud completa o maduro que comprende los aminoácidos 23 a 367 ó 1 a 367 de la Figura 9 en la que el residuo de valina en la posición 184 y el residuo de alanina en la posición 202 ha/han sido cambiado(s) por un residuo de isoleucina o de serina, respectivamente, con o sin metionina del extremo N.

5 **[0038]** En otra realización de la invención, el polipéptido WISP-1 de secuencia natural es uno que está codificado por una secuencia de nucleótidos que comprende una de las variantes de corte y empalme de WISP-1 humana u otra de secuencia natural que incluye SEQ ID NOS:23, 24, 25, 26, 27, 28 ó 29 mostradas en el documento WO99/21998, con o sin una metionina del extremo N.

10 **[0039]** La expresión "variante de WISP-1" significa un polipéptido WISP-1 activo como se define más adelante que tiene al menos aproximadamente el 80%, preferentemente al menos aproximadamente el 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, más preferentemente al menos aproximadamente el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, lo más preferentemente al menos aproximadamente el 95%, 96%, 97%, 98% o el 99% de  
15 identidad de secuencias de aminoácidos con WISP-1 madura humana que tiene la secuencia de aminoácidos deducida mostrada en la Fig. 9, o un fragmento soluble de la misma. Tales variantes incluyen, por ejemplo, polipéptidos WISP-1 en los que uno o más restos de aminoácidos se añaden al, o se deleccionan del, extremo N o C de las secuencias de longitud completa o maduras de la Figura 9, o polipéptidos WISP-1 en  
20 los que uno o más restos de aminoácidos se insertan o se deleccionan de la secuencia interna o dominios del polipéptido, incluyendo variantes de otras especies, pero excluye un polipéptido WISP-1 de secuencia natural. Preferentemente, una variante tal actúa de antagonista, como se define más adelante.

**[0040]** Un "dominio extracelular", "ECD" o proteína "secretada" se refiere a una  
25 forma de un polipéptido que está esencialmente libre de cualquier dominio transmembrana y citoplásmico. Una forma "secretada" de una proteína o polipéptido puede o incluir o no una secuencia señal.

**[0041]** "Condiciones rigurosas" son aquellas que (1) emplean baja fuerza iónica y alta temperatura para lavar, por ejemplo, cloruro sódico 0,015 M/citrato de sodio  
30 0,0015 M/dodecilsulfato de sodio al 0,1% a 50°C; (2) emplean durante la hibridación un agente desnaturizante tal como formamida, por ejemplo, 50% (vol/vol) de formamida con albúmina de suero bovino al 0,1%/Ficoll al 0,1%/polivinilpirrolidona al 0,1%/tampón fosfato de sodio 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato de sodio 75 mM a 42°C; (3) emplean formamida al 50%, 5 x SSC (NaCl 0,75 M,  
35 citrato de sodio 0,075 M), fosfato de sodio 50 mM (pH 6,8), pirofosfato de sodio al

0,1%, 5 x disolución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonicado (50 µg/ml), SDS al 0,1% y sulfato de dextrano al 10% a 42°C, con lavados a 42°C en 0,2 x SSC y SDS al 0,1%; o (4) emplean un tampón de sulfato de dextrano al 10%, 2 x SSC (cloruro sódico/citrato de sodio) y formamida al 50% a 55°C, seguido por un lavado de alta rigurosidad constituido por 0,1 x SSC que contiene EDTA a 55°C.

**[0042]** "Condiciones moderadamente rigurosas" se describen en Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) e incluyen el uso de una disolución de lavado y condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica y SDS en porcentaje) menos rigurosas que las descritas anteriormente. Un ejemplo de condiciones moderadamente rigurosas es una condición tal como incubación durante la noche a 37°C en una disolución que comprende: formamida al 20%, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato de trisodio 15 mM), fosfato de sodio 50 mM (pH 7,6), 5 x disolución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10% y 20 mg/ml de ADN de esperma de salmón cortado desnaturalizado, seguido de lavado de los filtros en 1 x SSC a aproximadamente 37-50°C. El experto reconocerá cómo ajustar la temperatura, fuerza iónica, etc., según sea necesario para adaptar factores tales como la longitud de sonda y similares.

**[0043]** "Aislado" cuando se usa para describir los diversos polipéptidos desvelados en este documento significa un polipéptido que ha sido identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que normalmente podrían interferir con los usos diagnósticos o terapéuticos del polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En realizaciones preferidas, el polipéptido se purificará (1) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 restos de la secuencia de aminoácidos del extremo N o internos usando un secuenciador de taza giratoria, o (2) hasta homogeneidad por SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras o reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción con plata. El polipéptido aislado incluye el polipéptido *in situ* contenido en células recombinantes, ya que al menos un componente del entorno natural de WISP no estará presente. Generalmente, sin embargo, el polipéptido aislado se preparará por al menos una etapa de purificación.

**[0044]** El término "secuencias de control" se refiere a las secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante operativamente ligada en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariotas incluyen, por ejemplo, una secuencia promotora, opcionalmente una

operadora, y un sitio de unión a ribosoma. Se sabe que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

**[0045]** El ácido nucleico está "operativamente ligado" cuando está colocado en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el ADN de una presecuencia o líder secretor está operativamente ligado al ADN de un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está operativamente ligado a una secuencia codificante si afecta la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está operativamente ligado a una secuencia codificante si está posicionado de forma que facilite la traducción. Generalmente, "operativamente ligado" significa que las secuencias de ADN que están ligadas son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. La ligación se lleva a cabo por ligación en sitios de restricción convenientes. Si no existen tales sitios, los adaptadores o ligadores de oligonucleótidos sintéticos se usan según la práctica convencional.

**[0046]** Un "liposoma" es una pequeña vesícula compuesta por diversos tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivo que es útil para la administración de un fármaco (tal como la insulina y las variantes de insulina desveladas en este documento) a un mamífero. Los componentes del liposoma están comúnmente dispuestos en una formación de bicapa similar a la disposición de lípidos de membranas biológicas.

**[0047]** Los términos "aminoácido" y "aminoácidos" se refieren a todos los L-alfa-aminoácidos que se producen naturalmente. Esta definición pretende incluir norleucina, ornitina y homocisteína. Los aminoácidos se identifican o bien por las designaciones de una sola letra o bien de tres letras:

25

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

**[0048]** En la lista de secuencias y figuras pueden emplearse algunas otras designaciones de una sola letra o de tres letras para referirse a e identificar dos o más aminoácidos o nucleótidos en una posición dada en la secuencia.

**[0049]** "Identidad de la secuencia de aminoácidos en porcentaje (%)" con respecto a las secuencias de polipéptidos identificadas en este documento se define como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos en dicha secuencia de polipéptidos identificada en este documento, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para lograr la máxima identidad de la secuencia en porcentaje , y sin considerar sustituciones conservativas como parte de la identidad de secuencias. El alineamiento con el fin de determinar la identidad de secuencias de aminoácidos en porcentaje puede lograrse de diversas formas que están dentro de las capacidades de la materia , por ejemplo, usando software informático públicamente disponible tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR). Aquellos expertos en la materia pueden determinar parámetros apropiados para medir el alineamiento que incluyen cualquier algoritmo necesario para lograr el alineamiento máximo con respecto a la longitud completa de las secuencias que se comparan. Sin embargo, para los fines en este documento, los valores de identidad de la secuencia de aminoácidos en % se obtienen como se describe más adelante usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2, el código fuente completo para el programa ALIGN-2 se proporciona en una tabla más adelante. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue escrito por Genentech, Inc. y el código fuente mostrado en la tabla de más adelante ha sido presentado con documentación de usuario en la oficina de derechos de autor de EE.UU., Washington D.C., 20559, en la que está registrado bajo el n° de registro de derechos de autor de EE.UU. TXU510087. El programa ALIGN-2 está públicamente disponible de Genentech, Inc., South San Francisco, California o puede compilarse a partir del código fuente proporcionado en la tabla de más adelante. El programa ALIGN-2 debería compilarse para uso en un sistema operativo UNIX, preferentemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias están fijados por el programa ALIGN-2 y no varían.

**[0050]** El término "epítipo marcado" cuando se usa en este documento se refiere a un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido fusionado a un "polipéptido de marcaje". El polipéptido de marcaje tiene suficientes restos para proporcionar un epítipo contra el que puede dirigirse un anticuerpo. El polipéptido de marcaje también es casi preferentemente único, de manera que el anticuerpo no reacciona

sustancialmente de forma cruzada con otros epítomos. Los polipéptidos de marcaje adecuados tienen generalmente al menos seis restos de aminoácidos y normalmente entre aproximadamente 8 y 50 restos de aminoácidos (preferentemente, entre aproximadamente 10 y 20 restos de aminoácidos).

- 5 **[0051]** Como se usa en este documento, el término "inmunoadhesina" designa moléculas similares a anticuerpos que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesina") con las funciones efectoras de dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que
- 10 es distinta del sitio de reconocimiento y de unión a antígeno de un anticuerpo (es decir, es "heterólogo") y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina. La parte de adhesina de una molécula de inmunoadhesina normalmente es una secuencia de aminoácidos contigua que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia de dominio constante de inmunoglobulina en la inmunoadhesina
- 15 puede obtenerse a partir de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3, o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 y IgA-2), IgE, IgD o IgM.

- [0052]** El término "antagonista" se usa en el sentido más extenso e incluye cualquier molécula que bloquee, inhiba o neutralice parcialmente o completamente una o más actividades biológicas del polipéptido WISP-1 *in vitro*, *in situ* o *in vivo*.
- 20 Ejemplos de tales actividades biológicas de polipéptidos WISP-1 incluyen inducción o secreción de HAS2, HA, CD44 o RHAMM en al menos un tipo de célula de mamífero. Un antagonista puede actuar de un modo directo o indirecto. Por ejemplo, el antagonista puede actuar para bloquear, inhibir o neutralizar parcialmente o completamente una o más actividades biológicas del polipéptido WISP-1 *in vitro*, *in situ* o *in vivo*, por ejemplo, como resultado de su unión directa al polipéptido WISP-1.
- 25 El antagonista también puede actuar indirectamente para bloquear, inhibir o neutralizar parcialmente o completamente una o más actividades biológicas del polipéptido WISP-1 *in vitro*, *in situ* o *in vivo* como resultado de, por ejemplo, bloqueo o inhibición de otra molécula efectora.

- 30 **[0053]** El término "antagonista de WISP-1" se refiere a cualquier molécula que bloquee, inhiba o neutralice parcialmente o completamente una actividad biológica de WISP-1 e incluye, pero no se limita a, anticuerpos, inmunoadhesinas, inmunoadhesinas WISP-1, proteínas de fusión WISP-1, formas covalentemente modificadas de WISP-1, variantes de WISP-1 y proteínas de fusión de las mismas,
- 35 anticuerpos de WISP-1 y formas de oligómeros superiores de WISP-1 (dímeros,

agregados) o formas homo o heteropoliméricas de WISP-1. Para determinar si una molécula antagonista de WISP-1 bloquea, inhibe o neutraliza parcialmente o completamente una actividad biológica de WISP-1 pueden realizarse ensayos para evaluar el (los) efecto(s) de la molécula antagonista sobre, por ejemplo, diversas  
 5 células (como se describe en los ejemplos) o en un modelo murino *in vivo* de metástasis de cáncer de pulmón. Los diversos ensayos pueden realizarse en formas de ensayo conocidas *in vitro* o *in vivo*. Preferentemente, los antagonistas de WISP-1 empleados en los procedimientos descritos en este documento podrán bloquear o neutralizar al menos un tipo de actividad de WISP-1, que puede determinarse  
 10 opcionalmente en ensayos tal como se describen en este documento.

**[0054]** El término "anticuerpo" se usa en el sentido más extenso y cubre específicamente, por ejemplo, anticuerpos monoclonales individuales, composiciones de anticuerpos con especificidad poliepitópica, anticuerpos monoclonales y fragmentos de anticuerpos. "Anticuerpo" como se usa en este documento incluye moléculas de  
 15 inmunoglobulinas o de anticuerpos intactas, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (es decir, anticuerpos biespecíficos formados a partir de al menos dos anticuerpos intactos) y fragmentos de inmunoglobulinas (tales como Fab, F(ab')<sub>2</sub> o Fv), siempre y cuando presenten cualquiera de las propiedades antagonistas deseadas descritas en este documento.

20 **[0055]** Los anticuerpos son normalmente proteínas o polipéptidos que presentan especificidad de unión a un antígeno específico. Los anticuerpos naturales son normalmente glicoproteínas heterotetrámeras compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Normalmente, cada cadena ligera está ligada a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, aunque el número de  
 25 enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro regularmente espaciados entre las cadenas. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V<sub>H</sub>) seguido de varios dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V<sub>L</sub>) y un dominio constante en su otro extremo; el  
 30 dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que los restos de aminoácidos particulares forman una superficie de contacto entre los dominios variables de cadena ligera y pesada [Chothia y col., J. Mol. Biol., 186:653.-663 (1985); Novotny y Haber,  
 35 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:4592-4596 (1985)]. Las cadenas ligeras de anticuerpos

de cualquier especie de vertebrados pueden asignarse a uno de dos tipos claramente distintos llamados kappa y lambda basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes

5 clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de éstas puede dividirse adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG-1, IgG-2, IgG-3 y IgG-4; IgA-1 e IgA-2. Los dominios constantes de cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman alfa, delta, epsilon, gamma y mu, respectivamente.

10 **[0056]** Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una parte de un anticuerpo intacto, generalmente la región de unión a antígeno o región variable del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> y Fv, diacuerpos, moléculas de anticuerpos monocatenarios y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

15 **[0057]** El término "variable" se usa en este documento para describir ciertas porciones de los dominios variables que se diferencian en la secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no está normalmente uniformemente distribuida por los dominios variables de anticuerpos. Normalmente está concentrada

20 en tres segmentos llamados regiones determinantes de la complementariedad (CDR) o regiones hipervariables tanto en los dominios variables de cadena ligera como de cadena pesada. Las porciones más sumamente conservadas de los dominios variables se llaman la región estructural (FR). Cada uno de los dominios variables de cadenas pesada y ligera naturales comprende cuatro regiones FR, adoptando en buena parte una

25 configuración de lámina  $\beta$ , conectada por tres CDR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina  $\beta$ . Las CDR de cada cadena se mantienen juntas en estrecha proximidad por las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de anticuerpos [véase Kabat, E.A. y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, National

30 Institutes of Health, Bethesda, MD (1987)]. Los dominios constantes no participan directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras tales como participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpo.

**[0058]** El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en este documento se

35 refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos

sustancialmente homogénea, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones que se producen naturalmente que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son sumamente específicos estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, a  
 5 diferencia de las preparaciones de anticuerpos (policlonales) convencionales que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante sobre el antígeno.

**[0059]** Los anticuerpos monoclonales en este documento incluyen anticuerpos  
 10 quiméricos, híbridos y recombinantes producidos por corte y empalme de un dominio variable (incluyendo hipervariable) del anticuerpo de interés con un dominio constante (por ejemplo, anticuerpos "humanizados"), o una cadena ligera con una cadena pesada, o una cadena de una especie con una cadena de otra especie, o fusiones con proteínas heterólogas, independientemente de especies de origen o designación de clases o  
 15 subclases de inmunoglobulina, además de fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, F(ab')<sub>2</sub> y Fv), siempre y cuando presentan la actividad biológica o propiedades deseadas. Véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 4.816.567 y Mage y col., en Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pág. 79-97 (Marcel Dekker, Inc.: Nueva York, 1987).

20 **[0060]** Por tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos y no debe interpretarse que requiere la producción del anticuerpo por cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que van a usarse según la presente invención pueden prepararse por el procedimiento de hibridoma descrito en  
 25 primer lugar por Kohler y Milstein, Nature, 256:495 (1975), o pueden prepararse mediante procedimientos de ADN recombinante tales como se describen en la patente de EE.UU. nº 4.816.567. Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse de bibliotecas de fagos generadas usando las técnicas descritas, por ejemplo, en McCafferty y col., Nature, 348:552-554 (1990).

30 **[0061]** Formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas específicas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> u otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos) que contienen la secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En general, los anticuerpos humanizados son  
 35 inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los restos de una región

determinante de la complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por restos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los restos de la región estructural Fv (FR) de la inmunoglobulina humana están sustituidos por  
 5 restos no humanos correspondientes. Además, el anticuerpo humanizado puede comprender restos que ni se encuentran en el anticuerpo receptor ni en las secuencias de CDR o de la región estructural importadas. Estas modificaciones se hacen para refinar y optimizar adicionalmente el rendimiento de los anticuerpos. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos o al menos un dominio  
 10 variable, y normalmente dos, correspondiéndose todas o sustancialmente todas las regiones CDR con las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá óptimamente al menos una parte de una región o dominio constante (Fc) de inmunoglobulina, normalmente la de una  
 15 inmunoglobulina humana.

**[0062]** Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que se corresponde con la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o ha sido preparado usando cualquiera de las técnicas para preparar anticuerpos humanos conocidas en la técnica o como se desvelan en este documento. Esta definición de un  
 20 anticuerpo humano incluye anticuerpos que comprenden al menos un polipéptido de la cadena pesada humana o al menos un polipéptido de la cadena ligera humana, por ejemplo, un anticuerpo que comprende polipéptidos de cadena ligera murina y cadena pesada humana. Los anticuerpos humanos pueden producirse usando diversas técnicas conocidas en la técnica. En una realización, el anticuerpo humano se selecciona de una  
 25 biblioteca de fagos en la que la biblioteca de fagos expresa anticuerpos humanos (Vaughan y col. Nature Biotechnology, 14:309-314 (1996); Sheets y col. PNAS, (USA) 95:6157-6162 (1998)); Hoogenboom y Winter, J. Mol. Bio., 227:381 (1991); Marks y col., J. Mol. Biol., 222:581 (1991)). Los anticuerpos humanos también pueden prepararse introduciendo loci de inmunoglobulina humana en animales transgénicos,  
 30 por ejemplo, ratones en los que los genes de inmunoglobulina endógena han sido parcialmente o completamente inactivados. Tras la exposición se observa la producción de anticuerpos humanos, que se parece mucho en todos los sentidos a la observada en seres humanos, que incluye transposición de genes, unión y repertorio de anticuerpos. Esta solución se describe, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. nº  
 35 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, y las siguientes

publicaciones científicas: Marks y col., *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992); Lonberg y col., *Nature*, 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368:812-13 (1994); Fishwild y col., *Nature Biotechnology*, 14: 845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14: 826 (1996); Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13:65-93 (1995).

- 5 Alternativamente, el anticuerpo humano puede prepararse mediante inmortalización de linfocitos B humanos para producir un anticuerpo dirigido contra un antígeno diana (tales linfocitos B pueden recuperarse de un individuo o pueden haber sido inmunizados *in vitro*). Véanse, por ejemplo, Cole y col., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner y col., *J. Immunol.*, 147 (1):86-95  
10 (1991); y la patente de EE.UU. nº 5.750.373.

**[0063]** El término "región Fc" se usa para definir la región del extremo C de una cadena pesada de inmunoglobulina que puede generarse por digestión con papaína de un anticuerpo intacto. La región Fc puede ser una región Fc de secuencia natural o una región Fc variante. Aunque pueden variar los límites de la región Fc de una cadena  
15 pesada de inmunoglobulina, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana se define normalmente por alargarse desde un resto de aminoácido en aproximadamente la posición Cys226, o desde aproximadamente la posición Pro230, hasta el extremo carbonilo de la región Fc (usando en este documento el sistema de numeración según Kabat y col., anteriormente). La región Fc de una inmunoglobulina comprende  
20 generalmente dos dominios constantes, un dominio CH2 y un dominio CH3, y opcionalmente comprende un dominio CH4.

**[0064]** Por "cadena de la región Fc" se indica en este documento una de las dos cadenas de polipéptidos de una región Fc.

**[0065]** El "dominio CH2" de una región Fc de IgG humana (también denominado  
25 en lo sucesivo dominio "C $\gamma$ 2") normalmente se extiende desde un resto de aminoácido en aproximadamente la posición 231 hasta un residuo de aminoácido en aproximadamente la posición 340. El dominio CH2 es único porque no está estrechamente apareado con otro dominio. Más bien, dos cadenas de hidratos de carbono ramificadas ligadas a N están interpuestas entre los dos dominios CH2 de una  
30 molécula de IgG natural intacta. Se ha especulado que el hidrato de carbono puede proporcionar un sustituto al apareamiento dominio-dominio y ayudar a estabilizar el dominio CH2. Burton, *Molec. Immunol*, 22:161-206 (1985). El dominio CH2 en este documento puede ser un dominio CH2 de secuencia natural o dominio CH2 variante.

**[0066]** El "dominio CH3" comprende el alargamiento de residuos del extremo C  
35 con respecto a un dominio CH2 en una región Fc (es decir, desde un residuo de

aminoácido en aproximadamente la posición 341 hasta un residuo de aminoácido en aproximadamente la posición 447 de una IgG). La región CH3 en este documento puede ser un dominio CH3 de secuencia natural o un dominio CH3 variante (por ejemplo, un dominio CH3 con una "protuberancia" introducida en una cadena del mismo y una "cavidad" introducida correspondiente en la otra cadena del mismo; véase la patente de EE.UU. n° 5.821.333). Tales dominios CH3 variantes pueden usarse para preparar anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos) como se describe en este documento.

**[0067]** La "región bisagra" se define generalmente como el alargamiento desde aproximadamente Glu216, o aproximadamente Cys226, hasta aproximadamente Pro230 de IgG1 humana (Burton, Molec. Immunol, 22:161-206 (1985)). Las regiones bisagra de otros isotipos de IgG pueden alinearse con la secuencia de IgG1 colocando el primer y el último residuo de cisteína que forman enlaces S-S entre cadenas pesadas en las mismas posiciones. La región bisagra en este documento puede ser una región bisagra de secuencia natural o una región bisagra variante. Las dos cadenas de polipéptidos de una región bisagra variante retienen generalmente al menos un resto de cisteína por cadena de polipéptidos, de manera que las dos cadenas de polipéptidos de la región bisagra variante pueden formar un enlace disulfuro entre las dos cadenas. La región bisagra preferida en este documento es una región bisagra de secuencia natural humana, por ejemplo, una región bisagra de IgG1 humana de secuencia natural.

**[0068]** Una "región Fc funcional" posee al menos una "función efectora" de una región Fc de secuencia natural. A modo de ejemplo, "funciones efectoras" incluyen unión a C1q; citotoxicidad dependiente de complemento (CDC); unión a receptor Fc; citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de receptores de la superficie de células (por ejemplo, receptor de células B; BCR), etc. Tales funciones efectoras requieren generalmente que la región Fc se combine con un dominio de unión (por ejemplo, un dominio variable de anticuerpo) y pueda evaluarse usando diversos ensayos conocidos en la técnica para evaluar tales funciones efectoras de anticuerpos.

**[0069]** Una "región Fc de secuencia natural" comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a la secuencia de aminoácidos de una región Fc encontrada en la naturaleza. Una "región Fc variante" comprende una secuencia de aminoácidos que se diferencia de una región Fc de secuencia natural en virtud de al menos una modificación de aminoácidos. Preferentemente, la región Fc variante tiene al menos una sustitución de aminoácidos en comparación con una región Fc de secuencia natural

o con la región Fc de un polipéptido parental, por ejemplo, de aproximadamente una a aproximadamente diez sustituciones de aminoácidos, y preferentemente de aproximadamente una a aproximadamente cinco sustituciones de aminoácidos en una región Fc de secuencia natural o en la región Fc del polipéptido parental. La región Fc variante en este documento poseerá preferentemente al menos aproximadamente el 80% de identidad de secuencias con una región Fc de secuencia natural y/o con una región Fc de un polipéptido parental, y lo más preferentemente al menos aproximadamente el 90% de identidad de secuencias con el mismo, más preferentemente al menos aproximadamente el 95% de identidad de secuencias con el mismo.

**[0070]** La "citotoxicidad celular mediada por anticuerpos" y "ADCC" se refieren a una reacción mediada por células en la que células citotóxicas no específicas que expresan receptores Fc (FcR) (por ejemplo, linfocitos citolíticos espontáneos (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen el anticuerpo unido a una célula diana y posteriormente producen lisis de la célula diana. Las células primarias para mediar ADCC, los linfocitos NK, sólo expresan FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de FcR en células hematopoyéticas se resumen en la Tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol., 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula de interés puede realizarse un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en las patentes de EE.UU. nº 5.500.362 ó 5.821.337. Las células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares de sangre de periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos espontáneos (NK). Alternativa, o adicionalmente, la actividad ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el desvelado en Clynes y col. PNAS (USA), 95:652-656 (1998).

**[0071]** Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. Preferentemente, las células expresan al menos FcγRIII y realizan la función efectora ADCC. Ejemplos de leucocitos humanos que median ADCC incluyen células mononucleares de sangre de periférica (PBMC), linfocitos citolíticos espontáneos (NK), monocitos, células T citotóxicas y neutrófilos; prefiriéndose PBMC y linfocitos NK. Las células efectoras pueden aislarse de una fuente natural de las mismas, por ejemplo, de sangre o PBMC como se describe en este documento.

**[0072]** Los términos "receptor Fc" y "FcR" se usan para describir un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferido es un FcR humano de

secuencia natural. Además, un FcR preferido es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, que incluyen variantes alélicas y alternativamente formas cortadas y empalmadas de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activador")  
 5 y FcγRIIB (un "receptor inhibidor") que tienen secuencias de aminoácidos similares que se diferencian principalmente en los dominios citoplásmicos de los mismos. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo de activación de inmunorreceptores basado en tirosina (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición de inmunorreceptores basado en tirosina (ITIM) en  
 10 su dominio citoplásmico (revisado en Daëron, Annu. Rev. Immunol., 15:203-234 (1997)). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol., 9:457-92 (1991); Capel y col., Immunomethods, 4:25-34 (1994); y de Haas y col., J. Lab. Clin. Med., 126:330-41 (1995). Otros FcR que incluyen los que van a identificarse en el futuro están englobados por el término "FcR" en este documento. El término también  
 15 incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto (Guyer y col., J. Immunol., 117:587 (1976); y Kim y col., J. Immunol., 24:249 (1994)).

**[0073]** La "citotoxicidad dependiente del complemento" y "CDC" se refieren a la lisis de una diana en presencia del complemento. La ruta de activación del  
 20 complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema de complemento (C1q) a una molécula (por ejemplo, un anticuerpo) complejoado con un antígeno consanguíneo. Para evaluar la activación del complemento puede realizarse un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro y col., J. Immunol. Methods, 202:163 (1996).

**[0074]** Un anticuerpo "madurado por afinidad" es uno con una o más alteraciones en una o más CDR del mismo que dan como resultado una mejora en la afinidad del anticuerpo por el antígeno, en comparación con un anticuerpo parental que no posee esa(s) alteración(es). Los anticuerpos madurados por afinidad preferidos tendrán afinidades nanomolares o incluso picomolares para el antígeno diana. Los anticuerpos  
 30 madurados por afinidad se producen mediante procedimientos conocidos en la técnica. Marks y col., Bio/Technology, 10:779-783 (1992) describen la maduración por afinidad por barajado de dominios VH y VL. La mutagénesis aleatoria de residuos de CDR y/o de la región estructural se describe por: Barbas y col. Proc Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813 (1994); Schier y col. Gene, 169:147-155 (1995); Yelton y col. J. Immunol., 155:1994-2004 (1995); Jackson y col., J. Immunol., 154(7):3310-9 (1995);

y Hawkins y col., J. Mol. Biol., 226:889-896 (1992).

**[0075]** El término "inmunoespecífico" como se usa en "unión inmunoespecífica de anticuerpos", por ejemplo, se refiere a la interacción de unión específica a antígeno que se produce entre el sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo y el antígeno específico reconocido por ese anticuerpo.

**[0076]** Los términos "cáncer", "canceroso", "metástasis" y "maligno" se refieren a o describen la afección fisiológica en mamíferos que normalmente se caracteriza por crecimiento celular sin regular. Ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, carcinoma que incluye adenocarcinoma, linfoma, blastoma, melanoma, sarcoma y leucemia. Ejemplos más particulares de tales cánceres incluyen cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer gastrointestinal, linfoma de Hodgkin y de no Hodgkin, cáncer pancreático, glioblastoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado tal como carcinoma hepático y hepatoma, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial, mieloma (tal como mieloma múltiple), carcinoma de las glándulas salivares, cáncer de riñón tal como carcinoma de células renales y tumores de Wilms, carcinoma de células basales, melanoma, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, cáncer testicular, cáncer de esófago y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello. Los cánceres preferidos para el tratamiento en este documento incluyen cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer de pulmón, cáncer de colon o colorrectal, glioma y glioblastoma.

**[0077]** El término "profármaco" como se usa en esta solicitud se refiere a un precursor o forma derivada de una sustancia farmacéuticamente activa que es menos citotóxica para células cancerosas en comparación con el fármaco parental y puede activarse enzimáticamente o convertirse en la forma parental más activa. Véanse, por ejemplo, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pág. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) y Stella y col., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery", Directed Drug Delivery, Borchardt y col., (ed.), pág. 247-267, Humana Press (1985). Los profármacos de esta invención incluyen, pero no se limitan a, profármacos que contienen fosfato, profármacos que contienen tiofosfato, profármacos que contienen sulfato, profármacos que contienen péptidos, profármacos modificados con D-aminoácidos, profármacos glicosilados, profármacos que contienen beta-lactama, profármacos que contienen fenoxiacetamida opcionalmente sustituidos o profármacos que contienen fenilacetamida opcionalmente sustituidos, profármacos de 5-

fluorocitosina y otros de 5-fluorouridina que pueden convertirse en el fármaco libre citotóxico más activo. Ejemplos de fármacos citotóxicos que pueden derivatizarse en una forma de profármaco para uso en esta invención incluyen, pero no se limitan a, aquellos agentes quimioterapéuticos descritos más adelante.

- 5 **[0078]** El término "agente citotóxico" como se usa en este documento se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de células y/o produce la destrucción de células. El término pretende incluir isótopos radiactivos (por ejemplo, At<sup>211</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup> e isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos y toxinas tales como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas  
10 de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal que incluyen fragmentos y/o variantes de las mismas.

- [0079]** Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento de afecciones como cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN<sup>TM</sup>);  
15 alquilsulfonatos tales como busulfan, improsulfan y piposulfan; aziridinas tales como benzodopa, carbocuna, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolomelamina; acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); una camptotecina (incluyendo el análogo sintético topotecan); briostatina; callistatina; CC-  
20 1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); criptoficinas (particularmente criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos KW-2189 y CBI-TMI); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongistatina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, ciclofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina,  
25 clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalan, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como los antibióticos enediína (por ejemplo, caliqueamicina, especialmente caliqueamicina  $\gamma_1^1$  y caliqueamicina  $\theta^1$ , véase, por ejemplo, Agnew Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186  
30 (1994); dinemicina, que incluye dinemicina A; una esperamicina; además del cromóforo neocarzinostatina y cromóforos de antibióticos de enediína de cromoproteínas relacionadas), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina  
35 (incluyendo morfolino-doxorubicina, cianomorfolinodoxorubicina, 2-pirrolino-

doxorubicina y desoxi-doxorubicina), epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; antiadrenérgicos tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reparadores de ácido fólico tales como ácido frolínico; aceglatona; glucósido aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elfornitina; acetato de eliptinio; una epotilona; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiiurea; lentinan; lonidamina; maitansinoides tales como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK®; razoxana; rizoxina; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazonico; triazicuona; 2,2',2''-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) y doxetaxel (TAXOTERE®, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. En esta definición también están incluidos agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción de hormonas sobre tumores tales como antiestrógenos que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles inhibidores de aromatasas, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (Fareston); y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; y sales, ácidos o

derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

**[0080]** Un "agente inhibidor del crecimiento" cuando se usa en este documento se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, tanto *in vitro* como *in vivo*. Por tanto, el agente inhibidor del crecimiento es uno que reduce significativamente el porcentaje de células que expresan en exceso tales genes en fase S. Ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluyen agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un sitio distinto de la fase S) tales como agentes que inducen la detención de G1 y la detención de la fase M. Los bloqueadores clásicos de la fase M incluyen las vincas (vincristina y vinblastina), taxol e inhibidores de topo II tales como doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etopósido y bleomicina. Aquellos agentes que detienen G1 también se extienden a la detención de la fase S, por ejemplo, agentes alquilantes de ADN tales como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo y ara-C. Puede encontrarse más información en *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn and Israel, eds., Capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs" de Murakami y col. (WB Saunders: Filadelfia, 1995), especialmente la pág. 13.

**[0081]** El término "citocina" es un término genérico para proteínas liberadas por una población de células que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Ejemplos de tales citocinas son linfocinas, monocinas y hormonas de polipéptidos tradicionales. Entre las citocinas están incluidas hormonas de crecimiento tales como hormona de crecimiento humana, hormona de crecimiento humana de N-metionilo y hormona de crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas de glicoproteínas tales como hormona estimulante del folículo (FSH), hormona estimulante del tiroides (TSH) y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; ligando Apo-2 del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  y  $\beta$  (también denominado en lo sucesivo TRAIL); sustancia inhibidora mulleriana; péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nerviosos; factor de crecimiento de plaquetas; factores de crecimiento transformantes (TGF) tales como TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ ; factor de crecimiento similar a la insulina I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductivos; interferones tales como interferón  $\alpha$ ,  $\beta$  y gamma; factores estimulantes de colonias (CSF) tales como macrófago-CSF (M-CSF); granulocito-macrófago-CSF (GM-CSF); y granulocito-CSF (G-CSF); interleucinas (IL) tales como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; y

otros factores de polipéptidos que incluyen LSI y el ligando kit (KL). Como se usa en este documento, el término citocina incluye proteínas de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de las citocinas de secuencia natural.

5 **[0082]** "Tratamiento" es una intervención realizada con la intención de prevenir el desarrollo o alterar la patología de un trastorno. Por consiguiente, "tratamiento" se refiere tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en el que el objeto es prevenir o ralentizar (aliviar) la afección o trastorno patológico elegido como diana. Aquellos en necesidad de tratamiento incluyen aquellos ya con el  
10 trastorno, además de aquellos en los que el trastorno va a prevenirse. En el tratamiento de un trastorno, un agente terapéutico puede disminuir directamente o aumentar la magnitud de respuesta de un componente patológico del trastorno, o hacer que la enfermedad sea más susceptible a tratamiento por otros agentes terapéuticos, por ejemplo, antibióticos, agentes antifúngicos, agentes antiinflamatorios, agentes  
15 quimioterapéuticos, etc.

**[0083]** El término "cantidad eficaz" es la concentración mínima de antagonista de WISP-1 que produce, induce o produce o bien una mejora detectable o una reducción de una afección patológica. En un procedimiento para tratar cáncer, una cantidad eficaz es una que produce, induce o produce la reducción del número de células  
20 cancerosas o volumen tumoral. Además, una "cantidad terapéuticamente eficaz" es la concentración (cantidad) mínima de antagonista de WISP-1 administrada a un mamífero que sería eficaz en al menos atenuar un síntoma patológico.

**[0084]** Administración "crónica" se refiere a la administración del (de los) factor(es) en un modo continuo a diferencia de un modo de dosis únicas, de manera  
25 que se mantenga el efecto (actividad) terapéutico inicial durante un periodo de tiempo prolongado. Administración "intermitente" es el tratamiento que no se hace consecutivamente sin interrupción, sino que es de naturaleza cíclica.

**[0085]** "Mamífero" para fines de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero que incluye seres humanos, animales domésticos y de  
30 granja, y animales de zoológico, para deporte o mascotas tales como perros, caballos, gatos, reses, cerdos, hámsteres, etc. Preferentemente, el mamífero es el ser humano.

**[0086]** Administración "en combinación con" uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

35 **[0087]** "Vehículos" como se usa en este documento incluye vehículos, excipientes,

o estabilizadores farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos para la célula o mamífero que se expone a los mismos a las dosificaciones y concentraciones empleadas. Frecuentemente, el vehículo fisiológicamente aceptable es una disolución tamponada acuosa a pH. Ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen

5 tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico; polipéptido de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos,

10 disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN<sup>®</sup>, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS<sup>®</sup>, ácido hialurónico (HA).

## 15 II. Procedimientos y composiciones de la invención

**[0088]** Como se describe adicionalmente en los ejemplos siguientes, el solicitante ha encontrado sorprendentemente que la expresión ectópica de WISP-1 en fibroblastos desencadenó la producción de HA, concretamente el aumento de la producción de HA indujo su acumulación en la superficie de células y en los medios de cultivo. Se cree

20 que el HA de la superficie de células puede potenciar el crecimiento independiente de anclaje y la tumorigenicidad (Kosaki y col., Cancer Res., 59:1141-1145 (1999)) y puede disminuir la inhibición por contacto de la proliferación celular, promoviendo así la migración de células (Ichikawa y col., J. Invest. Dermatol., 113:935-939 (1999); Itano y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 99:3609-3614 (2002)). La formación de

25 recubrimientos de hialuronano también guarda relación con el potencial metastásico celular (Zhang y col., Cancer Res., 55:428-433 (1995); Toole y col., J. Biol. Chem., 277:4593-4596 (2002)). El análisis de la expresión de las HA sintasas (HAS1, HAS2 y HAS3) reveló que WISP-1 promovió la inducción de *HAS2* a la vez que permanecieron constantes los niveles de ARNm de *HAS1* y *HAS3*. *HAS2* es la diana

30 principal del factor de crecimiento y la citocina reguló por exceso la síntesis de HA (Pienimäki y col., J. Biol. Chem., 276:20428-20435 (2001)). La expresión ectópica de *HAS2* aumenta la secreción de HA e induce la formación de recubrimientos de hialuronano (Kosaki y col., anteriormente). Además, se cree que *HAS2* es importante para la transformación mediada por hialuronano de epitelio a mesénquima durante la

35 morfogénesis cardíaca (Camenisch y col., J. Clin. Invest., 106:349-360 (2000)).

Debido a que la transición de epitelio a mesénquima también es importante para la invasión y la metástasis tumorales, se postula que HAS2 desempeña una función importante en la progresión de tumores epiteliales (Boyer y col., *Biochem. Pharmacol.*, 60:1091-1099 (2000); Hay, *Acta Anat.*, 154:8-20 (1995); Arias, *Cell*, 105:425-431 (2001)). Estos resultados indican que la secreción de HA inducida por WISP-1 puede ser importante para la invasión y la metástasis tumorales.

**[0089]** WISP-1 también indujo la expresión de dos receptores de HA, CD44 y RHAMM. Induciendo la expresión de receptores de HA y aumentando la producción de HA, WISP-1 puede activar un bucle autocrino y/o paracrino. La interacción de hialuronano con CD44 y RHAMM promueve la locomoción y proliferación de células *in vitro* y el crecimiento y la metástasis tumorales *in vivo* (Turley y col., *J. Biol. Chem.*, 277:4589-4592 (2002); Sy y col., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 213:129-153 (1996); Hall y col., *J. Neurooncol.*, 26:221-229 (1995)).

**[0090]** Los efectos de WISP-1 sobre la migración de células se analizaron en un ensayo de cicatrización de células y por microscopía a intervalos de tiempo, y los datos mostraron que la expresión de WISP-1 promovió la motilidad celular. Además, las células aisladas mostraron un aumento de la migración sugiriendo que la WISP-1 podría actuar mediante un mecanismo autocrino. Sin embargo, la WISP-1 recombinante purificada promovió la expresión de HAS2 y CD44 cuando se unió a una superficie. Esta inducción aumentó adicionalmente cuando la WISP-1 se unió mediante su interacción a decorina. Similarmente, la WISP-1 promovió la motilidad celular cuando estaba unida a la superficie, sugiriendo que WISP-1 también puede actuar mediante un mecanismo paracrino cuando se une a un sustrato. Los ejemplos en este documento muestran que la motilidad celular inducida por WISP-1 estaba mediada por CD44, aboliendo la migración con un anticuerpo dirigido contra CD44. La motilidad celular inducida por WISP-1 también se inhibió por anticuerpos de WISP-1. Además, la actividad haptotáctica de WISP-1 no se limitó a un único tipo de células ya que indujo tanto la migración de fibroblastos normales como de células de adenocarcinoma de colon.

**[0091]** Debido a que se creía que WISP-1 era un efector en la dirección 3' de Wnt-1, la línea celular C57MG/Wnt-1 se analizó para fenotipos encontrados en células NRK/WISP-1. Consistente con una función para WISP-1 en la dirección 3' de Wnt-1, las células C57MG/Wnt-1 expresaron en exceso HAS2 y CD44 y tuvieron mayor contenido en proteína de CD44 en comparación con la línea celular parental. Además, las células C57/Wnt-1 se dispersaron espontáneamente en cultivo y demostraron una

morfología fusiforme desdiferenciada similar a células NRK/WISP-1H.

**[0092]** El análisis de expresión también se realizó en un grupo de tumores mamarios MMTV-Wnt-1, y en todos los tumores mamarios de los ratones transgénicos MMTV-Wnt-1 se detectó una elevada expresión de CD44 y HAS2. En estos tumores, la expresión de WISP-1 estaba localizada en los fibroblastos del estroma, mientras que CD44 y HAS2 fueron expresados por células epiteliales tumorales. Aunque fue negativo para la expresión de HAS2, el estroma peritumoral contuvo altos niveles de HA, mientras que el parénquima tumoral sólo se tiñó débilmente para HA. Aunque se acepta generalmente que los fibroblastos son responsables de la producción de HA, el origen del HA del estroma no se conoce definitivamente. Como la expresión de HAS2 sólo se encontró en el parénquima, los resultados experimentales desvelados en este documento sugieren que las células tumorales son responsables de la síntesis y la deposición de HA en el estroma. La acumulación de hialuronano en el estroma peritumoral se encuentra frecuentemente en varios tipos de tumores y se informó previamente para adenocarcinomas de ovario, mama, próstata y colon (Ropponen y col., Cancer Res., 58:342-347 (1998); Lipponen y col., Eur. J. Cancer, 37:849-856 (2001); Auvinen y col., Am. J. Patol., 156:529-536 (2000); Anttila y col., Cancer Res., 60:150-155 (2000)). Además, un alto nivel de HA en el estroma se asoció a una escasa diferenciación, comportamiento metastásico y pronóstico desfavorable.

**[0093]** Debido a que el HA y el CD44 están asociados a invasión tumoral, el potencial metastásico de las células que expresan WISP-1 se evaluó *in vivo*. Después de la inoculación en la cola, las células NRK/WISP-1 colonizaron fácilmente los pulmones de ratones inyectados y formaron tumores invasivos. Las células NRK/WISP-1 presentaron un potencial metastásico significativo, pero no las células NRK. La observación histológica reveló que las células NRK/WISP-1 poblaron la vasculatura e invadieron las vías pulmonares. La colonización del pulmón fue proporcional al número de células inyectado, el tiempo después de la inyección y la expresión de WISP-1. Además, el solicitante encontró que el potencial metastásico era proporcional a los niveles de expresión de CD44 y HAS2, y el tratamiento de ratones inoculados con células NRK/WISP-1H con anticuerpo CD44 o anticuerpo de WISP-1 disminuyó enormemente el número y el tamaño de los tumores en el pulmón. Por tanto, es probable que los niveles de WISP-1 promovieran la colonización del pulmón mediante un mecanismo de hialuronano-CD44. Esto concuerda con informes previos que demuestran la importancia de CD44 y su interacción con HA para el crecimiento, la metástasis y la retención tumorales de células metastásicas para la vasculatura del

pulmón (Sy y col., anteriormente; Kogerman y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 94:13233-13238 (1997)).

**[0094]** Aunque la activación de la ruta de Wnt por mutaciones de APC o  $\beta$ -catenina puede estar normalmente asociada a cáncer colorrectal, varias líneas de evidencia sugieren que también desempeña una función en otros tipos de cáncer que incluyen adenocarcinoma mamario (Polakis, Genes Dev., 14:1837-1951 (2000); Brown, Breast Cancer Res., 3:351-355 (2001)). Se encontraron truncación de APC y aumento de los niveles de  $\beta$ -catenina en líneas celulares de cáncer de mama humano (Schlosshauer y col., Carcinogenesis, 21:1453-1456 (2000)). Las mutaciones somáticas del gen APC se encontraron en cánceres de mama primarios (Furuuchi y col., Am. J. Patol., 156:1997-2005 (2000)). Además, las mutaciones activadoras de  $\beta$ -catenina promueven adenocarcinomas mamarios de ratón. Michaelson y col., Oncogene, 20:5525-5532 (2001)). Se encontraron niveles elevados de Wnt-1 y  $\beta$ -catenina en carcinomas ductales invasivos de mama y guardaron relación con un mal pronóstico (Lin y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 97:4262-4266 (2000)). Por tanto, es posible que la expresión de WISP-1 encontrada en ciertos adenocarcinomas de mama resultara de la activación de la ruta de Wnt. Los solicitantes también han encontrado por análisis Taqman que WISP-1 está sobreexpresada en cánceres tales como tumores de mama y de la glía.

**[0095]** Al menos por estas razones se cree que los antagonistas de WISP-1 serán particularmente útiles en el tratamiento y el diagnóstico de diversos trastornos patológicos tales como cáncer. Por consiguiente, la presente invención proporciona procedimientos para modular, bloquear o neutralizar la actividad de WISP-1 en células de mamífero que comprende exponer las células a una cantidad deseada de antagonista de WISP-1 como se describe en este documento. Preferentemente, la cantidad de antagonista de WISP-1 empleada será una cantidad eficaz para reducir o inhibir el crecimiento, la metástasis o la motilidad celular cancerosas. Esto puede llevarse a cabo *in vivo* o *ex vivo*, por ejemplo, según los procedimientos descritos más adelante y en los ejemplos. Afecciones o trastornos a modo de ejemplo que van a tratarse con tales antagonistas de WISP-1 incluyen afecciones en mamíferos denominadas clínicamente cáncer.

**[0096]** En este documento también se describen procedimientos de diagnóstico. Por ejemplo, los antagonistas pueden emplearse para detectar cánceres invasivos o metastásicos. La molécula de antagonista puede usarse, por ejemplo, en ensayos para detectar o cuantificar células cancerosas metastásicas en una muestra. Una muestra, tal

como células obtenidas de un mamífero, puede incubarse en presencia de un antagonista marcado, y puede realizarse la detección del antagonista marcado unido en la muestra.

**[0097]** Los antagonistas que pueden emplearse en los procedimientos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos de WISP-1. En este documento se describen diversas técnicas que pueden emplearse para preparar los antagonistas. Por ejemplo, se describen procedimientos y técnicas para preparar polipéptidos WISP-1. También se describen otras modificaciones de los polipéptidos, y anticuerpos para WISP-1.

**[0098]** Además del polipéptido WISP-1 de la secuencia natural de longitud completa descrito en este documento, se contempla que pueden prepararse variantes del polipéptido WISP-1. Las variantes de WISP-1 pueden prepararse introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ADN codificante, y/o mediante síntesis del polipéptido deseado. Aquellos expertos en la materia apreciarán que los cambios de aminoácidos pueden alterar procedimientos postraduccionales del polipéptido WISP-1 tales como cambiar el número o la posición de sitios de glicosilación o alterar las características de anclaje a la membrana.

**[0099]** Las variaciones en los polipéptidos WISP-1 descritas en este documento pueden hacerse, por ejemplo, usando cualquiera de las técnicas y pautas para mutaciones conservativas y no conservativas expuestas, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n° 5.364.934. Las variaciones pueden ser una sustitución, delección o inserción de uno o más codones que codifican el polipéptido que produce un cambio en la secuencia de aminoácidos en comparación con el polipéptido de secuencia natural. Opcionalmente, la variación se realiza por sustitución de al menos un aminoácido con cualquier otro aminoácido en uno o más de los dominios del polipéptido WISP-1. La orientación para determinar qué residuo de aminoácido puede insertarse, sustituirse o deleccionarse sin afectar adversamente la actividad deseada puede encontrarse comparando la secuencia del polipéptido WISP-1 con las de moléculas de proteínas conocidas homólogas y minimizando el número de cambios de secuencias de aminoácidos hechos en regiones de alta homología. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser el resultado de sustituir un aminoácido por otro aminoácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas similares tales como la sustitución de una leucina por una serina, es decir, sustituciones de aminoácidos conservativos. Las inserciones o delecciones puede estar opcionalmente en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida puede determinarse produciendo sistemáticamente inserciones, delecciones o sustituciones de aminoácidos

en la secuencia y probando las variantes resultantes para la actividad mostrada por la secuencia natural de longitud completa o madura.

**[0100]** En este documento se proporcionan fragmentos de polipéptidos WISP-1. Tales fragmentos pueden estar truncados en el extremo N o extremo C, o pueden  
5 carecer de restos internos, por ejemplo, cuando se comparan con una proteína natural de longitud completa. Ciertos fragmentos carecen de restos de aminoácidos que no son esenciales para una actividad biológica deseada del polipéptido WISP-1.

**[0101]** Los fragmentos de polipéptidos WISP-1 pueden prepararse por distintas técnicas convencionales. Los fragmentos de péptidos deseados pueden sintetizarse  
10 químicamente. Una solución alternativa implica generar fragmentos de polipéptidos por digestión enzimática, por ejemplo, tratando la proteína con una enzima conocida por escindir proteínas en sitios definidos por restos de aminoácidos particulares, o digiriendo el ADN con enzimas de restricción adecuadas y aislando el fragmento deseado. Otra técnica adicional adecuada implica aislar y amplificar un fragmento de  
15 ADN que codifica un fragmento de polipéptido deseado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los oligonucleótidos que definen los extremos deseados del fragmento de ADN se emplean en los cebadores de 5' y 3' en la PCR.

**[0102]** Las sustituciones conservativas de interés se muestran en la tabla de más adelante bajo el encabezamiento de Sustituciones preferidas. Si tal sustitución produce  
20 un cambio en la actividad biológica, entonces se introducen más cambios sustanciales, denominados Sustituciones a modo de ejemplo en la tabla, o como se describe adicionalmente más adelante en referencia a clases de aminoácidos, y los productos se criban.

25

Tabla

| Resto original | Sustituciones a modo de ejemplo | Sustituciones preferidas |
|----------------|---------------------------------|--------------------------|
| Ala (A)        | val; leu; ile                   | val                      |
| Arg (R)        | lys; gln; asn                   | lys                      |
| Asn (N)        | gln; his; lys; arg              | gln                      |
| Asp (D)        | glu                             | glu                      |
| Cys (C)        | ser                             | aer                      |
| Gln (Q)        | asn                             | asn                      |
| Glu (E)        | asp                             | asp                      |

|         |                                        |     |
|---------|----------------------------------------|-----|
| Gly (G) | pro; ala                               | ala |
| Bis (H) | asn; gln; lys; arg                     | arg |
| Ile (I) | leu; val; met; ala; phe;<br>norleucina | leu |
| Leu (L) | norleucina; ile; val;<br>met; ala; phe | ile |
| Lys (K) | arg; gln; asn                          | arg |
| Met (M) | leu; phe; ile                          | leu |
| Phe (F) | leu; val; ile ala; tyr                 | leu |
| Pro (P) | ala                                    | ala |
| Ser (S) | thr                                    | thr |
| The (T) | ser                                    | ser |
| Trp (W) | tyr; phe                               | tyr |
| Tyr (Y) | trp; phe; thr; ser                     | phe |
| val (V) | ile; leu; met; phe; ala; norleucina    | leu |

**[0103]** Las modificaciones sustanciales en la función o identidad inmunológica del polipéptido WISP-1 se llevan a cabo seleccionando sustituciones que se diferencian significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura del esqueleto de polipéptidos en el área de la sustitución, por ejemplo, como una hoja o  
5 conformación helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) la voluminosidad de la cadena lateral. Los restos que se producen naturalmente se dividen en grupos basándose en propiedades comunes de cadenas laterales:

- (1) hidrófobos: norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrófilos neutros: cys, ser, thr;
- 10 (3) ácidos: asp, glu;
- (4) básicos: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) restos que influyen en la orientación de cadenas: gly, pro; y
- (6) aromáticos: trp, tyr, phe.

**[0104]** Las sustituciones no conservativas implicarán intercambiar un miembro de  
15 una de estas clases por otra clase. Tales restos sustituidos también pueden introducirse en los sitios de sustitución conservativa o, más preferentemente, en los restantes sitios (no conservados).

**[0105]** Las variaciones pueden hacerse usando procedimientos conocidos en la técnica tales como mutagénesis mediada por oligonucleótidos (dirigida a sitio),  
20 exploración con alanina y mutagénesis por PCR. La mutagénesis dirigida a sitio

[Carter y col., Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986); Zoller y col., Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987)], la mutagénesis por casete [Wells y col., Gene, 34:315 (1985)], la mutagénesis con selección de restricción [Wells y col., Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 (1986)] u otras técnicas conocidas pueden realizarse en el ADN clonado  
5 para producir el ADN variante del polipéptido WISP-1.

**[0106]** El análisis de aminoácidos por barrido también puede emplearse para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua. Entre los aminoácidos por para barrido preferidos se encuentran aminoácidos neutros relativamente pequeños. Tales aminoácidos incluyen alanina, glicina, serina y cisteína.  
10 La alanina es normalmente un aminoácido de barrido preferido entre este grupo porque elimina la cadena lateral más allá del carbono beta y es menos probable que altere la conformación de la cadena principal de la variante [Cunningham y Wells, Science, 244:1081-1085 (1989)]. La alanina también se prefiere normalmente porque es el aminoácido más habitual. Además, se encuentra frecuentemente en posiciones tanto  
15 enterradas como expuestas [Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150:1 (1976)]. Si la sustitución de alanina no proporciona cantidades adecuadas de variante, puede usarse un aminoácido isotérico.

**[0107]** Cualquier resto de cisteína que no participe en el mantenimiento de la conformación apropiada del polipéptido WISP-1 también puede ser sustituido,  
20 generalmente por serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar la reticulación anómala. En cambio, el (los) enlace(s) de cisteína puede(n) añadirse al polipéptido WISP-1 para mejorar su estabilidad.

**[0108]** La descripción siguiente se refiere principalmente a la producción de polipéptidos WISP-1 cultivando células transformadas o transfectadas con un vector  
25 que contiene ácido nucleico que codifica el polipéptido WISP-1. Por supuesto, se contempla que pueden emplearse procedimientos alternativos, que son muy conocidos en la técnica, para preparar polipéptidos WISP-1. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos apropiada, o porciones de la misma, puede producirse por síntesis directa de péptidos usando técnicas en fase sólida [véanse, por ejemplo, Stewart y col., Solid-  
30 Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963)]. La síntesis de proteína *in vitro* puede realizarse usando técnicas manuales o automatizadas. La síntesis automatizada puede llevarse a cabo, por ejemplo, usando un sintetizador de péptidos de Applied Biosystems (Foster City, CA) usando las instrucciones del fabricante. Diversas  
35 porciones del polipéptido WISP-1 pueden sintetizarse químicamente por separado y

combinarse usando procedimientos químicos o enzimáticos para producir el polipéptido WISP-1 deseado. Los procedimientos y técnicas descritos pueden aplicarse similarmente a la producción de variantes de WISP-1, formas modificadas de WISP-1 y anticuerpos de WISP-1.

5 1. Aislamiento del ADN que codifica el polipéptido WISP-1

**[0109]** El ADN que codifica el polipéptido WISP-1 puede obtenerse de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido que se cree posee el ARNm del polipéptido WISP-1 y lo expresa a un nivel detectable. Por consiguiente, el ADN del polipéptido WISP-1 humano puede obtenerse convenientemente a partir de una  
10 biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido humano. El gen que codifica el polipéptido WISP-1 también puede obtenerse de una biblioteca genómica o por procedimientos de síntesis conocidos (por ejemplo, síntesis automática de ácidos nucleicos).

**[0110]** Las bibliotecas pueden cribarse con sondas (tales como oligonucleótidos  
15 de al menos aproximadamente 20-80 bases) diseñadas para identificar el gen de interés o la proteína codificada por él. El cribado del ADNc o la biblioteca genómica con la sonda seleccionada puede realizarse usando procedimientos habituales tal como se describen en Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Un medio alternativo para aislar el  
20 gen que codifica el polipéptido WISP-1 es usar metodología PCR [Sambrook y col., anteriormente; Dieffenbach y col., PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

**[0111]** Las técnicas para cribar una biblioteca de ADNc son muy conocidas en la técnica. Las secuencias de oligonucleótidos seleccionadas como sondas deben ser de  
25 longitud suficiente y suficientemente inequívocas de forma que se minimicen falsos positivos. El oligonucleótido está preferentemente marcado de forma que pueda detectarse tras la hibridación con ADN en la biblioteca que está cribándose. Los procedimientos de marcado son muy conocidos en la técnica e incluyen el uso de radiomarcas como ATP marcado con  $^{32}\text{P}$ , biotinilación o marcado con enzimas. Las  
30 condiciones de hibridación, que incluyen rigurosidad moderada y alta rigurosidad, se proporcionan en Sambrook y col., anteriormente.

**[0112]** Las secuencias identificadas en tales procedimientos de cribado de bibliotecas pueden compararse y alinearse con otras secuencias conocidas depositadas y disponibles en bases de datos públicas tales como GenBank u otras bases de datos de  
35 secuencias privadas. La identidad de secuencias (a tanto el nivel de aminoácidos como

de nucleótidos) dentro de regiones definidas de la molécula o a través de la secuencia de longitud completa puede determinarse usando procedimientos conocidos en la técnica y como se describen en este documento.

**[0113]** La secuencia que codifica proteínas que tienen ácidos nucleicos puede obtenerse cribando ADNc seleccionado o bibliotecas genómicas usando la secuencia de aminoácidos deducida desvelada en este documento por primera vez y, si fuera necesario, usando procedimientos de extensión de cebadores convencionales como se describe en Sambrook y col., anteriormente, para detectar precursores y productos intermedios de procesamiento de ARNm que pueden no haber sido transcritos de forma inversa en ADNc.

## 2. Selección y transformación de células hospedadoras

**[0114]** Las células hospedadoras se transfectan o transforman con vectores de expresión o de clonación descritos en este documento para la producción de polipéptidos WISP-1 y se cultivan en medio nutriente convencional modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. Las condiciones de cultivo, tales como medio, temperatura, pH y similares, pueden seleccionarse por el experto sin experimentación adicional. En general, los principios, protocolos y técnicas prácticas para maximizar la productividad de cultivos celulares pueden encontrarse en Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) y Sambrook y col., anteriormente.

**[0115]** Los procedimientos de transfección de células eucariotas y transformación de células procariotas son conocidos para el experto general, por ejemplo,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{CaPO}_4$ , mediados por liposomas y electroporación. Dependiendo de la célula hospedadora usada, la transformación se realiza usando técnicas habituales apropiadas para tales células. El tratamiento con calcio que emplea cloruro de calcio, como se describe en Sambrook y col., anteriormente, o la electroporación se usan generalmente para procariotas. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se usa para la transformación de ciertas células vegetales como se describe por Shaw y col., Gene, 23:315 (1983) y el documento WO 89/05859 publicado el 29 de junio de 1989. Para células de mamífero sin tales paredes celulares puede emplearse el procedimiento de precipitación con fosfato de calcio de Graham y van der Eb, Virology, 52:456-457 (1978). Los aspectos generales de las transfecciones del sistema huésped de células de mamífero se han descrito en la patente de EE.UU. n° 4.399.216. Las transformaciones en levadura se llevan a cabo normalmente según el procedimiento de Van Solingen y

col., J. Bact., 130:946 (1977) y Hsiao y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76:3829 (1979). Sin embargo, también pueden usarse otros procedimientos para introducir ADN en células tales como por microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplastos bacterianos con células intactas o policondones, por ejemplo, polibreno, 5 poliornitina. Para diversas técnicas para transformar células de mamífero véanse Keown y col., Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990) y Mansour y col., Nature, 336:348-352 (1988).

**[0116]** Las células hospedadoras adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores en este documento incluyen células procariotas, de levadura o de eucariotas 10 superiores. Procariotas adecuados incluyen, pero no se limitan a, eubacterias tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, Enterobacteriaceae tales como *E. coli*. Diversas cepas de *E. coli* están públicamente disponibles tales como la cepa MM294 de *E. coli* K12 (ATCC 31,446); X1776 de *E. coli* (ATCC 31.537); cepa W3110 de *E. coli* (ATCC 27,325) y K5 772 (ATCC 53.635). Otras 15 células hospedadoras procariotas adecuadas incluyen Enterobacteriaceae tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescens* y *Shigella*, además de *Bacilli* tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, 41P de *B. licheniformis* desvelada en el documento DD 266.710 publicado el 20 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, y *Streptomyces*. Estos ejemplos son ilustrativos en vez de limitantes. La cepa W3110 es un huésped o huésped parental particularmente preferido ya que es una cepa huésped común para fermentaciones de productos de ADN recombinante. Preferentemente, la célula hospedadora secreta cantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la cepa 25 W3110 puede modificarse para efectuar una mutación genética en los genes que codifican proteínas endógenas para el huésped, incluyendo ejemplos de tales huéspedes la cepa 1A2 de *E. coli* W3110, que tiene el genotipo completo *tonA*; cepa 9E4 de *E. coli* W3110, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3*; cepa 27C7 de *E. coli* W3110 (ATCC 55.244), que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac) 169 degP ompT kan<sup>r</sup>*; cepa 37D6 de *E. coli* W3110, que tiene el genotipo 30 completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan<sup>r</sup>*; cepa 40B4 de *E. coli* W3110, que es la cepa 37D6 con una mutación por delección *degP* resistente a no kanamicina; y una cepa de *E. coli* que tiene proteasa periplásmica mutante desvelada en la patente de EE.UU. n° 4.946.783 concedida el 7 de agosto de 1990. 35 Alternativamente son adecuados procedimientos de clonación *in vitro*, por ejemplo,

PCR u otras reacciones de polimerasa de ácido nucleico.

**[0117]** Además de los procariotas, los microbios eucariotas tales como hongos filamentosos o levadura son huéspedes de clonación o expresión adecuados para los vectores que codifican polipéptidos WISP-1. *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo huésped eucariota inferior comúnmente usado. Otros incluyen *Schizosaccharomyces pombe* (Beach y Nurse, Nature, 290: 140 [1981]; documento EP 139.383 publicado el 2 de mayo de 1985); huéspedes de *Kluyveromyces* (patente de EE.UU. n° 4.943.529; Fler y col., Bio/Technology, 9:968-975 (1991)) tales como, por ejemplo, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt y col., J. Bacteriol., 154(2):737-742 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilum* (ATCC 36.906; Van den Berg y col., Bio/Technology, 8:135 (1990)), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *yarrowia* (documento EP 402.226); *Pichia pastoris* (documento EP 183.070; Sreekrishna y col., J. Basic Microbiol., 28:265-278 [1988]); *Candida*; *Trichoderma reesei* (documento EP 244.234); *Neurospora crassa* (Case y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5259-5263 [1979]); *Schwanniomyces* tales como *Schwanniomyces occidentalis* (documento EP 394.538 publicado el 31 de octubre de 1990); y hongos filamentosos tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* (documento WO 91/00357 publicado el 10 de enero de 1991) y huéspedes de *Aspergillus* tales como *A. nidulans* (Ballance y col., Biochem. Biophys. Res. Commun., 112:284-289 [1983]; Tilburn y col., Gene, 26:205-221 [1983]; Yelton y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 1470-1474 [1984]) y *A. niger* (Kelly y Hynes, EMBO J., 4:475-479 [1985]). Las levaduras metilotróficas son adecuadas en este documento e incluyen, pero no se limitan a, levadura capaz de crecer en metanol seleccionada de los géneros que están constituidos por *Hansenula*, *Candida*, *Kloeckera*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* y *Rhodotorula*. Una lista de especies específica que son a modo de ejemplo de esta clase de levaduras puede encontrarse en C. Anthony, The Biochemistry of Methylotrrophs, 269 (1982).

**[0118]** Las células hospedadoras adecuadas para la expresión del polipéptido WISP-1 glicosilado se derivan de organismos multicelulares. Ejemplos de células de invertebrados incluyen células de insecto tales como *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9, además de células vegetales tales como cultivos celulares de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco. Se han identificado numerosas cepas baculovirales y variantes y células hospedadoras de insecto permisivas correspondientes de huéspedes tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus*

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

**[0119]** Sin embargo, el mayor interés corresponde a células de vertebrados, y la propagación de células de vertebrados en cultivo (cultivo de tejido) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Ejemplos de líneas celulares huésped de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 10 1651); línea de riñón de embrión humano (células 293 ó 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham y col., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); células de riñón de bebés de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:9216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); 15 células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); 20 tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather y col., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

**[0120]** Las células hospedadoras se transforman con los vectores de expresión o de clonación anteriormente descritos para la producción de polipéptidos WISP-1 y se 25 cultivan en medio nutriente convencional modificado según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

### 3. Selección y uso de un vector replicable

**[0121]** El polipéptido WISP-1 que codifica ácidos nucleicos (por ejemplo, ADNc 30 o ADN genómico) puede insertarse en un vector replicable para clonación (amplificación del ADN) o para expresión. Diversos vectores están públicamente disponibles. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de un plásmido, cósmido, partícula viral o fago. La secuencia de ácidos nucleicos apropiada puede insertarse en el vector mediante una variedad de procedimientos. En general, el ADN se inserta en 35 un sitio(s) de endonucleasas de restricción apropiado(s) usando técnicas conocidas en

la técnica. Los componentes de vector incluyen generalmente, pero no se limitan a, uno o más de una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción. La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de  
 5 estos componentes emplea técnicas de ligación habituales que son conocidas para el experto.

**[0122]** WISP-1 puede producirse recombinantemente no sólo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia señal u otro polipéptido que tenga un sitio de escisión específico en el  
 10 extremo N de la proteína o polipéptido maduro. En general, la secuencia señal puede ser un componente del vector, o puede ser una parte del ADN que codifica el polipéptido WISP-1 que se inserta en el vector. La secuencia señal puede ser una secuencia señal procariota seleccionada, por ejemplo, del grupo de la fosfatasa alcalina, penicilinas, Ipp o líderes de enterotoxina II estables al calor. Para la  
 15 secreción de levaduras, la secuencia señal puede ser, por ejemplo, el líder de la levadura invertasa, líder del factor alfa (incluyendo líderes de factor  $\alpha$  de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, este último descrito en la patente de EE.UU. nº 5.010.182), o líder de fosfatasa ácida, el líder de glucoamilasa de *C. albicans* (documento EP 362.179 publicado el 4 de abril de 1990), o la señal descrita en el  
 20 documento WO 90/13646 publicado el 15 de noviembre de 1990. En la expresión de células de mamífero, las secuencias señal de mamíferos pueden usarse para dirigir la secreción de la proteína, tal como secuencias señal de polipéptidos secretados de la misma especie o relacionadas, además de líderes secretorios virales.

**[0123]** Los vectores tanto de expresión como de clonación contienen una  
 25 secuencia de ácidos nucleicos que permite que el vector se replique en una o más células hospedadoras seleccionadas. Tales secuencias son muy conocidas para una variedad de bacterias, levadura y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias Gram-negativas, el origen de plásmidos 2 $\mu$  es adecuado para levadura, y diversos orígenes virales (SV40, poliovirus, adenovirus,  
 30 VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamífero.

**[0124]** Los vectores de expresión y de clonación contendrán normalmente un gen de selección, también llamado un marcador de selección. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan  
 35 deficiencias auxotróficas, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles a partir

de medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica D-alanina racemasa para *Bacilli*.

**[0125]** Un ejemplo de marcadores de selección adecuados para células de mamífero son aquellos que permiten la identificación de células competentes para recibir el ácido nucleico que codifica el polipéptido WISP-1 tal como DHFR o timidina cinasa. Una célula hospedadora apropiada cuando se emplea DHFR natural es la línea celular CHO deficiente en actividad de DHFR, preparada y propagada como se describe por Urlaub y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980). Un gen de selección adecuado para uso en levadura es el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura YRp7 [Stinchcomb y col., Nature, 282:39 (1979); Kingsman y col., Gene, 7:141 (1979); Tschemper y col., Gene, 10:157 (1980)]. El gen *txp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de capacidad para crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC nº 44076 o PEP4-1 [Jones, Genetics, 85:12 (1977)].

**[0126]** Los vectores de expresión y de clonación contienen normalmente un promotor operativamente ligado a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido WISP-1 para dirigir la síntesis de ARNm. Los promotores reconocidos mediante una variedad de posibles células hospedadoras son muy conocidos. Los promotores adecuados para uso con huéspedes procariotas incluyen los sistemas promotores de  $\beta$ -lactamasa y lactosa [Chang y col., Nature, 275:615 (1978); Goeddel y col., Nature, 281:544 (1979)], fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (*trp*) [Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); documento EP 36.776] y promotores híbridos tales como el promotor *tac* [deBoer y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)]. Los promotores para uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia Shine-Dalgarno (S.D.) operativamente ligada al ADN que codifica el polipéptido WISP.

**[0127]** Ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para uso con huéspedes de levadura incluyen los promotores para 3-fosfoglicerato cinasa [Hitzeman y col., J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)] u otras enzimas glicolíticas [Hess y col., J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900 (1978)] tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato cinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucocinasa.

**[0128]** Otros promotores de levadura que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de la transcripción controlada por condiciones de crecimiento son las

regiones promotoras para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradantes asociadas al metabolismo de nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Vectores y promotores adecuados para uso en la expresión de levadura se describen adicionalmente en el documento EP 73.657.

**[0129]** La transcripción de polipéptidos WISP a partir de vectores en células hospedadoras de mamífero está controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos a partir de los genomas de virus tales como virus del polio, virus de la viruela aviar (documento UK 2.211.504 publicado el 5 de julio de 1989), adenovirus (tal como adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y virus simio 40 (SV40), de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, y de promotores de choque térmico, siempre que tales promotores sean compatibles con los sistemas de células hospedadoras.

**[0130]** La transcripción de un ADN que codifica el polipéptido WISP-1 por eucariotas superiores puede aumentarse insertando una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos de ADN que actúan en cis, normalmente aproximadamente de 10 a 300 pb, que actúan en un promotor para aumentar su transcripción. Ahora se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina,  $\alpha$ -fetoproteína, e insulina). Sin embargo, normalmente se usará un potenciador de un virus de células eucariotas. Ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (100-270 pb), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polio en el lado tardío del origen de replicación y los potenciadores de adenovirus. El potenciador puede cortarse y empalmarse en el vector en una posición 5' ó 3' con respecto a la secuencia que codifica polipéptidos WISP-1, pero preferentemente está localizado en un sitio 5' del promotor.

**[0131]** Los vectores de expresión usados en células hospedadoras eucariotas (células de levadura, de hongo, de insecto, vegetales, animales, humanas o nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Tales secuencias están comúnmente disponibles a partir de regiones sin traducir en 5' y, ocasionalmente 3', de ADN o ADNc de eucariota o viral. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción sin traducir del ARNm que codifica el polipéptido WISP-1.

**[0132]** Todavía otros procedimientos, vectores y células hospedadoras adecuados para la adaptación a la síntesis del polipéptido WISP en cultivo de células de vertebrados recombinantes se describen en Gething y col., *Nature*, 293:620-625 (1981); Mantei y col., *Nature*, 281:40-46 (1979); documentos EP 117.060; y EP 5 117.058.

#### 4. Cultivo de células hospedadoras

**[0133]** Las células hospedadoras usadas para producir el polipéptido WISP de esta invención pueden cultivarse en una variedad de medios. Para cultivar las células hospedadoras son adecuados medios de cultivo comercialmente disponibles tales como  
 10 Ham's F10 (Sigma), medio esencial mínimo ((MEM), (Sigma)), RPMI-1640 (Sigma) y medio de Eagle modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma). Además, cualquiera de los medios descritos en Ham y col., *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes y col., *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), patentes de EE.UU. nº 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; documentos WO 90/03430; WO 87/00195; o la patente de  
 15 EE.UU. Re. 30.985. Cualquiera de estos medios puede complementarse según se necesite con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tal como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCIN™),  
 20 oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos normalmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También puede incluirse cualquier otro componente necesario a concentraciones apropiadas que serían conocidas para aquellos expertos en la materia. Las condiciones de cultivo tales como temperatura, pH y similares son aquellas  
 25 previamente usadas con la célula hospedadora seleccionada para expresión, y serán evidentes para el experto general.

#### 5. Detección de la amplificación/expresión génica

**[0134]** La amplificación y/o expresión génica puede medirse en una muestra directamente, por ejemplo, mediante transferencia Southern convencional,  
 30 transferencia de Northern para cuantificar la transcripción de ARNm [Thomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:5201-5205 (1980)], transferencia por puntos (análisis de ADN) o hibridación *in situ* usando una sonda apropiadamente marcada basándose en las secuencias proporcionadas en este documento. Alternativamente pueden emplearse anticuerpos que pueden reconocer dúplex específicos que incluyen dúplex de ADN,  
 35 dúplex de ARN y dúplex híbridos de ADN-ARN o dúplex de ADN-proteína. A su vez,

los anticuerpos pueden estar marcados y el ensayo puede llevarse a cabo cuando el dúplex está unido a una superficie, de manera que tras la formación del dúplex sobre la superficie pueda detectarse la presencia de anticuerpo unido al dúplex.

**[0135]** Alternativamente, la expresión génica puede medirse por procedimientos inmunológicos tales como tinción inmunohistoquímica de células o secciones de tejido y ensayo de cultivo celular o fluidos corporales para cuantificar directamente la expresión de producto génico. Anticuerpos útiles para tinción inmunohistoquímica y/o ensayo de fluidos de muestra pueden ser tanto monoclonales como policlonales, y pueden prepararse en cualquier mamífero. Convenientemente, los anticuerpos pueden prepararse contra un polipéptido WISP de secuencia natural o contra un péptido sintético basado en las secuencias de ADN proporcionadas en este documento o contra secuencia exógena fusionada a ADN de WISP y que codifique un epítipo de anticuerpo específico.

#### 6. Purificación del polipéptido WISP

**[0136]** Las formas del polipéptido WISP pueden recuperarse a partir de medio de cultivo o de lisados de células hospedadoras. Si está unido a membrana puede desprenderse de la membrana usando una disolución de detergente adecuado (por ejemplo, Triton-X 100) o mediante escisión enzimática. Las células empleadas en la expresión del polipéptido WISP-1 pueden romperse por diversos medios físicos o químicos tales como ciclos de congelación-descongelación, sonicación, rotura mecánica o agentes de lisado de células.

**[0137]** Puede desearse purificar polipéptidos WISP-1 a partir de proteínas de células recombinantes o polipéptidos. Los siguientes procedimientos son a modo de ejemplo de procedimientos de purificación adecuados: por fraccionamiento sobre una columna de intercambio iónico; precipitación con etanol; HPLC de fase inversa; cromatografía sobre sílice o sobre una resina de intercambio catiónico tal como DEAE; cromatografía de afinidad; SDS-PAGE; precipitación con sulfato de amonio; filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75; columnas de proteína A-Sepharose para eliminar contaminantes tales como IgG; y columnas quelantes de metales para unir formas marcadas con epítopos del polipéptido WISP-1. Pueden emplearse diversos procedimientos de purificación de proteínas y tales procedimientos se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en Deutscher, *Methods in Enzymology*, 182 (1990) Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice*, Springer-Verlag, Nueva York (1982). La(s) etapa(s) de purificación seleccionada(s) dependerá(n), por ejemplo, de la naturaleza del procedimiento de producción usado y del polipéptido WISP-1

particular producido.

**[0138]** Las formas solubles de WISP-1 pueden emplearse como antagonistas en los procedimientos. Tales formas solubles de WISP-1 pueden comprender modificaciones como se describen más adelante (tales como fusionando a una 5 inmunoglobulina, marca de epítipo o cremallera de leucina). Las moléculas de inmunoadhesina se contemplan adicionalmente para uso en los procedimientos en este documento. Las inmunoadhesinas de WISP-1 pueden comprender diversas formas de WISP-1 tales como el polipéptido de longitud completa, además de formas solubles de WISP-1 o fragmentos del mismo. La molécula puede comprender una fusión del 10 polipéptido WISP-1 a una inmunoglobulina o a regiones particulares de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la inmunoadhesina, una fusión tal podría ser a la región Fc de una molécula de IgG. Las fusiones a Ig incluyen preferentemente la sustitución de una forma soluble (dominio transmembrana delecionado o inactivado) del polipéptido en lugar de al menos una región variable 15 dentro de una molécula de Ig. En un ejemplo particularmente preferido, la fusión de inmunoglobulinas incluye las regiones bisagra, CH2 y CH3, o las regiones bisagra, CH1, CH2 y CH3 de una molécula de IgG1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulinas véanse también la patente de EE.UU. nº 5.428.130 concedida el 27 de junio de 1995 y Chamow y col., TIBTECH, 14:52-60 (1996).

20 **[0139]** La inmunoadhesina más simple y más sencilla combina el (los) dominio(s) de unión de la adhesina (por ejemplo, la WISP-1) con la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina. Generalmente, cuando se preparan las inmunoadhesinas, el ácido nucleico que codifica el dominio de unión de la adhesina se fusionará con el extremo C con respecto al ácido nucleico que codifica el extremo N de una secuencia 25 de dominio constante de inmunoglobulina; sin embargo, también son posibles las fusiones del extremo N.

**[0140]** Normalmente, en tales fusiones, los polipéptidos quiméricos codificados retendrán al menos el dominio bisagra, C<sub>H</sub>2 y C<sub>H</sub>3 funcionalmente activo de la región constante de una cadena pesada de inmunoglobulina. También se hacen fusiones al 30 extremo C de la porción Fc de un dominio constante, o inmediatamente al extremo N con respecto a la región C<sub>H</sub>1 de la cadena pesada o la región correspondiente de la cadena ligera. El sitio preciso en el que se hace la fusión no es crítico; los sitios particulares son muy conocidos y pueden seleccionarse con el fin de optimizar la actividad biológica, secreción o características de unión de la inmunoadhesina.

35 **[0141]** Preferentemente, la secuencia de adhesina está fusionada al extremo N de

la región Fo de la inmunoglobulina G<sub>1</sub> (IgG<sub>1</sub>). Es posible fusionar toda la región constante de la cadena pesada a la secuencia de adhesina. Sin embargo, en la fusión se usa más preferentemente una secuencia que empieza en la región bisagra justamente aguas arriba del sitio de escisión de la papaína que define Fc de IgG químicamente (es decir, el residuo 216, considerando que el primer residuo de la región constante de la cadena pesada es 114), o sitios análogos de otras inmunoglobulinas. En un ejemplo particularmente preferido, la secuencia de adhesina de aminoácidos está fusionada a (a) la región bisagra y C<sub>H</sub>2 y C<sub>H</sub>3 o (b) los dominios C<sub>H</sub>1, bisagra, C<sub>H</sub>2 y C<sub>H</sub>3, de una cadena pesada de IgG.

10 **[0142]** Para inmunoadhesinas biespecíficas, las inmunoadhesinas se ensamblan como multímeros, y particularmente como heterodímeros o heterotetrámeros. Generalmente, estas inmunoglobulinas ensambladas tendrán estructuras unitarias conocidas. Una unidad estructural básica de cuatro cadenas es la forma en la que existen IgG, IgD y IgE. Una unidad de cuatro cadenas se repite en las  
15 inmunoglobulinas de mayor peso molecular; la IgM generalmente existe como un pentámero de cuatro unidades básicas mantenidas juntas por enlaces disulfuro. La globulina IgA, y ocasionalmente la globulina IgG, también pueden existir en forma multimérica en suero. En el caso del multímero, cada una de las cuatro unidades puede ser igual o diferente.

20 **[0143]** Diversas inmunoadhesinas ensambladas a modo de ejemplo descritas en este documento se presentan esquemáticamente en un diagrama más adelante:

- (a) A<sub>C<sub>L</sub></sub>-A<sub>C<sub>L</sub></sub>;
- (b) A<sub>C<sub>H</sub></sub>-(A<sub>C<sub>H</sub></sub>, A<sub>C<sub>L</sub></sub>-A<sub>C<sub>H</sub></sub>, A<sub>C<sub>L</sub></sub>-V<sub>H</sub>C<sub>H</sub>, o V<sub>L</sub>C<sub>L</sub>-A<sub>C<sub>H</sub></sub>,
- (c) A<sub>C<sub>L</sub></sub>-A<sub>C<sub>H</sub></sub>-(A<sub>C<sub>L</sub></sub>-A<sub>C<sub>H</sub></sub>, A<sub>C<sub>L</sub></sub>-V<sub>H</sub>C<sub>H</sub>, V<sub>L</sub>C<sub>L</sub>-A<sub>C<sub>H</sub></sub>, o V<sub>L</sub>C<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>C<sub>K</sub>)
- 25 (d) A<sub>C<sub>L</sub></sub>-V<sub>H</sub>C<sub>H</sub>-(A<sub>C<sub>H</sub></sub>, o A<sub>C<sub>L</sub></sub>-V<sub>H</sub>C<sub>H</sub> o V<sub>L</sub>G<sub>L</sub>-A<sub>C<sub>H</sub></sub>);
- (e) V<sub>L</sub>C<sub>L</sub>-A<sub>C<sub>H</sub></sub>-(A<sub>C<sub>L</sub></sub>-V<sub>E</sub>C<sub>H</sub>, o V<sub>L</sub>C<sub>L</sub>-A<sub>C<sub>H</sub></sub>); y
- (f) (A-Y)<sub>n</sub>-(V<sub>L</sub>C<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>C<sub>H</sub>)<sub>2</sub>,

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

30 V<sub>L</sub> es un dominio variable de la cadena ligera de inmunoglobulina;

V<sub>H</sub> es un dominio variable de la cadena pesada de inmunoglobulina;

C<sub>L</sub> es un dominio constante de la cadena ligera de inmunoglobulina;

C<sub>H</sub> es un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina;

n es un número entero superior a 1;

35 Y designa el resto de un agente de reticulación covalente.

**[0144]** En aras de la brevedad, las estructuras anteriores sólo muestran características clave; no indican dominios de unión (J) u otros de las inmunoglobulinas, ni se muestran enlaces disulfuro. Sin embargo, cuando tales dominios se requieren para la actividad de unión, deben construirse para que estén  
5 presentes en las localizaciones corrientes que ocupan en las moléculas de inmunoglobulina.

**[0145]** Alternativamente, las secuencias de adhesina pueden insertarse entre las secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera de inmunoglobulina, de forma que se obtiene una inmunoglobulina que comprende una cadena quimérica pesada. En este  
10 ejemplo, las secuencias de adhesina están fusionadas al extremo 3' de una cadena pesada de inmunoglobulina en cada brazo de una inmunoglobulina, tanto entre los dominio bisagra y  $C_H2$  como entre los dominios  $C_H2$  y  $C_H3$ . Hoogenboom y col., Mol. Immunol. 28:1027-1037 (1991) han informado de construcciones similares.

**[0146]** Aunque la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina no es  
15 necesaria en las inmuno adhesinas, una cadena ligera de inmunoglobulina puede estar presente tanto covalentemente asociada a un polipéptido de fusión de cadena pesada de inmunoglobulina-adhesina como directamente fusionada a la adhesina. En el caso anterior, el ADN que codifica una cadena ligera de inmunoglobulina se expresa simultánea y normalmente con el ADN que codifica la proteína de fusión de la cadena  
20 pesada de la adhesina-inmunoglobulina. Tras la secreción, la cadena pesada y la cadena ligera híbridadas se asociarán covalentemente para proporcionar una estructura similar a inmunoglobulina que comprende dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina ligadas por disulfuro. Los procedimientos adecuados para la preparación de tales estructuras se desvelan, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n°  
25 4.816.567 concedida el 28 de marzo de 1989.

**[0147]** Las inmuno adhesinas se construyen más convenientemente fusionando la secuencia ADNc que codifica la porción de adhesina en marco a una secuencia de ADNc de inmunoglobulina. Sin embargo, también puede usarse la fusión a fragmentos genómicos de inmunoglobulina (véase, por ejemplo, Aruffo y col. Cell, 61:1303-1313  
30 (1990); y Stamenkovic y col., Cell, 66:1133-1144 (1991)). Este último tipo de fusión requiere la presencia de secuencias reguladoras de Ig para la expresión. Los ADNc que codifican regiones constantes de cadena pesada de IgG pueden aislarse basándose en las secuencias publicadas de bibliotecas de ADNc derivadas de linfocitos del bazo o de sangre periférica, por hibridación o por técnicas de reacción en cadena de la  
35 polimerasa (PCR). Los ADNc que codifican la "adhesina" y las partes de

inmunoglobulina de la inmunoadesina se insertan en tándem en un vector de plásmido que dirige eficazmente la expresión en las células hospedadoras elegidas.

**[0148]** La WISP-1 o el antagonista de WISP-1 puede modificarse covalentemente ligando el polipéptido receptor a uno de una variedad de polímeros no proteináceos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxialquilenos, en el modo expuesto en las patentes de EE.UU. n° 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 ó 4.179.337, u otro como moléculas tales como poliglutamato. Tales formas pegiladas pueden prepararse usando técnicas conocidas en la técnica.

**[0149]** La invención también contempla las formas tipo cremallera de leucina de estas moléculas. La "cremallera de leucina" es un término usado en la técnica para referirse a una secuencia rica en leucina que potencia, promueve o activa la dimerización o trimerización de su componente de fusión (por ejemplo, la secuencia o molécula a la que está fusionada o ligada la cremallera de leucina). En la técnica se han descrito diversos polipéptidos en cremallera de leucina. Véanse, por ejemplo, Landschulz y col., Science 240:1759 (1988); la patente de EE.UU. 5.716.805; el documento WO 94/10308; Hoppe y col., FEBS Letters, 344:1991 (1994); Maniatis y col., Nature, 341:24 (1999). Aquellos expertos en la materia apreciarán que una secuencia de cremallera de leucina puede fusionarse a o bien los extremos 5' o 3' de WISP-1 o a la molécula antagonista de WISP-1.

**[0150]** Los polipéptidos WISP-1 también pueden modificarse de forma que se formen moléculas quiméricas fusionando el polipéptido a otro polipéptido heterólogo o secuencia de aminoácidos. Preferentemente, tal polipéptido heterólogo o secuencia de aminoácidos es uno que actúa para oligomerizar la molécula quimérica. En un ejemplo, una molécula quimérica comprende una fusión del polipéptido WISP-1 a un polipéptido de marca que proporciona un epítipo al que puede unirse selectivamente un anticuerpo antimarca. La marca de epítipo se sitúa generalmente en el extremo amino o carboxilo del polipéptido. La presencia de tales formas marcadas con epítipo del polipéptido puede detectarse usando un anticuerpo dirigido contra el polipéptido de marca. Por tanto, la provisión de la marca de epítipo permite que el polipéptido se purifique fácilmente por purificación de afinidad usando un anticuerpo dirigido contra la marca u otro tipo de matriz de afinidad que se une a la marca de epítipo. Diversos polipéptidos de marca y sus anticuerpos respectivos son muy conocidos en la técnica. Ejemplos incluyen marcas de poli-histidina (poli-his) o poli-histidina-glicina (poli-his-gly); el polipéptido de marca de HA flu y su anticuerpo 12CA5 [Field y col., Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)]; la marca c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10,

G4, B7 y 9E10 para la misma [Evan y col., *Molecular and Celular Biology*, 5:3610-3616 (1985)]; y la marca de glicoproteína D del virus del herpes simple (gD) y su anticuerpo [Paborsky y col., *Protein Engineering*, 3(6):547-553 (1990)]. Otros polipéptidos de marca incluyen el péptido Flag [Hopp y col., *BioTechnology*, 6:1204-1210 (1988)]; el péptido del epítipo KT3 [Martin y col., *Science*, 255:192-194 (1992)]; un péptido del epítipo de  $\alpha$ -tubulina [Pielner y col., *J. Biol. Chem.*, 266:15163-15166 (1991)]; y la marca del péptido de proteína del gen 10 de T7 [Lutz-Freyermuth y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6393-6397 (1990)].

**[0151]** Se contempla que los anticuerpos dirigidos contra WISP-1 también puedan emplearse en los procedimientos presentemente desvelados. Ejemplos de tales moléculas incluyen anticuerpos neutralizantes o bloqueantes que pueden reducir el crecimiento, la metástasis o la motilidad celular cancerosas. El anti-WISP-1 puede ser un anticuerpo monoclonal.

**[0152]** Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse usando procedimientos de hibridoma tales como aquellos descritos por Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495 (1975). En un procedimiento de hibridoma, un ratón, hámster u otro animal huésped apropiado se inmuniza normalmente con un agente inmunizante para provocar linfocitos que producen o pueden producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Alternativamente, los linfocitos pueden inmunizarse *in vitro*.

**[0153]** El agente inmunizante incluirá normalmente un polipéptido WISP-1 o una proteína de fusión del mismo tal como una proteína de fusión de WISP-1-IgG. Generalmente se usan tanto linfocitos de sangre periférica ("PBL") si se desean células de origen humano como células de bazo o células de ganglios linfáticos si se desean fuentes de mamífero no humano. Entonces, los linfocitos se fusionan a una línea celular inmortalizada usando un agente de fusión adecuado tal como polietilenglicol para formar una célula de hibridoma [Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986) pág. 59-103]. Las líneas celulares inmortalizadas son normalmente células transformadas de mamífero, particularmente células de mieloma de origen de roedor, bovino y humano. Normalmente se emplean líneas celulares de mieloma de rata o ratón. Las células de hibridoma pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células inmortalizadas sin fusionar. Por ejemplo, si las células parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá normalmente hipoxantina, aminopterina y timidina ("medio HAT"), sustancias que

previenen el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

**[0154]** Las líneas celulares inmortalizadas preferidas son aquellas que se fusionan eficientemente, soportan un alto nivel de expresión estable del anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Las líneas celulares inmortalizadas más preferidas son líneas de mieloma murino que pueden obtenerse, por ejemplo, de Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California y la Colección americana de cultivos tipo, Manassas, Virginia. Las líneas celulares de mieloma humano y heteromieloma de ratón-humano también se han descrito para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur y col., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, (1987) pág. 51-63).

**[0155]** El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma puede ensayarse entonces para la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos contra WISP-1. Preferentemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina por inmunoprecipitación o por un ensayo de unión *in vitro* tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Tales técnicas y ensayos se conocen en la técnica. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede determinarse, por ejemplo, por el análisis de Scatchard de Munson y Pollard, Anal. Biochem., 107:220 (1980).

**[0156]** Después de identificarse las células de hibridoma deseadas, los clones pueden subclonarse mediante procedimientos de dilución limitante y cultivarse por procedimientos convencionales (Goding, Monoclonal anteriormente). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio de Eagle modificado por Dulbecco o medio RPMI-1640. Alternativamente, las células de hibridoma pueden cultivarse *in vivo* como ascitis en un mamífero.

**[0157]** Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones pueden aislarse o purificarse del medio de cultivo o fluido ascítico mediante procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulinas tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxipatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

**[0158]** Los anticuerpos monoclonales también pueden prepararse mediante procedimientos de ADN recombinante tales como aquellos descritos en la patente de EE.UU. nº 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención se aísla y se secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales

(por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que pueden unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos monoclonales). Las células de hibridoma sirven de fuente preferida de tal ADN. Una vez aislado, el ADN puede colocarse en vectores de expresión que entonces se transfectan en células  
5 hospedadoras tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario hámster chino (CHO) o células de mieloma que no producen de otra forma proteína de inmunoglobulina para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. El ADN también puede modificarse, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante para dominios constantes humanos de cadena  
10 pesada y ligera en lugar de las secuencias murinas homólogas, Morrison y col. Proc. Nat. Acad. Sci. 81, 6851 (1984), o uniéndose covalentemente a la secuencia codificante de inmunoglobulinas toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido de no inmunoglobulina.

**[0159]** Normalmente, tales polipéptidos de no inmunoglobulina se sustituyen para  
15 los dominios constantes de un anticuerpo de la invención o se sustituyen para los dominios variables de un sitio de combinación con antígeno de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo bivalente quimérico.

**[0160]** Los anticuerpos quiméricos o híbridos también pueden prepararse *in vitro* usando procedimientos conocidos en la química de proteínas sintéticas que incluyen  
20 aquellos que implican agentes de reticulación. Por ejemplo, las inmunotoxinas pueden construirse usando una reacción de intercambio de disulfuro o formando un enlace tioéter. Ejemplos de reactivos adecuados para este fin incluyen iminotiolato y 4-mercaptobutirimidato de metilo.

**[0161]** Los fragmentos Fv monocatenarios también pueden producirse tal como se  
25 describe en Iliades y col., FEBS Letters, 409:437-441 (1997). El acoplamiento de tales fragmentos monocatenarios usando diversos ligadores se describe en Kortt y col., Protein Engineering, 10:423-433 (1997). En la técnica se conoce una variedad de técnicas para la producción y manipulación recombinante de anticuerpos. Ejemplos ilustrativos de tales técnicas que normalmente se utilizan por expertos se describen  
30 más adelante en mayor detalle.

*(i) Anticuerpos humanizados*

**[0162]** Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en él procedentes de una fuente no humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se denominan frecuentemente en lo sucesivo residuos  
35 "importados", que se toman normalmente de un dominio variable "importado". La

humanización puede realizarse esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores [Jones y col., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann y col., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen y col., *Science*, 239:1534-1536 (1988)], sustituyendo CDR de roedor o secuencias de CDR por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano.

**[0163]** Por consiguiente, tales anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR están sustituidos por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

**[0164]** Es importante que los anticuerpos se humanicen con retención de la alta afinidad para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, según un procedimiento preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un procedimiento de análisis de las secuencias parentales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales están comúnmente disponibles y son familiares para aquellos expertos en la materia. Están disponibles programas informáticos que ilustran y muestran estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de esta muestra permite el análisis de la función probable de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta forma, los restos FR pueden seleccionarse y combinarse a partir de la secuencia consenso y de importación de manera que se logre la característica de anticuerpos deseada, tal como el aumento de la afinidad para el (los) antígeno(s) diana. En general, los restos de CDR participan directamente y lo más sustancialmente en influir la unión a antígeno.

*(ii) Anticuerpos humanos*

**[0165]** Los anticuerpos monoclonales humanos pueden prepararse por el procedimiento de hibridoma. Se han descrito líneas celulares de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos, por ejemplo, por Kozbor, *J. Immunol.* 133, 3001 (1984), y Brodeur, y col., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pág. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987).

**[0166]** En la actualidad es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que tras la inmunización pueden producir un repertorio de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo ( $J_H$ ) en ratones quiméricos y mutantes en la línea germinal produce la inhibición completa de la producción de anticuerpo endógeno. La transferencia de la matriz de genes de inmunoglobulina de la línea germinal en la línea germinal de dichos ratones mutantes producirá la producción de anticuerpos humanos tras la exposición a antígeno. Véanse, por ejemplo, Jakobovits y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 2551-2555 (1993); Jakobovits y col., Nature 362, 255-258 (1993).

**[0167]** Mendez y col. (Nature Genetics 15: 146-156 [1997]) han mejorado adicionalmente la tecnología y han generado una línea de ratones transgénicos designada "Xenomouse II" que, cuando se expone a un antígeno, genera anticuerpos completamente humanos de alta afinidad. Esto se logró mediante integración de la línea germinal de loci de cadena pesada y cadena ligera humanos de megabases en ratones con delección en el segmento  $J_H$  endógeno como se describe anteriormente. El Xenomouse II alberga 1.020 kb de locus de cadena pesada humana que contienen aproximadamente 66 genes  $V_H$ , regiones  $D_H$  y  $J_H$  completas y tres regiones constantes diferentes ( $\mu$ ,  $\delta$  y  $\chi$ ), y también alberga 800 kb de locus  $\kappa$  humano que contiene 32 genes  $V_\kappa$ , segmentos  $J_\kappa$  y genes  $C_\kappa$ . Los anticuerpos producidos en estos ratones se parecen mucho en todos los sentidos a los observados en seres humanos, incluyendo transposición, ensamblaje y repertorio de genes. Los anticuerpos humanos se expresan preferentemente con respecto a los anticuerpos endógenos debido a la delección en el segmento  $J_H$  endógeno que previene la transposición de genes en el locus murino.

**[0168]** Alternativamente, la tecnología de expresión en fago (McCafferty y col., Nature 348, 552-553 [1990]) puede usarse para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro* a partir de repertorios de genes del dominio variable (V) de inmunoglobulina de donantes sin inmunizar. Según esta técnica, los genes del dominio V de anticuerpo se clonan en marco en un gen de la proteína de la cubierta tanto principal como minoritario de un bacteriófago filamentoso tal como M13 o fd, y se muestran como fragmentos funcionales de anticuerpos sobre la superficie de la partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenaria del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también producen la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta esas propiedades. Por tanto, el fago imita algunas de las

propiedades de la célula B. Las muestras de fago pueden realizarse en una variedad de formas; para su revisión véase, por ejemplo, Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3, 564-571 (1993). Pueden usarse varias fuentes de segmentos de genes de V para la expresión en fago. Clackson y col., *Nature* 352, 5 624-628 (1991) aislaron una matriz diferente de anticuerpos de anti-oxazolona a partir de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes de V derivados de los bazo de ratones inmunizados. Puede construirse un repertorio de genes V de donantes humanos sin inmunizar y los anticuerpos con respecto a una matriz diferente de antígenos (incluyendo autoantígenos) pueden aislarse esencialmente siguiendo las 10 técnicas descritas por Marks y col., *J. Mol. Biol.* 222, 581-597 (1991), o Griffith y col., *EMBO J.* 12, 725-734 (1993). En una respuesta inmunitaria natural, los genes de anticuerpos acumulan mutaciones a una alta velocidad (hipermutación somática). Algunos de los cambios introducidos conferirán mayor afinidad, y las células B que muestran inmunoglobulina de superficie de alta afinidad se replican y se diferencian 15 preferencialmente durante la posterior exposición del antígeno. Este procedimiento natural puede imitarse empleando la técnica conocida como "barajado de cadenas" (Marks y col., *Bio/Technol.* 10, 779-783 [1992]). En este procedimiento, la afinidad de anticuerpos humanos "primarios" obtenidos por expresión en fago puede mejorarse sustituyendo secuencialmente los genes de la región V de la cadena pesada y ligera por 20 variantes (repertorios) que se producen naturalmente de genes del dominio V obtenidos a partir de donantes sin inmunizar. Esta técnica permite la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos con afinidades en el intervalo de nM. Una estrategia para preparar repertorios de anticuerpos de fago muy grandes (también conocidos como "las bibliotecas madre de todas las bibliotecas") se ha descrito por Waterhouse y col., *Nucl. Acids Res.* 21, 2265-2266 (1993). El barajado de genes también puede usarse para 25 derivar anticuerpos humanos de anticuerpos de roedor, en el que el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares al anticuerpo de roedor de partida. Según este procedimiento, que también se denomina en lo sucesivo "sellado de epítomos", el gen del dominio V de la cadena pesada o ligera de anticuerpos de roedor obtenido por 30 la técnica de expresión en fago se reemplaza por un repertorio de genes del dominio V humano, creándose quimeras de roedor-ser humano. La selección en antígeno produce el aislamiento del variable humano que puede restaurar un sitio de unión a antígeno funcional, es decir, el epítopo gobierna (sella) la elección del componente. Si el procedimiento se repite con el fin de sustituir el dominio V de roedor restante, se 35 obtiene un anticuerpo humano (véase la solicitud de patente PCT WO 93/06213

publicada el 1 de abril de 1993). A diferencia de la humanización tradicional de anticuerpos de roedor por injerto de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos que no tienen región estructural o residuos de CDR de origen de roedor.

5 **[0169]** Como se trata más adelante, los anticuerpos para uso en la invención pueden comprender opcionalmente anticuerpos monoméricos, anticuerpos diméricos, además de formas multivalentes de anticuerpos. Aquellos expertos en la materia pueden construir tales formas diméricas o multivalentes por técnicas conocidas en la técnica. Los procedimientos para preparar anticuerpos monovalentes también son muy  
10 conocidos en la técnica. Por ejemplo, un procedimiento implica la expresión recombinante de cadena ligera y cadena pesada modificada de inmunoglobulina. La cadena pesada se trunca generalmente en cualquier punto en la región Fc de forma que se previene la reticulación de la cadena pesada. Alternativamente, los residuos de cisteína relevantes están sustituidos con otro residuo de aminoácido o están  
15 deletados para prevenir la reticulación.

*(iii) Anticuerpos biespecíficos*

**[0170]** Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferentemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de  
20 unión es para WISP-1. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos que se unen específicamente a WISP-1 o variantes de WISP-1 y otro miembro de la familia de CNN (por ejemplo, WISP-2, WISP-3, CTGF, Cyr61 o Nov) u otras moléculas tales como CD44 están dentro del alcance de la presente invención.

**[0171]** Los procedimientos para preparar anticuerpos biespecíficos se conocen en  
25 la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la expresión simultánea de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina en los que las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Millstein y Cuello, Nature 305, 537-539 (1993)). Debido al surtido aleatorio de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen  
30 una posible mezcla de 10 moléculas de anticuerpos diferentes, de las que sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se hace normalmente por etapas de cromatografía de afinidad, es bastante embarazosa, y los rendimientos de producto son bajos. Procedimientos similares se desvelan en la publicación de la solicitud PCT nº WO 93/08829 (publicada el 13 de mayo de 1993) y  
35 en Traunecker y col., EMBO 10, 3655-3659 (1991).

**[0172]** Según una solución diferente y más preferida, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios que combinan anticuerpo-antígeno) están fusionados a secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferentemente con un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere que tenga la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para la unión a cadena ligera presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad en el ajuste de proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptidos en realizaciones en las que relaciones desiguales de las tres cadenas de polipéptidos usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes para dos o las tres cadenas de polipéptidos en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptidos en relaciones iguales produzca altos rendimientos o cuando las relaciones no sean de significancia particular. En una realización preferida de esta solución, los anticuerpos biespecíficos están compuestos por una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se encontró que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado a partir de combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una forma fácil de separación. Esta solución se desvela en la publicación PCT n° WO 94/04690 publicada el 3 de marzo de 1994.

**[0173]** Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh y col., *Methods in Enzymology* 121, 210 (1986).

*(iv) Anticuerpos heteroconjugados*

**[0174]** Los anticuerpos heteroconjugados también están dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados están compuestos por dos anticuerpos covalentemente unidos. Tales anticuerpos han sido propuestos, por ejemplo, para elegir como diana células del sistema inmunitario con respecto a células no deseadas (patente de EE.UU. n° 4.676.980) y para tratamiento de infección por VIH (publicación de solicitud PCT n° WO 91/00360 y documentos WO 92/200373; EP

03089). Los anticuerpos heteroconjugados pueden prepararse usando cualquier procedimiento de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados son muy conocidos en la técnica y se desvelan en la patente de EE.UU. n° 4.676.980, junto con varias técnicas de reticulación.

5 (v) *Fragmentos de anticuerpos*

**[0175]** En ciertas realizaciones, el anticuerpo dirigido contra WISP-1 (que incluye anticuerpos murinos, humanos y humanizados, y variantes de anticuerpos) es un fragmento de anticuerpo. Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaron mediante  
 10 digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véanse, por ejemplo, Morimoto y col., J. Biochem. Biophys. Methods 24:107-117 (1992) y Brennan y col., Science 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos pueden producirse ahora directamente por células hospedadoras recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos Fab'-SH pueden recuperarse directamente de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos  
 15 F(ab')<sub>2</sub> (Carter y col., Bio/Technology 10:163-167 (1992)). En otra realización, F(ab')<sub>2</sub> se forma usando la cremallera de leucina GCN4 para promover el ensamblaje de la molécula de F(ab')<sub>2</sub>. Según otra solución, los fragmentos Fv, Fab o F(ab')<sub>2</sub> pueden aislarse directamente de cultivo de células hospedadoras recombinantes. Una variedad de técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el  
 20 médico experto. Por ejemplo, la digestión puede realizarse usando papaína. Ejemplos de digestión con papaína se describen en el documento WO 94/29348 publicado el 22/12/94 y la patente de EE.UU. n° 4.342.566. La digestión con papaína de anticuerpos produce normalmente dos fragmentos de unión a antígeno idénticos llamados fragmentos Fab, cada uno con un único sitio de unión a antígeno, y un fragmento Fc  
 25 residual. El tratamiento con pepsina proporciona un fragmento F(ab')<sub>2</sub> que tiene dos sitios de combinación a antígeno y todavía puede reticular el antígeno.

**[0176]** Los fragmentos Fab producidos en la digestión de anticuerpos también contienen los dominios constantes de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH<sub>1</sub>) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' se diferencian de los fragmentos Fab  
 30 por la adición de algunos residuos en el extremo carboxi del dominio CH<sub>1</sub> de cadena pesada que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en este documento para Fab' en el que el (los) residuo(s) de cisteína de los dominios constantes posee(n) un grupo tiol libre. Los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> de anticuerpos se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen  
 35 cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de

fragmentos de anticuerpos.

**[0177]** Los anticuerpos están glicosilados en posiciones conservadas de sus regiones constantes (Jefferis y Lund, *Chem. Immunol.* 65:111-128 [1997]; Wright y Morrison, *TibTECH* 15:26-32 [1997]). Las cadenas laterales del oligosacárido de las 5 inmunoglobulinas afectan la función de la proteína (Boyd y col., *Mol. Immunol.* 32:1311-1318 [1996]; Wittwe y Howard, *Biochem.* 29:4175-4180 [1990]) y la interacción intramolecular entre porciones de la glicoproteína que puede afectar la conformación y la superficie tridimensional presentada de la glicoproteína (Hefferis y Lund, anteriormente; Wyss y Wagner, *Current Opin. Biotech.* 7:409-416 [1996]). Los 10 oligosacáridos también pueden servir para elegir como diana una glicoproteína dada para ciertas moléculas basadas en estructuras de reconocimiento específicas. Por ejemplo, se ha informado que en IgG agalactosilada, el resto de oligosacárido 'salta' del espacio inter-CH2 y los residuos de N-acetilglucosamina del extremo están disponibles para unirse a proteína de unión a manosa (Malhotra y col., *Nature Med.* 1:237-243 15 [1995]). La eliminación por glicopeptidasa de los oligosacáridos de CAMPATH-1H (un anticuerpo IgG1 monoclonal murino humanizado recombinante que reconoce el antígeno CDw52 de linfocitos humanos) producidos en células de ovario de hámster chino (CHO) produjo una reducción completa en la lisis mediada por complemento (CMCL) (Boyd y col., *Mol. Immunol.* 32:1311-1318 [1996]), mientras que la 20 eliminación selectiva de residuos de ácido siálico usando neuraminidasa no dio pérdida de DMCL. También se ha informado que la glicosilación de anticuerpos afecta la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En particular, se informó que las células CHO con expresión regulada con tetraciclina de  $\beta(1,4)$ -N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII), una formación catalizadora de 25 glicosiltransferasa de GlcNAc bisecante, tenían actividad ADCC mejorada (Umana y col., *Mature Biotech.* 17:176-180 [1999]).

**[0178]** Las variantes de glicosilación de anticuerpos son variantes en las que se altera el patrón de glicosilación de un anticuerpo. Por alteración se pretende delecionar uno o más restos de hidrato de carbono encontrados en el anticuerpo, añadir uno o más 30 restos de hidrato de carbono al anticuerpo, cambiar la composición de glicosilación (patrón de glicosilación), el grado de glicosilación, etc. Las variantes de glicosilación pueden prepararse, por ejemplo, eliminando, cambiando y/o añadiendo uno o más sitios de glicosilación en la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el anticuerpo.

**[0179]** La glicosilación de anticuerpos está normalmente o ligada a N o ligada a 35 O. Ligado a N se refiere a la unión del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral

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

**[0180]** La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo se realiza  
10 convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos de forma que contenga una o más de las secuencias tripeptídicas anteriormente descritas (para sitios de glicosilación ligados a N). La alteración también puede hacerse mediante la adición de, o sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo original (para sitios de glicosilación ligados a O).

15 **[0181]** La glicosilación (incluyendo patrón de glicosilación) de anticuerpos también puede alterarse sin alterar la secuencia de nucleótidos subyacente. La glicosilación depende ampliamente de la célula hospedadora usada para expresar el anticuerpo. Debido a que el tipo de célula usado para la expresión de glicoproteínas recombinantes, por ejemplo anticuerpos, como posibles medicamentos es raramente la  
20 célula natural, pueden esperarse variaciones significativas en el patrón de glicosilación de los anticuerpos (véase, por ejemplo Hse y col., J. Biol. Chem. 272:9062-9070 [1997]). Además de la elección de células hospedadoras, los factores que afectan la glicosilación durante la producción recombinante de anticuerpos incluyen modo de crecimiento, formulación de medios, densidad de cultivo, oxigenación, pH, esquemas  
25 de purificación y similares. Se han propuesto diversos procedimientos para alterar el patrón de glicosilación logrado en un organismo huésped particular que incluyen introducir o sobreexpresar ciertas enzimas que participan en la producción de oligosacáridos (patente de EE.UU. nº 5.047.335; 5.510.261 y 5.278.299). La glicosilación, o ciertos tipos de glicosilación, puede eliminarse enzimáticamente de la  
30 glicoproteína, por ejemplo, usando endoglicosidasa H (Endo H). Además, la célula hospedadora recombinante puede manipularse genéticamente, por ejemplo, hacer defectuoso el procesamiento de ciertos tipos de polisacáridos. Estas técnicas y similares son muy conocidas en la técnica.

**[0182]** La estructura de glicosilación de anticuerpos puede analizarse fácilmente  
35 por técnicas convencionales de análisis de hidratos de carbono que incluyen

cromatografía de lectina, RMN, espectrometría de masas, HPLC, GPC, análisis composicional de monosacáridos, digestión enzimática secuencial y HPAEC-PAD, que usa cromatografía de intercambio aniónico a alto pH para separar oligosacáridos basándose en la carga. También se conocen procedimientos para liberar los oligosacáridos para fines analíticos e incluyen, sin limitación, tratamiento enzimático (realizado comúnmente usando péptido-N-glicosidasa F/endo- $\beta$ -galactosidasa), eliminación usando entorno alcalino agresivo para liberar principalmente estructuras ligadas por O, y procedimientos químicos usando hidracina anhidra para liberar tanto oligosacáridos ligados por N como por O.

10 **[0183]** Los triacuerpos también están dentro del alcance de la invención. Tales anticuerpos se describen, por ejemplo, en Iliades y col., anteriormente, y Kortt y col., anteriormente.

**[0184]** Los anticuerpos de la presente invención pueden modificarse conjugando el anticuerpo con un agente citotóxico (como una molécula de toxina) o una enzima activadora de profármaco que convertir un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico de peptidilo, véase el documento WO81/01145) en un fármaco anticanceroso activo. Véase, por ejemplo, el documento WO 88/07378 y la patente de EE.UU. n° 4.975.278. Esta tecnología también se denomina en lo sucesivo "Terapia con profármacos mediada por enzimas dependientes de anticuerpos" (ADEPT).

20 **[0185]** El componente de enzima del inmunoconjugado útil para ADEPT incluye cualquier enzima que pueda actuar sobre un profármaco de tal forma que lo convierta en su forma citotóxica más activa. Enzimas que son útiles en el procedimiento de esta invención incluyen, pero no se limitan a, fosfatasa alcalina útil para convertir profármacos que contienen fosfato en fármacos libres; arilsulfatasa útil para convertir profármacos que contienen sulfato en fármacos libres; citosina desaminasa útil para convertir no 5-fluorocitosina tóxica en el fármaco anticanceroso, 5-fluorouracilo; proteasas tales como serratia proteasa, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (tales como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contienen péptidos en fármacos libres; caspasas tales como caspasa 3; D-alanilcarboxipeptidasas útiles para convertir profármacos que contienen sustituyentes de D-aminoácido; enzimas que escinden hidratos de carbono tales como beta-galactosidasa y neuraminidasa útiles para convertir profármacos glicosilados en fármacos libres; beta-lactamasa útil para convertir fármacos derivatizados con beta-lactamas en fármacos libres; y penicilina amidasa tales como penicilina V amidasa o penicilina G amidasa útiles para convertir fármacos derivatizados en sus nitrógenos de

amina con grupos fenoxiacetilo o fenilacetilo, respectivamente, en fármacos libres. Alternativamente, los anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la técnica como "abzimas", pueden usarse para convertir los profármacos de la invención en fármacos activos libres (véase, por ejemplo, Massey, Nature 328: 457-458 (1987)).

- 5 Los conjugados anticuerpo-abzima pueden prepararse como se describen en este documento para administrar la abzima a una población de células tumorales.

**[0186]** Las enzimas pueden unirse covalentemente a los anticuerpos por técnicas muy conocidas en la técnica tales como el uso de reactivos de reticulación heterobifuncional. Alternativamente, las proteínas de fusión que comprenden al menos  
10 la región de unión a antígeno de un anticuerpo de la invención ligada a al menos una porción funcionalmente activa de una enzima de la invención pueden construirse usando técnicas de ADN recombinante muy conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Neuberger y col., Nature, 312: 604-608 (1984).

**[0187]** Se contemplan otras modificaciones de anticuerpos. Por ejemplo, el  
15 anticuerpo puede ligarse a uno de una variedad de polímeros no proteináceos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, polioxialquilenos, o copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol, u otras moléculas tales como poliglutamato. El anticuerpo también puede atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial (por ejemplo,  
20 hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente), en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Tales técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A., Ed., (1980). Para aumentar la semivida  
25 en suero del anticuerpo puede incorporarse un epítipo de unión a receptor de salvamento en el anticuerpo (especialmente un fragmento de anticuerpo) como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. 5.739.277. Como se usa en este documento, el término "epítipo de unión a receptor de salvamento" se refiere a un epítipo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>3</sub> o IgG<sub>4</sub>)  
30 que es responsable de aumentar la semivida en suero *in vivo* de la molécula de IgG.

### **FORMULACIONES**

**[0188]** Los antagonistas de WISP-1 descritos en este documento se emplean opcionalmente en un vehículo. Vehículos adecuados y sus formulaciones se describen en Remington's. Pharmaceutical Sciences, 16ª ed., 1980, Mack Publishing Co., editado  
35 por Osol y col. Normalmente, una cantidad apropiada de se usa en el vehículo una sal

farmacéuticamente aceptable para hacer que la formulación sea isotónica. Ejemplos de vehículo incluyen solución salina, disolución de Ringer y disolución de dextrosa. El pH del vehículo es preferentemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 8, y más preferentemente de aproximadamente 7,4 a aproximadamente 7,8. Será evidente para aquellos expertos en la materia que ciertos vehículos pueden ser más preferibles dependiendo de, por ejemplo, la vía de administración y la concentración de agente activo que se administra. El vehículo puede estar en forma de una formulación liofilizada o disolución acuosa.

**[0189]** Vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables son preferentemente no tóxicos para células y/o receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 residuos); proteínas tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN<sup>TM</sup>, PLURONICS<sup>TM</sup> o polietilenglicol (PEG).

**[0190]** La formulación también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que está tratándose, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan adversamente entre sí.

**[0191]** Los antagonistas descritos en este documento también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

**[0192]** Las formulaciones que van a usarse para administración *in vivo* deben ser

estériles. Esto se realiza fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles.

**[0193]** Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el agente activo cuyas matrices están en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente de EE.UU. nº 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de  $\gamma$ -etilo, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Mientras que polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos.

### **MODOS DE TERAPIA**

**[0194]** Las moléculas descritas en este documento son útiles en el tratamiento de diversas dolencias patológicas tales como cáncer. Estas afecciones pueden tratarse mediante la administración de uno o más antagonistas descritos en este documento. El médico experto puede hacer el diagnóstico en mamíferos de las diversas afecciones patológicas descritas en este documento. Las técnicas de diagnóstico disponibles en la técnica permiten, por ejemplo, el diagnóstico o la detección de cáncer o enfermedad inmunitaria relacionada en un mamífero. Por ejemplo, los cánceres pueden identificarse mediante técnicas que incluyen, pero no se limitan a, palpación, análisis de sangre, rayos X, RMN y similares.

**[0195]** El (Los) antagonista(s) puede(n) administrarse según procedimientos conocidos tales como administración intravenosa como bolo o por infusión continua durante un periodo de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intra-articular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, o por inhalación. Opcionalmente, la administración puede realizarse mediante infusión con minibomba usando diversos dispositivos comercialmente disponibles. Los antagonistas también pueden emplearse usando técnicas de terapia génica que se han descrito en la técnica.

**[0196]** Las dosificaciones y pautas terapéuticas eficaces para administrar antagonistas pueden determinarse empíricamente, y realizar tales determinaciones está

dentro de la habilidad en la técnica. Pueden emplearse dosificaciones únicas o múltiples. Actualmente se cree que una dosificación o cantidad eficaz de antagonista usado en solitario puede oscilar de aproximadamente 1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal o más por día. La gradación de dosificaciones entre especies  
5 puede realizarse de un modo conocido en la técnica, por ejemplo, como se desvela en Mordenti y col., Pharmaceut. Res., 8:1351 (1991).

**[0197]** Cuando se emplea la administración *in vivo* de un antagonista del mismo, las cantidades de dosificación normal pueden variar de aproximadamente 10 ng/kg a 100 mg/kg de peso corporal de mamífero o más por día, preferentemente  
10 aproximadamente 1 µg/kg/día a 10 mg/kg/día, que depende de la vía de administración. La orientación sobre dosificaciones y procedimientos particulares de administración se proporciona en la bibliografía; véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 4.657.760; 5.206.344; o 5.225.212. Se anticipa que las diferentes formulaciones serán eficaces para diferentes compuestos de tratamiento y diferentes  
15 trastornos, eligiendo esa administración como diana un órgano o tejido, por ejemplo, puede necesitar administración de un modo diferente de ese a otro órgano o tejido. Aquellos expertos en la materia entenderán que la dosificación de antagonista que debe administrarse variará dependiendo de, por ejemplo, el mamífero que recibirá el agonista o antagonista, la vía de administración y los otros fármacos o terapias que se  
20 administran al mamífero.

**[0198]** Dependiendo del tipo de células y/o gravedad de la enfermedad, aproximadamente 1 µg/kg a 15 mg/kg (por ejemplo, 0,1-20 mg/kg) de anticuerpo antagonista es una dosificación candidata inicial para administración, tanto, por ejemplo, por una o más administraciones separadas como por infusión continua. Una  
25 dosificación diaria típica puede oscilar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, el tratamiento se mantiene hasta que se produce una supresión deseada de los síntomas de enfermedad. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación.

**[0199]** Puede usarse un único tipo de antagonista en los procedimientos de la invención. Por ejemplo, puede administrarse una molécula de inmunoadhesina WISP-1. Alternativamente, el médico experto puede optar por emplear una combinación de antagonistas en los procedimientos, por ejemplo, una combinación de una inmunoadhesina WISP-1 y un anticuerpo de WISP-1. Se contempla que todavía  
35 puedan emplearse terapias adicionales en los procedimientos. La una o varias terapias

distintas pueden incluir, pero no se limitan a, administración de radioterapia, citocina(s), agente(s) inhibidor(es) del crecimiento, agente(s) quimioterapéutico(s), agente(s) citotóxico(s), inhibidores de tirosina cinasas, inhibidores de ras-farnesiltransferasa, inhibidores de la angiogénesis e inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas que se conocen en la técnica y se definen adicionalmente con particularidad en la Sección I anterior. Además, terapias basadas en anticuerpos terapéuticos que eligen como diana antígenos tumorales tales como Rituxan<sup>TM</sup> o Herceptin<sup>TM</sup>, además de anticuerpos antiangiogénicos tales como anti-VEGF.

**[0200]** La preparación y pautas terapéuticas de los agentes quimioterapéuticos pueden realizarse según las instrucciones del fabricante o según determina empíricamente el médico experto. La preparación y las pautas terapéuticas de dicha quimioterapia también se describen en Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992). El agente quimioterapéutico puede preceder, o seguir a la administración de, por ejemplo, un antagonista, o puede administrarse simultáneamente con el mismo. El antagonista también puede combinarse, por ejemplo, con un compuesto antiestrogénico tal como tamoxifeno o una antiprogesterona tal como onapristona (véase el documento EP 616812) en dosificaciones conocidas para tales moléculas.

**[0201]** También puede desearse administrar anticuerpos dirigidos contra otros antígenos tales como anticuerpos que se unen a CD20, CD11a, CD18, CD40, CD44, Ebb2, EGFR, ErbB3, ErbB4, factor endotelial vascular (VEGF) u otros miembros de la familia de TNFR (tales como DR4, DR5, OPG, TNFR1, TNFR2). Alternativamente, o además, dos o más anticuerpos que se unen al mismo antígeno o dos o más antígenos diferentes desvelados en este documento pueden coadministrarse al paciente. Algunas veces también puede ser beneficioso administrar una o más citocinas al paciente. En una realización, los antagonistas en este documento se coadministran con un agente inhibidor del crecimiento. Por ejemplo, el agente inhibidor del crecimiento puede administrarse primero, seguido de un antagonista de la presente invención.

**[0202]** El antagonista y la una o varias terapias distintas pueden administrarse simultánea o secuencialmente. Tras la administración de antagonista pueden analizarse las células tratadas *in vitro*. Si ha sido tratamiento *in vivo*, un mamífero tratado puede monitorizarse de diversas formas muy conocidas para el médico experto.

#### **ARTÍCULO DE FABRICACIÓN**

**[0203]** Un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de los trastornos descritos anteriormente se describe en este documento. La

- partícula de fabricación comprende un recipiente y una etiqueta. Recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringuillas y tubos de ensayo. Los recipientes pueden estar formados por una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene una composición que es eficaz para tratar la afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de disolución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Los agentes activos en la composición pueden comprender antagonista(s). La etiqueta sobre el, o asociada al, recipiente indica que la composición se usa para tratar la afección de elección. El artículo de fabricación puede comprender adicionalmente un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable tal como solución salina tamponada con fosfato, disolución de Ringer y disolución de dextrosa. Adicionalmente puede incluir otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario que incluyen otros tampones, diluyente, filtros, agujas, jeringuilla y prospectos con instrucciones para uso.
- 15 **[0204]** Los siguientes ejemplos sólo se ofrecen para fines ilustrativos y no pretenden limitar de ningún modo el alcance de la presente invención.

### **EJEMPLOS**

- [0205]** Los reactivos comercialmente disponibles mencionados en los ejemplos se usaron según las instrucciones del fabricante, a menos que se indique lo contrario. La fuente de aquellas células identificadas en los siguientes ejemplos, y en toda la memoria descriptiva, por los números de registro ATCC es la Colección americana de cultivos tipo, Manassas, VA. A menos que se indique lo contrario, la presente invención usa procedimientos convencionales de tecnología de ADN recombinante tales como aquellos descritos anteriormente en este documento y en los siguientes libros de texto: Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press N.Y., 1989; Ausubel y col., Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989; Innis y col., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc., N.Y., 1990; Harlow y col., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, 1988; Gait, M.J., Oligonucleotide Synthesis, IRL Press, Oxford, 1984; R.I. Freshney, Animal Cell Culture, 1987; Coligan y col., Current Protocols in Immunology, 1991.
- 25
- 30

- [0206]** Una descripción de los ensayos y materiales mencionados en los siguientes ejemplos se proporciona más adelante:
- 35 **[0207]** Proteínas y anticuerpos: La proteína de fusión WISP-1-Fc humana de

longitud completa se expresó y se purificó como se describe previamente (Desnoyers y col., J. Biol. Chem., 276:47599-47607 (2001)). El anticuerpo de ratón dirigido contra CD44 de rata purificado (clon OX49) era de BD Bioscience (Bedford MA). El anticuerpo isotipo de control IgG2a de ratón era de Pharmingen. El anticuerpo de ratón 5 dirigido contra CD44 de rata conjugado con FITC era de Serotec (Raleigh, NC) y el anticuerpo isotipo de control IgG1 de ratón conjugado con FITC era de DAKO (Dinamarca). El anticuerpo de rata dirigido contra CD44 de ratón (clon KM114) era de Pharmingen. El anticuerpo de actina (clon C4) era de ICN biomedicals (Aurora, OH). Los anticuerpos monoclonales de murino dirigidos contra WISP-1 humano se 10 generaron y se seleccionaron usando WISP-1-Fc como inmunógeno y los protocolos y reactivos descritos en los Ejemplos de la patente de EE.UU. nº 6.387.657 concedida el 14 de mayo de 2002. Cinco de tales anticuerpos monoclonales han sido depositados por los solicitantes en la ATCC, como se indica más adelante.

**[0208]** Células y especímenes de tejido: Las líneas celulares NRK-49F y SW480 15 (ATCC, Manassas, VA) se mantuvieron en medio Eagle modificado por Dulbecco con alto contenido de glucosa (HGDMEM) complementado con suero bovino fetal al 10% (SBF). C57MG parentales, C57MG que expresan Wnt-1 (C57MG/Wnt-1), NRK-49F que expresa altos niveles de hWISP-1 (NRK/WISP-1H), NRK-49F que expresa niveles más bajos de hWISP-1 (NRK/WISP-1L) y NRK-49F que contiene un vector 20 vacío (NRK/control) se obtuvieron de Arnold Levine (Princeton University, Princeton, NJ) y se mantuvieron en medios que contenían  $2,5 \mu\text{g ml}^{-1}$  de puomicina (Xu y col., Genes Dev., 14:585-595 (2000)). Los ratones transgénicos Wnt-1 obtenidos de Harold Varmus (National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, MD) se criaron con ratones con genes desactivados para p53 obtenidos de Jackson 25 Laboratories (Bar Harbor, MA) para generar los ratones transgénicos Wnt-1/con inactivación del gen p53. Los especímenes de tumor de mama y de epitelio del conducto mamario se extirparon de aquellos ratones para análisis.

**[0209]** Ensayo de exclusión de partículas: El ensayo de sedimentación de eritrocitos se usó como se describe previamente, con modificaciones mínimas. 30 (Knudson y col., J. Cell Sci., 99:227-235 (1991)). Se sembraron NRK/WISP-1 ((fibroblastos de riñón de rata normales transfectados con WISP-1; véase Xu y col., Genes Dev., 14:585-595 (2000)) y células NRK/control (fibroblastos de riñón de rata normales; obtenidos de Arnold Levine, Princeton University, Princeton, NJ) ( $1 \times 10^5$  células/pocillo) en placas de 6 pocillos Falcon (Becton Dickinson, Franklin Lanes, NJ) 35 y se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco con alto contenido de

glucosa complementado con suero bovino fetal al 10% (SBF) (Life Technologies, Gaithersburg, MD) durante la noche a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Al día siguiente, el medio se eliminó y se añadieron 10<sup>8</sup> RBC de oveja (Inter-Cell Technologies, Hopewell, NJ) en 750 µl de PBS/BSA al 0,1% (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN) y se dejaron depositar durante 15 minutos. Las células se observaron usando un microscopio invertido Nikon Diaphot 300 y se adquirieron imágenes digitales usando una cámara de fotos digital SONY DKC-5000 (Japón).

**[0210]** Tinción con hialuronano de células cultivadas: La tinción con hialuronano se realizó como se describe previamente, con modificaciones mínimas (Pienimaki y col., J. Biol. Chem., 276:20428-20435 (2001)). Las células NRK/WISP-1 y NRK/control (8-10 X 10<sup>3</sup>) se sembraron en cámaras de plástico de 8 pocillos y se mantuvieron (como se describe anteriormente) durante la noche a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>. Al día siguiente, las células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron con PBS y los sitios de unión no específica se saturaron durante 30 minutos con agua destilada que contenía albúmina de suero bovino al 1% (BSA) y Triton X-100 al 0,1% (Calbiochem, LaJolla, CA). Se añadió proteína biotinilada de unión a HA (HA-BP) (Seikagaku America, Falmouth, MA) (5 µg/ml en PBS/BSA al 3%) y se incubó durante la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, las células se lavaron con PBS y se incubaron durante 30 minutos con 1:1000 de estreptavidina conjugada con FITC (DAKO, Carpinteria, CA) en TBS y 1%/BSA. Las células se lavaron en PBS, se montaron usando Vectashield (Burlingame, CA) que contenía 1 µg/ml de Hoechst 33342 (Molecular Probes, Eugene, OR) y se visualizaron bajo un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 800. Las imágenes se adquirieron con una cámara Photometrics 300 CCD operada a -40°C conectada a un ordenador Apple G3. El mismo procedimiento también se usó para teñir secciones congeladas de tumores mamarios de ratones transgénicos Wnt-1.

**[0211]** RT-PCR en tiempo real: El nivel de expresión relativo de ARN se determinó usando RT-PCR en tiempo real como se informó previamente (Winer y col., Anal. Biochem., 270:41-49 (1999)). El ARN total se extrajo de células con Tri-Reagent usando el protocolo del fabricante (Molecular Research Center). Los cebadores específicos y las sondas fluorogénicas se diseñaron y se usaron para amplificar y cuantificar el nivel de expresión génica. Las señales específicas de genes se normalizaron a la del gen constitutivo gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Los conjuntos de datos por triplicado se promediaron para cada condición. Todos los

reactivos de RT-PCR TaqMan se compraron en Applied Biosystems (Foster City, CA). Para probar el efecto de WISP-1 recombinante sobre la expresión génica, placas de Petri (35 mm) se recubrieron durante la noche a 4°C con 75 µg ml<sup>-1</sup> de hWISP-1-Fc en PBS. Al día siguiente, las células (3 X 10<sup>5</sup> células/placa) se sembraron en la superficie recubierta y el análisis de expresión se realizó después de 18 horas. En ciertos casos, la superficie recubierta se lavó y se trató durante 2 horas adicionales a temperatura ambiente antes de sembrar las células.

**[0212]**     Análisis por FACS: Las células se recogieron por tripsinización, se lavaron con PBS y se incubaron en PBS BSA al 1%/glucosa al 20% que contenía 1 µg ml<sup>-1</sup> de anticuerpo dirigido contra CD44 conjugado con FITC (Serotec, Raleigh, NC) o un Ab isotipo de control (DAKO, Dinamarca) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron con el mismo tampón y se analizaron en un EPICS XL-MCL (Coulter, Miami, FL).

**[0213]**     Transferencia de Western: Se cultivaron NRK/C y NRK/WIH a confluencia en placas de 10 cm<sup>2</sup>. Las células se lavaron con PBS y se extrajeron con 300 µl de Triton-X100 al 1% en TBS durante 5 minutos. Las proteínas se precipitaron añadiendo 10 volúmenes de acetona al extracto. Las muestras se redujeron, se desnaturalizaron y se cargaron sobre un gel de poliacrilamida SDS al 4-20% de gradiente. El gel se transfirió a membranas de PVDF y se sondó con un anticuerpo dirigido contra CD44 de rata (OX49) o uno dirigido contra CD44 de ratón (KM114) a una concentración de 1 µg/ml y se detectó usando un anticuerpo secundario IgG anti-ratón conjugado con HRP y los reactivos de detección de Amersham ECL. La detección de actina en las muestras se usó como control de carga.

**[0214]**     Ensayo de dispersión: Las células se sembraron en placas de 24 pocillos a baja concentración (~1000 células/pocillo) y se dejó que formaran colonias durante 3 días. Las células se tiñeron usando Diff-Quik (Dade Behring, Newark, DE) y las colonias se observaron bajo el microscopio.

**[0215]**     Ensayo de cicatrización de células: La migración de células se evaluó usando un ensayo de cicatrización de células previamente descrito con modificaciones menores (Pienimaki y col., J. Biol. Chem., 276:20428-20435 (2001)). Brevemente, las células se cultivaron hasta que alcanzaron la confluencia. Se extrajo una línea (~1 mm) en la capa de células usando una micropipeta equipada con un punta amarilla desechable. La migración de células con respecto al área limpia se monitorizó por microscopía a intervalos de tiempo durante 15 horas. El área nuevamente ocupada por las células después de este periodo se midió usando el software de imágenes NIH

calibrado con un micrómetro de platina.

**[0216]** Microscopía a intervalos de tiempo: Las células se sembraron en placa en HGDMEM/SBF al 10% y se observó su migración aleatoria durante 15 horas usando microscopía a intervalos de tiempo. La distancia cubierta por las células se midió  
5 usando el software de imágenes NIH calibrado con un micrómetro de platina.

**[0217]** Ensayo de migración: Se midió la haptotaxia usando un sistema de cámara de Boyden modificado como se describe previamente (Bourguignon y col., J. Biol. Chem., 275:1829-1838 (2000)). La parte inferior de filtros de membrana de PET con forma de 25 pocillos de 8 µm de porosidad (Falcon) se recubrió durante la noche a 4°C  
10 con 50 µl de proteína (50 µg ml<sup>-1</sup>) en PBS. Los insertos recubiertos se aclararon en medio libre de suero y a la cámara superior se añadieron 0,5 X 10<sup>5</sup> células NRK en 0,5 ml de HGDMEM/SBF al 10%. La cámara inferior se llenó con 0,75 ml del mismo medio y las placas se incubaron durante la noche a 37°C. Al día siguiente, la cámara superior se limpió con un hisopo de algodón y las células que migraron al lado inferior  
15 del inserto se tiñeron con el kit de tinción Diff-Quik (Dade Behring Inc.) y se contaron bajo el microscopio. Los conjuntos de datos por triplicado se promediaron para cada condición. En ciertos casos, los insertos recubiertos se lavaron y se trataron durante 2 horas adicionales a temperatura ambiente.

**[0218]** Hibridación *in situ*: Se diseñaron cebadores de PCR para amplificar tanto  
20 un fragmento de 740 pb de WISP-1 murina que se extiende desde los nt 440-1180 de NM\_018865 (superior- 5' GGCTGCCATCTGTGACCCA (SEQ ID NO:12) e inferior- 5' CATAGGACCT GCCGGGAGAA A (SEQ ID NO:13)) o un fragmento de 706 pb de WISP-1 murina que se extiende desde los nt 204-910 de NM\_018865 (superior- 5' GCCGTGGCAGTCCTGAGGG (SEQ ID NO:14) e inferior- 5' CAGCACCGGG  
25 CATTGACGTT A (SEQ ID NO:15)) o un fragmento de 464 pb de CD44 murino que se extiende desde los nt 144-608 de M27129 (superior- 5' TGGAGAAAAATGGCCGCTAC A (SEQ ID NO:16) e inferior-5' TGGGGTGCTC TTCTCGATGG (SEQ ID NO:17)) o un fragmento de 630 pb de HAS2 murino que se extiende desde los nt 927-1557 de NM\_008216 (superior- 5'  
30 GGACAAATCGGCCACGTACA T (SEQ ID NO:18) e inferior-5' CTTGCTCCAT CGGGTCTGC (SEQ ID NO:19)). Los cebadores incluyeron extensiones que codificaban sitios de iniciación de T7 o T3 ARN polimerasa de 27 nucleótidos para permitir la transcripción *in vitro* de sondas de sentido directo o de sentido contrario, respectivamente, de los productos amplificados. (Lu y col., Cell Vision, 1:169-176  
35 (1994)). Todos los tejidos se fijaron en formalina al 4% y se incorporaron en parafina.

Se desparafinaron secciones de 3-5 micrómetros de espesor, se desproteínaron en 4 mg/ml de proteinasa K durante 30 minutos a 37°C y se procesaron adicionalmente para la hibridación *in situ* como se describe previamente. (Holcomb y col., EMBO J., Aug 2000 1;19(15):4046-55). Las sondas de sedido directo y contrario marcadas con <sup>33</sup>P-UTP se hibridaron con las secciones a 55°C durante la noche. La sonda sin hibridar se eliminó por incubación en 20 mg/ml de RNasa A durante 30 minutos a 37°C, seguido de un lavado de alta rigurosidad a 55°C en 0,1 X SSC durante 2 horas y deshidratación mediante disolución de etanol de diferente concentración. Los portaobjetos se sumergieron en emulsión de rastreo nuclear NBT2, se expusieron en cajas de portaobjetos de plástico selladas que contenían desecante durante 4 semanas a 4°C, se revelaron y se contratiñeron con hematoxilina y eosina.

### **EJEMPLO 1**

**[0219]** Se usaron líneas celulares de fibroblastos estables que expresan niveles altos (NRK/WISP-1H) o bajos (NRK/WISP-1L) de WISP-1 y una línea celular de control que contenía un vector vacío (NRK/control) para evaluar el efecto de WISP-1 sobre la producción de HA. Como se demuestra por el ensayo de exclusión de partículas, las células NRK/WISP-1H acumularon una gran recubrimiento pericelular de hialuronano que puede excluir eritrocitos en sedimentación (Fig. 1a). NRK/WISP-1L acumularon una matriz pericelular más pequeña (Fig. 1b), mientras que ninguna matriz rodeó a las células NRK/control (Fig. 1c) o NRK/WISP-1H tratadas con hialuronidasa (datos no mostrados). La acumulación de HA asociada a la superficie de células también se evaluó por tinción fluorescente usando la proteína biotinilada de unión a HA (bHABP). La tinción reveló la acumulación de HA en la superficie de células NRK/WISP-1H (Fig. 1d), mientras que no se detectó tinción sobre células de control NRK (Fig. 1e).

**[0220]** El efecto de WISP-1 sobre la secreción de HA se evaluó comparando la acumulación de HA en los medios de cultivo de células NRK/WISP-1H con respecto a células NRK/control con respecto al tiempo. Después de 24 horas, la concentración de HA en el medio de NRK/WISP-1H era 3,5 veces superior a la del medio de células NRK/control y aumentó gradualmente hasta 8 veces después de 144 h (Fig. 1f). Estos resultados muestran juntos que la expresión de WISP-1 en células NRK promueve la acumulación de HA en la superficie de células y en los medios de cultivo.

### **EJEMPLO 2**

**[0221]** Para identificar la enzima responsable de la producción de HA desencadenada por WISP-1 se analizó la expresión de las HA sintasas conocidas

(HAS1, HAS2 y HAS3) en células NRK/WISP-1H, NRK/WISP-1L y NRK/control. La expresión de HAS2 aumentó hasta 10 veces en células productoras de WISP-1, mientras que los niveles de ARNm de HAS1 y HAS3 fueron idénticos al control (Fig. 2a). Los niveles de ARNm de CD44 y RHAMM también aumentaron en líneas 5 celulares NRK/WISP-1, mientras que la expresión de hialuronidasa permaneció invariable (Fig. 2a). Además, los niveles de ARNm de HAS2, CD44 y RHAMM fueron proporcionales a la expresión de WISP-1. Como se demuestra por análisis de FACS (Fig. 2b) y transferencia Western (Fig. 2c), el aumento en la expresión de ARNm de CD44 en las células NRK/WISP-1H produjo un aumento de 4 veces en el 10 nivel en proteína de CD44.

### EJEMPLO 3

**[0222]** Se demostró que HA estimulaba la migración de células interactuando con dos receptores de la superficie celular, CD44 y RHAMM (Hall y col., anteriormente; Bourguignon y col., anteriormente). Debido a que WISP-1 aumentó tanto la 15 producción de HA como la expresión de CD44 y RHAMM, se evaluó la motilidad celular que expresaban WISP-1. Cuando se sembraron a una baja densidad, las células NRK/control proliferaron y se formaron colonias muy definidas (Fig. 3a). Las células NRK/WISP-1L proliferantes formaron menos grupos definidos que algunas células apartadas de las colonias en crecimiento (Fig. 3b). No se observaron colonias de 20 NRK/WISP-1H, las células se dispersaron en un patrón aleatorio (Fig. 3c). A diferencia del control (Fig. 3d), las células que expresaban WISP-1 también revelaron una morfología hiperalargada con característica de lamelipodio extendido de alta motilidad (Fig. 3e). Usando microscopía a intervalos de tiempo se observó un aumento de 4 veces en la distancia de migración de NRK/WISP-1H en comparación con células 25 de control (Fig. 3f). NRK/WISP-1H también mostraron un aumento de 2,5 en el área de migración en un ensayo de cicatrización de células (Fig. 3g). Estos resultados muestran juntos que la expresión de WISP-1 puede promover la migración de células.

### EJEMPLO 4

**[0223]** Para determinar si la adición ectópica de WISP-1 podría promover la 30 expresión de HAS2 y la migración de células se realizó un ensayo usando WISP-1-IgG recombinante purificado (Desnoyers y col., anteriormente). La adición de WISP-1 a los medios de cultivo no promovió la expresión de HAS2 (datos no mostrados). Cuando las células NRK se sembraron sobre una superficie recubierta con WISP-1-IgG, la expresión de HAS2 aumentó en comparación con células sembradas sobre 35 plástico sin recubrir o sobre una superficie recubierta de proteína quimérica de IgG

irrelevante (TNFR-IgG) (Fig. 4a). Aunque la decorina sola promovió la expresión de HAS2, esta inducción aumentó adicionalmente tres veces después de incubarse la superficie recubierta con WISP-1. También se examinaron los efectos de la adición ectópica de WISP-1 sobre la migración de células NRK. En un ensayo en Transwell, 5 WISP-1-IgG indujo la migración haptotáctica de células NRK cuando se recubrieron sobre la superficie inferior del filtro (Fig. 4b). El recubrimiento de una proteína quimérica de IgG irrelevante (TNFR-IgG) o la adición de WISP-1-IgG a la cámara inferior no promovió la migración. Un anticuerpo CD44 o de WISP-1 (Fig. 4b) inhibió la migración haptotáctica inducida por WISP-1. Además, la actividad haptotáctica de 10 WISP-1 no se limitó a fibroblastos ya que también promovió la migración de células SW480, una línea celular de adenocarcinoma de colon (Fig. 4c). Estos resultados muestran juntos que la adición ectópica de WISP-1 aumenta la expresión de HAS2 y promueve la migración de células mediante un mecanismo mediado por CD44. Se cree, aunque no se entiende completamente, que la presentación de WISP-1 puede ser 15 importante para la migración ya que puede necesitar unirse a un sustrato para provocar esta actividad.

### **EJEMPLO 5**

**[0224]** Debido a que se cree que WISP-1 es un efector en la dirección 3' de Wnt-1, se analizó la expresión de WISP-1, HAS2 y CD44 en una línea celular epitelial 20 mamaria establemente transfectada con Wnt-1 (C57MG/Wnt-1). Cuando se compararon con la línea celular de control (C57MG), las células C57MG/Wnt-1 mostraron un aumento de 2,7, 5,8 y 3 veces en la expresión de ARNm de WISP-1, HAS2 y CD44, respectivamente (Fig. 5a). Como se demuestra por transferencia Western, las células C57/Wnt-1 también mostraron un aumento de 6 veces en el 25 contenido en proteína de CD44 (Fig. 5b). Además, a diferencia de la línea celular de control, las células que expresaban Wnt-1 fracasaron al formar distintas colonias y se dispersaron cuando se pusieron en cultivo a baja densidad (Fig. 5c). Estos resultados muestran que la expresión de HAS2 y CD44 y la motilidad celular son elevadas en líneas celulares en las que la expresión de WISP-1 está desencadenada por Wnt-1.

### **EJEMPLO 6**

**[0225]** La expresión de Wnt-1 en epitelio mamario promueve el desarrollo de tumores en ratones transgénicos (Li y col., Oncogene, 19:1002-1009 (2000); Tsukamoto y col., Cell, 55:619-625 (1988)). Debido a que WISP-1 es un efector putativo en la dirección 3' de Wnt-1, se midió la expresión de ARNm de HAS2 y 35 CD44 en tumores mamarios espontáneos a partir de ratones transgénicos MMTV-Wnt-

1. Cuando se comparó con epitelio del conducto mamario, la expresión de ARNm de HAS2 aumentó entre 2,5 y 5,5 veces en todos los tumores mamarios analizados (n=5; Fig. 5d). Similarmente, la expresión de ARNm de CD44 se indujo entre 2,2 y 4,2 veces en todos los tumores (n=5; Fig 5e). Estos resultados muestran que HAS2 y CD44 están  
5 sobreexpresados en tumores mamarios de ratones transgénicos MMTV-Wnt-1 que expresan WISP-1.

### **EJEMPLO 7**

**[0226]** La hibridación *in situ* demostró una elevada expresión de WISP-1 en el estroma peritumoral de tumores mamarios de ratones transgénicos MMTV-Wnt-1 (Fig.  
10 6a, b). A diferencia, la expresión de HAS2 (Fig. 6c-d) y CD44 (Fig. 6 e-f) sólo se encontró en células epiteliales tumorales. La localización de CD44 en el parénquima tumoral se confirmó por inmunohistoquímica (Fig. 6g). La tinción de proteína de unión reveló una acumulación de hialuronano asociada al estroma de tumor (Fig. 6h). La mayor intensidad de tinción se encontró en la proximidad inmediata del lóbulo  
15 tumoral, mientras que la tinción más débil estaba localizada con respecto al epitelio del conducto mamario normal. Estos hallazgos están de acuerdo con la sugerencia de que WISP-1 puede regular interacciones entre células tumorales y de estroma que implican ácido hialurónico y CD44.

### **EJEMPLO 8**

**[0227]** La metástasis y el potencial de crecimiento de líneas transformadas se evaluó como se describe previamente (Welch y col., Cancer Res., 60:1552-1556 (2000)). Se usaron ratones hembra nu/nu Swiss de nueve semanas de edad. Brevemente, las células se recogieron por tripsinización y se lavaron dos veces con PBS. Cada ratón se inyectó en la vena lateral de la cola con 100 µl de una suspensión  
25 que contenía  $5 \times 10^4$  o  $2,5 \times 10^5$  células. 2, 3 y 4 semanas posinyección, los ratones se examinaron usando obtención de imágenes por resonancia cinemagnética (IRM) para la aparición de lesiones pulmonares y se realizaron las autopsias. Los pulmones se perfundieron en fijador de Bouin, se extirparon y se generaron secciones teñidas con H&E para la evaluación de la colonización tumoral pulmonar.

**[0228]** Se evaluaron secciones longitudinales del pulmón izquierdo, y una única sección transversal de los lóbulos craneales, mediales, caudales y accesorios del pulmón derecho. Histológicamente, los pulmones afectados tenían células neoplásicas fusiformes que se infiltraron en el intersticio pulmonar. Sin embargo, debido a que la gravedad de los cambios era variable, se estableció el siguiente sistema de  
35 clasificación.

I = implicación mínima en el intersticio pulmonar - 10-20% del pulmón está afectado. Nidos y agrupaciones de células neoplásicas fusiformes rompen multifocalmente el intersticio pulmonar. Los focos afectados están comúnmente a lo largo de la superficie pleural, extendiéndose en el intersticio. No se afectan vasos ni vías pulmonares  
5 grandes.

II = implicación moderada del intersticio pulmonar - 20-50% del pulmón está afectado. Nidos y agrupaciones de células neoplásicas fusiformes rompen multifocalmente el intersticio pulmonar. Algunos vasos o vías respiratorias grandes están llenos de células fusiformes. Las células fusiformes forman frecuentemente una banda ancha o gran  
10 masa subyacente a la pleura y que se extiende en el intersticio. El mesotelio depositado encima es grueso (reactivo).

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

20 **[0229]** Los resultados de la colonización de pulmón de ratones atímicos inoculados con células NRK/WISP-1H, NRK/WISP-1L y NRK/control se resumen en las Figuras 7 y 10. En ratones inoculados con NRK/WISP-1H o NRK/WISP-1L, las células formaron masas de pulmón de un modo dependiente del tiempo y de la dosis. Las lesiones más graves se observaron en ratones inyectados con  $2,5 \times 10^5$   
25 NRK/WISP-1H y a los que se les hizo la autopsia 4 semanas posinyección. 2 y 3 semanas posinyección, los ratones tenían menos formación de tumores graves, pero progresiva (grado I - II; véase el sistema de clasificación antes). Los ratones inyectados con  $2,5 \times 10^5$  NRK/WISP-1L sólo tenían una mínima formación de tumores pulmonares 4 semanas posinyección. Después de 4 semanas posinyección, los ratones  
30 inoculados con  $0,5 \times 10^5$  células NRK/WISP-1L eran o normales o tenían una mínima infiltración neoplásica (grado I), mientras que los ratones inyectados con  $0,5 \times 10^5$  células NRK/WISP-1H mostraron un aumento de la infiltración neoplásica (grado I-II). La observación histológica reveló que los pulmones de animales inoculados con células NRK/control eran normales (Fig. 7a-c). En animales inyectados con  
35 NRK/WISP-1, las células fusiformes neoplásicas formaron inicialmente pequeñas

agrupaciones dentro de, sobresaliendo de, o subyacentes a la superficie pleural de los pulmones (grado I; Fig. 7d-f) frecuentemente incorporados en un material acelular de basófilo a anfófilo pálido. En animales más gravemente afectados, las células neoplásicas formaron una amplia banda confluyente subyacente a la pleura (grado II; 5 Fig. 7g-i). En los animales más gravemente afectados, los vasos sanguíneos y las vías respiratorias grandes se llenaron de células fusiformes, (grado III; Fig. 7j-1). El análisis por IRM mostró un aumento de la densidad (hiperseñal) que trazaba los pulmones derecho e izquierdo entre la pleura en animales con invasión histológica de grado II y grado III. La gravedad de la lesión en IRM guardaba relación con la puntuación 10 histológica (Figura 7a, d, g, j). Estos resultados indican que la expresión de WISP-1 promueve el potencial de crecimiento metastásico celular.

#### EJEMPLO 9

**[0230]** Se inocularon células NRK/WISP-1H ( $2,5 \times 10^5$  células) en la vena de la cola de ratones atímicos. Empezando en el día de la inoculación de las células, los 15 ratones se inyectaron intraperitonealmente dos veces a la semana con 10 mg/kg de un anticuerpo CD44, un anticuerpo isotipo de control o con tampón solo (PBS). Los pulmones se fijaron y se extirparon después de cuatro semanas para el análisis anatómico macroscópico.

**[0231]** Después de 4 semanas, la gravedad de las lesiones encontradas en animales 20 tratados con el anticuerpo CD44 (n=5) varió de normal a grado I, mientras que todos los animales (n=10) tratados con un anticuerpo de control o solución salina tenían lesiones de grado III (Fig. 8a). El área promedio de los focos metastásicos en los pulmones de animales tratados con anticuerpo CD44 se redujo el 99% ( $P < 0,00003$ ) en comparación con animales tratados con un anticuerpo de control (Fig. 8b).

#### EJEMPLO 10

**[0232]** Se realizó un ensayo para examinar la especificidad de unión de ciertos anticuerpos de WISP-1. Se clonaron WISP-1 de ratón de longitud completa (número de registro de GenBank NM\_018865) y WISP-1 humana de longitud completa (número de registro de GenBank AF100779; Fig. 9) en un vector de expresión que 30 codificaba la región Fc de IgG<sub>1</sub> humana en la dirección 3' de la secuencia de WISP-1. La proteína de fusión recombinante resultante (WISP-1-Fc) se sintetizó en un sistema de expresión en baculovirus usando células de insecto Sf9 y se purificó hasta homogeneidad a partir de medio acondicionado libre de suero por cromatografía de afinidad sobre una proteína A-Sepharose 4 Fast Flow (Amersham Pharmacia Biotech). 35 La WISP-1 humana de longitud completa también se expresó con un marca de

hexahistidina en el extremo amino (WISP-1-His) en una cepa de *E. coli*. Los lisados de células se sometieron a cromatografía en una columna de Ni<sup>2+</sup>-NTA agarosa (Qiagen). WISP-1-His se eluyó con un gradiente de imidazol 0 a 500 mM. Las fracciones que contenían la WISP-1-His eluida se reunieron y se dializaron. La WISP-1 humana de un sistema de expresión en mamífero se obtuvo lisando células NRK establemente transfectadas con WISP-1 humana (Arnold Levine; Princeton University, Princeton, NJ) con tampón de muestra de SDS-PAGE. Se generó un lisado de células de control con células NRK establemente transfectadas con un vector vacío.

**[0233]** Se sometió WISP-1 (50 ng) procedente de diversos sistemas de expresión a electroforesis sobre un gel de SDS-poliacrilamida y se electrotransfirió sobre membranas de poli(difluoruro de vinilo) (PVDF) y se sondearon con diferentes anticuerpos monoclonales de WISP-1.

**[0234]** Los anticuerpos de WISP-1 3D11.D7 (también denominado en este documento "3D11"), 11C2.C10 (también denominado en este documento "11C2"), 9C11.C7 (también denominado en este documento "9C11") y 5D4.F6 (también denominado en este documento "5D4") se unieron específicamente a WISP-1 generada a partir de sistemas de expresión en baculovirus, bacterianos y en mamífero (Fig. 11a). Estos anticuerpos no se unieron a WISP-1 murina de baculovirus y no reconocieron ninguna proteína del lisado de control. Los anticuerpos de WISP-1 6F8, 3A7, 10H12, 3A11, 6E3, 3H10, 5G1 y 10B1 reconocieron WISP-1 tanto humana como murina sólo cuando se generaron con el sistema de expresión en baculovirus (Fig. 11b). Estos anticuerpos no reconocieron WISP-1 humana cuando se produjeron en un sistema de expresión bacteriano o en mamífero. El anticuerpo del clon 9C10 no se unió a ninguna proteína después de la transferencia Western.

**[0235]** Estos resultados sugieren que los anticuerpos de WISP-1 3D11, 11C2, 9C11 y 5D4 reconocen específicamente WISP-1 humana y pueden usarse para la detección de WISP-1 por transferencia Western.

### **EJEMPLO 11**

**[0236]** Se realizó un ensayo para identificar los epítomos reconocidos por los anticuerpos de WISP-1 11C2, 9C11, 5D4 y 3D11.

**[0237]** Se clonó WISP-1 humana de longitud completa (número de registro de GenBank AF100779) en un vector de expresión pIRESpuro2 (Clontech Laboratories, Palo Alto, CA) que codificaba 6 histidinas en la dirección 3' de la secuencia de WISP-1. Los mutantes de delección también se generaron eliminando uno, dos o tres dominios de WISP-1 humana. Las construcciones resultantes también se clonaron en el

vector de expresión pIRESpuo2. La nomenclatura usada para identificar los diferentes construcciones de WISP-1 se refiere a los dominios que contienen (véase la Fig. 12B). El dominio 1 es el dominio de proteína de unión a factor de crecimiento similar a la insulina (IFGBP), el dominio 2 es el dominio del factor de von Willebrand C (VWFc), el dominio 3 es el dominio de trombospondina (TSP) y el dominio 4 es el dominio del extremo C (CT). La región variable reside entre el dominio 2 y 3. Estas regiones y dominios de WISP-1 se ilustran en la Fig. 12A.

**[0238]** Las secuencias que codifican estos dominios de WISP-1 son del siguiente modo: Secuencias de construcciones de WISP-1

10 Dominio 1:

```
GAATTCACCATGAGGTGGTTCCCTGCCCTGGACGCTGGCAGCAGTGACAGCAGCAGCCGCCAGCACCGTCCTGGCCA
CGGCCCTCTCTCCAGCCCCCTACGACCATGGACTTTACTCCAGCTCCACTGGAGGACACCTCCTCACGCCCCCAATT
CTGCAAGTGGCCATGTGAGTGCCCGCCATCCCCACCCGCTGCCCGCTGGGGGTGAGCCTCATCACAGATGGCTGT
GAGTGCTGTAAGATGTGCGCTCAGCAGCTTGGGGACAACGACGAGGCTGCCATCTGTGACCCCCACCGGGGCC
TCTACTGTGACTACAGCGGGGACCGCCGAGGTACGCAATAGGAGTGTGTGCACAGGCGGCCGCACACCACCATCA
CCATCACCATCACTAAGTGAGGCCGCATAGATAACTGATCCAGTGTGCTGGAATTAATTC (SEQ ID NO:3)
```

Dominio 2:

```
GAATTCACCATGAGGTGGTTCCCTGCCCTGGACGCTGGCAGCAGTGACAGCAGCAGCCGCCAGCACCGTCCTGGCCA
CTGCAGTGGTCGGTGTGGGCTGCGTCTGGATGGGGTGCGTACAACAACGGCCAGTCCTTCCAGCCTAATGCAA
GTACAACTGCACGTGCATCGACGGCGCGGTGGGCTGCACACCACTGTGCCTCCGAGTGCGCCCCCGCGTCTCTGG
TGCCCCCACCGCGGCGCGTGAGCATACCTGGCCACTGCTGTGAGCAGTGGGTATGTGCGGCCGCACACCACCATC
ACCATCACCATCACTAAGTGAGGCCGCATAGATAAC (SEQ ID NO:4)
```

Dominio 3:

```
GAATTCACCATGAGGTGGTTCCCTGCCCTGGACGCTGGCAGCAGTGACAGCAGCAGCCGCCAGCACCGTCCTGGCCA
CTGCAGCATGGCACAGGAAGTGCATAGCCTACACAAGCCCTGGAGCCCTTGCTCCACAGCTGCGGCCTGGGGGT
CTCCACTCGGATCTCCAATGTTAAGCGCCAGTGCTGGCCTGAGCAAGAGAGCCGCTCTGCAACTTGCGGCCATGC
GATGTGGACATCCATACACTCATTAAAGCGGCCGCACACCACCATCACCATCACCATCACTAAGTGAGGCCGCATA
GATAACTGATCCAGTGT (SEQ ID NO:5)
```

15

Dominio 4:

```
GAATTCACCATGAGGTGGTTCCCTGCCCTGGACGCTGGCAGCAGTGACAGCAGCAGCCGCCAGCACCGTCCTGGCCA
CTGCAGGGAAGAAGTGTCTGGCTGTGTACCAGCCAGAGGCATCCATGAACTTCACACTTGCGGGCTGCATCAGCAC
ACGCTCCTATCAACCAAGTACTGTGGAGTTGTCATGGACAATAGGTGCTGCATCCCCTACAAGTCTAAGACTATC
GACGTGTCTTCCAGTGTCTGATGGGCTTGGCTTCTCCCGCCAGGTCTATGGATTAATGCTGCTTCTGTAACC
TGAGCTGTAGGAATCCCAATGACATCTTGTGCTGACTTGGAATCCTACCCTGACTTCTCAGAAATGCCAACGCGGC
CGCACACCACCATCACCATCACCATCACTAAGTGAGGCCGCATAGATAACTGATCCAGTGTG (SEQ ID
NO:6)
```

Dominio 1,2:

GAATTCACCATGAGGTGGTTCCCTGCCCTGGACGCTGGCAGCAGTGACAGCAGCAGCCGCCAGCACCCTCCTGGCCA  
CGGCCCTCTCTCCAGCCCCTACGACCATGGACTTTACTCCAGCTCCACTGGAGGACACCTCCTCACGCCCCCAATT  
CTGCAAGTGGCCATGTGAGTGCCCGCCATCCCCACCCCGCTGCCCGCTGGGGGTGAGCCTCATCACAGATGGCTGT  
GAGTGCTGTAAGATGTGCGCTCAGCAGCTTGGGGACAACGACGAGGCTGCCATCTGTGACCCCCACGGGGGCC  
TCTACTGTGACTACAGCGGGGACCGCCGAGGTACGCAATAGGAGTGTGTGCACAGGTGGTGGTGTGGGCTGCGT

CCTGGATGGGGTGCCTACAACAACGGCCAGTCCTTCCAGCCTAACTGCAAGTACAACGACGTGCATCGACGGC  
GCGGTGGGCTGCACACCACTGTGCCTCCGAGTGCGCCCCCGCGTCTCTGGTGCCCCACCCGCGGCGGTGAGCA  
TACCTGGCCACTGCTGTGAGCAGTGGGTATGTGCGGCCGACACCACCATCACCATCACCATCACTAAGTGAGGCC  
GCATAGATAAC (SEQ ID NO:7)

Dominio 1,2,3:

GAATTCACCATGAGGTGGTTCCCTGCCCTGGACGCTGGCAGCAGTGACAGCAGCAGCCGCCAGCACCCTCCTGGCCA  
CGGCCCTCTCTCCAGCCCCTACGACCATGGACTTTACTCCAGCTCCACTGGAGGACACCTCCTCACGCCCCCAATT  
CTGCAAGTGGCCATGTGAGTGCCCGCCATCCCCACCCCGCTGCCCGCTGGGGGTGAGCCTCATCACAGATGGCTGT  
GAGTGCTGTAAGATGTGCGCTCAGCAGCTTGGGGACAACGACGAGGCTGCCATCTGTGACCCCCACGGGGGCC  
TCTACTGTGACTACAGCGGGGACCGCCGAGGTACGCAATAGGAGTGTGTGCACAGGTGGTGGTGTGGGCTGCGT  
CCTGGATGGGGTGCCTACAACAACGGCCAGTCCTTCCAGCCTAACTGCAAGTACAACGACGTGCATCGACGGC  
GCGGTGGGCTGCACACCACTGTGCCTCCGAGTGCGCCCCCGCGTCTCTGGTGCCCCACCCGCGGCGGTGAGCA  
TACCTGGCCACTGCTGTGAGCAGTGGGTATGTGAGGACGACGCCAAGAGGCCACGCAAGACCGCACCCTGACAC  
AGGAGCCTTCGATGCTGTGGGTGAGGTGGAGGCATGGCAGGAACTGCATAGCCTACACAAGCCCTGGAGCCCT  
TGCTCCACCAGCTGCGGCCTGGGGGTCTCCACTCGGATCTCCAATGTTAACGCCAGTGCTGGCCTGAGCAAGAGA  
GCCGCTCTGCAACTTGCGGCCATGCGATGTGGACATCCATACACTCATTAAGGCgGCCGACACCACCATCACCA  
TCACCATCACTAAGTGAGGCCGCATAGATAACTGATCCAGTGTGCTGGA (SEQ ID NO:8)

Dominio 1,2,4:

GAATTCACCATGAGGTGGTTCCCTGCCCTGGACGCTGGCAGCAGTGACAGCAGCAGCCGCCAGCACCCTCCTGGCCA  
CGGCCCTCTCTCCAGCCCCTACGACCATGGACTTTACTCCAGCTCCACTGGAGGACACCTCCTCACGCCCCCAATT  
CTGCAAGTGGCCATGTGAGTGCCCGCCATCCCCACCCCGCTGCCCGCTGGGGGTGAGCCTCATCACAGATGGCTGT  
GAGTGCTGTAAGATGTGCGCTCAGCAGCTTGGGGACAACGACGAGGCTGCCATCTGTGACCCCCACGGGGGCC  
TCTACTGTGACTACAGCGGGGACCGCCGAGGTACGCAATAGGAGTGTGTGCACAGGTGGTGGTGTGGGCTGCGT  
CCTGGATGGGGTGCCTACAACAACGGCCAGTCCTTCCAGCCTAACTGCAAGTACAACGACGTGCATCGACGGC  
GCGGTGGGCTGCACACCACTGTGCCTCCGAGTGCGCCCCCGCGTCTCTGGTGCCCCACCCGCGGCGGTGAGCA  
TACCTGGCCACTGCTGTGAGCAGTGGGTATGTCTGCAGGCAGGGAAGAAGTGTCTGGCTGTGTACCAGCCAGAGGC  
ATCCATGAACCTTACACATTGCGGGCTGCATCAGCACACGCTCCTATCAACCAAGTACTGTGGAGTTTGCATGGAC  
AATAGGTGCTGCATCCCTACAAGTCTAAGACTATCGACGTGTCCTTCCAGTGTCTGATGGGCTTGGCTTCTCCC  
GCCAGGTCTATGGATTAATGCCTGCTTCTGTAACCTGAGCTGTAGGAATCCCAATGACATCTTGTGACTTGA  
ATCCTACCCTGACTTCTCAGAAATTGCCAACGCGGCCGACACCACCATCACCATCACCATCACTAAGTGAGGCCG  
CATAGATAACTGATCCAGTGTGCTGGAATTAATTCGCTGTCTGCGAGGGCCAGCTGTTGGGGTGAGTACTCCCTCT  
CAAAGCGGGCATGACTTCTGCGCTA (SEQ ID NO:9)

5

Dominio 1,3,4:

GAATTCACCATGAGGTGGTTCCTGCCCTGGACGCTGGCAGCAGTGACAGCAGCAGCCGCCAGCACCGTCCTGGCCA  
CGGCCCTCTCTCCAGCCCCTACGACCATGGACTTTACTCCAGCTCCACTGGAGGACACCTCCTCACGCCCCAATT  
CTGCAAGTGGCCATGTGAGTGCCCGCCATCCCCACCCCGCTGCCCGCTGGGGGTCAGCCTCATCACAGATGGCTGT  
GAGTGCTGTAAGATGTGCGCTCAGCAGCTTGGGGACAACATGCACGGAGGCTGCCATCTGTGACCCACCGGGGCC  
TCTACTGTGACTACAGCGGGGACCGCCGAGGTACGCAATAGGAGTGTGTGCGCATGCTGTGGGTGAGGTGGAGGC

ATGGCACAGGAAGTGCATAGCCTACACAAGCCCCTGGAGCCCTTGCTCCACCAGCTGCGGCCTGGGGGTCTCCACT  
CGGATCTCCAATGTTAACGCCCAGTGTGGCCTGAGCAAGAGAGCCGCTCTGCAACTTGCGGCCATGCGATGTGG  
ACATCCATACACTCATTAAAGGCAGGGAAGAAGTGTCTGGCTGTGTACCAGCCAGAGGCATCCATGAACCTCACACT  
TGCGGGCTGCATCAGCACACGCTCCTATCAACCCAAGTACTGTGGAGTTGCATGGACAATAGGTGCTGCATCCCC  
TACAAGTCTAAGACTATCGACGTGTCTTCCAGTGTCTGATGGGCTTGCTTCTCCGCCAGGTCTTATGGATTA  
ATGCCTGCTTCTGTAACCTGAGCTGTAGGAATCCCAATGACATCTTGTGACTTGGAATCCTACCCTGACTTCTC  
AGAAATTGCCAACGCGGCCGACACCACCATCACCATCACCATCACTAAGTGAGGCCGCATAGATAAC (SEQ ID  
NO:10)

Dominio 2,3,4:

GAATTCACCATGAGGTGGTTCCTGCCCTGGACGCTGGCAGCAGTGACAGCAGCAGCCGCCAGCACCGTCC  
TGGCCACTGCAGTGGTTCGGTGTGGGCTGCGTCTGGATGGGGTGCGCTACAACAACGGCCAGTCTTCCAGCCTAA  
CTGCAAGTACAAGTGCACGTGCATCGACGGCGCGGTGGGCTGCACACCACTGTGCCTCCGAGTGCGCCCGCGT  
CTCTGGTGCCTCCACCGCGCGCGTGGGCTGAGCATACTGGCCACTGCTGTGAGCAGTGGGTATGTGAGGACGACGCCA  
AGAGGCCACGCAAGACCGCACCCCGTGACACAGGAGCCTTCGATGCTGTGGGTGAGGTGGAGGCATGGCACAGGAA  
CTGCATAGCCTACACAAGCCCCTGGAGCCCTTGCTCCACCAGCTGCGGCCTGGGGGTCTCCACTCGGATCTCCAAT  
GTTAACGCCAGTGTGGCCTGAGCAAGAGAGCCGCTCTGCAACTTGCGGCCATGCGATGTGGACATCCATACAC  
TCATTAAGGCAGGGAAGAAGTGTCTGGCTGTGTACCAGCCAGAGGCATCCATGAACCTCACACTTGCGGGCTGCAT  
CAGCACACGCTCCTATCAACCCAAGTACTGTGGAGTTTGCATGGACAATAGGTGCTGCATCCCTACAAGTCTAAG  
ACTATCGACGTGTCTTCCAGTGTCTGATGGGCTTGCTTCTCCGCCAGGTCTTATGGATTAATGCCTGCTTCT  
GTAACCTGAGCTGTAGGAATCCCAATGACATCTTGTGACTTGGAATCCTACCCTGACTTCTCAGAAATTGCCAA  
CGCGGCCGACACCACCATCACCATCACCATCACTAAGTGAGGCCGCATAGATAACTGATCCAGTGTGCTGGAATT  
AATTCGCTGTCTGCGA (SEQ ID NO:11)

5 [0239] Se transfectaron células (HEK 293T) con las diferentes construcciones, y los medios de cultivo se recogieron después de 48 horas. Un mililitro de medio de cultivo se incubó con 20 µl de cobalto-agarosa durante 1 hora, se centrifugó y se lavó. Las proteínas adsorbidas se eluyeron mediante calentamiento del sedimento a 100°C durante 5 minutos en 20 µl de tampón de muestra de SDS-PAGE. Las muestras se  
10 sometieron a electroforesis, se electrotransfirieron sobre PVDF y se sondaron con los diferentes anticuerpos de WISP-1.

[0240] Los anticuerpos 11C2, 9C11 y 5D4 sólo reconocieron construcciones de WISP-1 que contenían los 19 primeros aminoácidos de la región variable localizada entre el dominio 2 y 3 (Fig. 12C; 12E; 12G). El anticuerpo de WISP-1 3D11 sólo  
15 reconoció construcciones de WISP-1 que contenían el dominio 1 (aminoácidos 24 a 117; Fig. 12D; 12F).

**[0241]** Estos resultados indican que los anticuerpos 11C2, 9C11 y 5D4 reconocen específicamente la región variable de WISP-1, mientras que el anticuerpo 3D11 reconoce específicamente el dominio 1 de WISP-1.

### **EJEMPLO 12**

5 **[0242]** Se realizó un ensayo para identificar el epítipo reconocido por el anticuerpo de WISP-1 9C10.F5 (también denominado en este documento “9C10”).

**[0243]** El medio de cultivo de células HEK 293T transfectadas con las diversas construcciones de delección de WISP-1 (como se describe anteriormente en el Ejemplo 11) se incubó con 1 µg de anticuerpo de WISP-1 9C10 y 20 µl de proteína A-agarosa  
10 durante 1 hora a temperatura ambiente. El inmunocomplejo se precipitó por centrifugación y se eluyó mediante calentamiento del sedimento a 100°C durante 5 minutos en 20 µl de tampón de muestra de SDS-PAGE. Las muestras se sometieron a electroforesis, se electrotransfirieron sobre PVDF y se sondaron con anticuerpo de WISP-1 11C2.

15 **[0244]** El anticuerpo 9C10 sólo inmunoprecipitó construcciones que contenían el dominio 1 de WISP-1 (Fig. 13). Estos resultados demuestran que el anticuerpo 9C10 reconoce específicamente el dominio 1 de WISP-1 y puede usarse para inmunoprecipitación.

### **EJEMPLO 13**

20 **[0245]** Placas Maxisorb se recubrieron con el anticuerpo de WISP-1 9C10 (100 µl de 2 µg/ml en tampón carbonato, pH 9,6) durante la noche a 4°C. Las placas se bloquearon con 200 µl de PBS/BSA al 3% durante 1 hora. Se hizo una curva patrón de diluciones seriadas de WISP-1-Fc (100 µl en PBS/BSA al 3%) y se incubaron durante 1 hora. Después de la incubación, las placas se lavaron con 100 µl de PBS/Tween al  
25 0,05% y los anticuerpos de WISP-1 (100 µl de 2 µg/ml) en PBS/BSA al 3% (11C2 o 55B biotinilado) se incubaron durante 1 hora. Para 11C2 biotinilado, las placas se incubaron adicionalmente con 2 µg/ml de estreptavidina conjugada con HRP. Para 55B, las placas se lavaron y se incubaron con IgG de burro dirigida contra conejo conjugada con HRP durante 1 hora. Al final de la incubación, los pocillos se lavaron 6  
30 veces con 200 µl de PBS que contenía Tween-20 al 0,05%, y la señal se visualizó usando 100 µl del sustrato cromogénico de peroxidasa de rábano picante TMB (Kirkegaard & Perry Laboratories). La reacción se detuvo con 100 µl de ácido fosfórico 1 M, y se midió la DO a 450 nm. La unión no específica se determinó en incubaciones en paralelo omitiendo el recubrimiento de pocillos de microtitulación. No  
35 se generó señal cuando se omitió WISP-1-Fc o un anticuerpo de WISP-1.

**[0246]** Usando el anticuerpo 9C10 para la captura y los anticuerpos 11C2 y 55B para la detección, se realizó un ELISA que puede detectar concentración de WISP-1 de tan sólo 0,4 µg/ml (Fig. 14). Este ELISA puede ser útil para detectar proteína WISP-1 en fluidos biológicos tales como suero.

#### 5 **EJEMPLO 14**

**[0247]** Las placas Maxisorb se recubrieron durante la noche a 4°C con 50 µl/pocillo de 10 µg/ml de heparina (Sigma). Los sitios de unión no específica se bloquearon con 200 µl de PBS/BSA al 3% durante 1 hora. Entonces, las placas se incubaron durante 1 hora con 50 µl de 6 µg/ml de hWISP-1-Fc en PBS/BSA al 3% en  
10 presencia de diluciones seriadas de anticuerpos de WISP-1. Las placas se lavaron con PBS/Tween al 0,05% y se incubaron adicionalmente 1 hora con 50 µl de 2 µg/ml de IgG-Fc anti-humana conjugada con HRP en PBS/BSA al 3%. Las placas se lavaron y se añadieron 100 µl de sustrato HRP (TMB). El revelado de color se detuvo con 100 µl de ácido fosfórico 1 M y se midió la DO a 450 nm.

15 **[0248]** Los anticuerpos de WISP-1 11C2, 5D4 y 9C11 inhibieron la unión de WIPS-1 a heparina con una  $CI_{50}$  de 1,9, 2,5 y 3,7 µg/ml, respectivamente (Fig. 15). El anticuerpo 3D11 redujo moderadamente la unión de WIPS-1 a heparina con una inhibición máxima del 62% a la mayor concentración probada (40 µg/ml). El anticuerpo 9C10 no atenuó la unión a heparina de WISP-1, que muestra una curva de  
20 inhibición similar al control de anticuerpo irrelevante.

**[0249]** Estos resultados demuestran que los anticuerpos que reconocen la región variable pueden inhibir la unión de WIPS-1 a heparina. Debido a que los dos anticuerpos de WISP-1 que reconocen el dominio 1 tienen poco o ningún efecto sobre la unión de WIPS-1 a heparina, actualmente se cree que es menos probable que el  
25 dominio 1 participe en esta interacción.

#### **EJEMPLO 15**

**[0250]** La haptotaxia se midió usando un sistema de cámara de Boyden modificado. La parte inferior de filtros de membrana de PET con forma de 24 pocillos de 8 µm de porosidad (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey) se recubrió  
30 durante la noche a 4°C con 50 µl de proteína (50 µg/ml) en PBS. Se añadieron células de riñón de rata normales (NRK;  $5 \times 10^4$ /0,5 ml de HGD MEM/SBF al 10%) a la cámara superior, la cámara inferior se llenó del mismo medio y las placas se incubaron a 37°C. Al día siguiente, la cámara superior se limpió con un hisopo de algodón y las células que migraron al lado inferior del inserto se tiñeron y se contaron bajo un  
35 microscopio. Los conjuntos de datos por triplicado se promediaron para cada

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

**[0251]** En un ensayo en Transwell, WISP-1-Fc recubierta sobre la superficie inferior de los filtros indujo la migración haptotáctica de células NRK (Fig. 16A). El recubrimiento de una proteína quimérica de IgG irrelevante (TNFR-Fc) o la adición de WISP-1-Fc a la cámara inferior no promovió la migración. En presencia de WISP-1-Fc recubierta, cinco anticuerpos de WISP-1 diferentes (9C10, 11C2, 3D11, 9C11, 5D4) inhibieron notablemente la migración de células. En ausencia de WISP-1-Fc recubierto, estos anticuerpos no mostraron ningún efecto sobre la migración de células. Estos resultados demuestran que anticuerpos de WISP-1 pueden modular la migración de células en presencia de WISP-1. Bloqueando la migración de células, los anticuerpos de WISP-1 pueden desempeñar una función terapéutica importante en la prevención de la progresión del cáncer.

**[0252]** En la Fig. 16B se proporciona un resumen de las características y propiedades de los anticuerpos 3D11, 9C10, 11C2, 5D4 y 9C11 tratados en los ejemplos anteriores.

#### EJEMPLO 16

**[0253]** Ratones hembra nu/nu Swiss de nueve semanas de edad se inyectaron en la vena lateral de la cola con 100  $\mu$ l de una suspensión que contenía  $2,5 \times 10^5$  células. A partir del día de la inoculación, los ratones se trataron bisemanalmente mediante inyección intraperitoneal (10 mg/kg) de anticuerpos de WISP-1 (9C11, 11C2, 5D4, 9C10, 3D11) o anticuerpo isotipo de control. Después de 3 semanas, los pulmones se perfundieron con formalina al 4% tamponada neutra, se extirparon y se generaron secciones teñidas con H&E. Se evaluaron secciones longitudinales del pulmón izquierdo, y una sección transversal de los lóbulos craneales, mediales, caudales y accesorios del pulmón derecho. Para cada portaobjetos se contó el número de focos metastásicos y se midió el área promedio de focos metastásicos usando el software SPOT RT (Diagnostic Instruments Incorporated, Burlingame, California). El área ( $\mu\text{m}^2$ ) se determinó para al menos cinco focos metastásicos individuales en cuatro secciones de pulmón.

**[0254]** Después de 3 semanas, la gravedad de las lesiones encontradas en animales tratados con el anticuerpo de WISP-1 se había atenuado enormemente en comparación con el control (Fig. 17 a, b). El número de nódulos y el área promedio de los focos metastásicos encontrados en ratones tratados con anticuerpos de WISP-1 (n=5) se redujeron en comparación con animales tratados con un anticuerpo de control (Fig. 17

c, d). Además, tras el tratamiento con el anticuerpo de WISP-1, el área pulmonar total cubierta por las lesiones se redujo el 82-97% en comparación con el animal tratado con un anticuerpo isotipo de control (Fig. 17e). Estos resultados demuestran la eficacia *in vivo* de anticuerpos de WISP-1 en la reducción de la carga tumoral relacionada con 5 metástasis. Aunque el mecanismo de acción de los anticuerpos de WISP-1 no se entiende completamente, se cree que su eficacia puede estar mediada por una capacidad reductora del crecimiento y/o una capacidad en la inhibición de la motilidad, invasión y siembra de células cancerosas en un sitio de tejido.

### **EJEMPLO 17**

10 **[0255]** Se clonó WISP-1 de ratón de longitud completa (número de registro de GenBank NM\_018865) en el vector de expresión de mamífero pRK. La construcción resultante (pRK-WISP-1; 18 ug) se transfectó simultáneamente con 2 ug de plásmido pSVi-puromicina en una línea celular de adenocarcinoma mamario de ratón 4T1 (obtenida del Dr. Fred Miller, Barbara Ann Karmanos Cancer Institute, Detroit, MI) 15 usando Fugene6 (Roche) según instrucciones del fabricante. Después de 2 días, las células se seleccionaron en 2 µg/ml de puromicina. Después de 2 semanas, los clones se aislaron y la expresión de WISP-1 se evaluó por inmunofluorescencia. El mismo procedimiento se usó para generar líneas celulares de control usando un vector vacío. Las líneas celulares 4T1/control y 4T1/WISP-1 resultantes se mantuvieron en medio de 20 Iscove que contenía SBF al 10% y 3 µg/ml de puromicina.

**[0256]** La expresión de WISP-1 en las líneas celulares 4T1/control, 4T1/WISP-1L, 4T1/WISP-1H, NRK/control, NRK/WISP-1L y NRK/WISP-1H se midió por RT-PCR semicuantitativa (Taqman) usando cebadores y sondas que no distinguían entre gen de WISP-1 humano y de ratón.

25 **[0257]** WISP-1 no se expresó en las líneas celulares 4T1/control. La expresión de WISP-1 en la línea celular 4T1/WISP-1H era 2 veces superior a en 4T1/WISP-1L, pero 700 veces inferior a en NRK/WISP-1H (Figura 18).

### **EJEMPLO 18**

**[0258]** Para evaluar el efecto de WISP-1 sobre la dispersión de células 4T1 se 30 sembraron 100.000 células 4T1/control, 4T1/WISP-1L o 4T1/WISP-1H en una placa de 6 pocillos en medio de Iscove que contenía suero bovino fetal al 10%. Cuando se sembraron a una baja densidad, las células 4T1/control proliferaron y formaron colonias muy definidas (Fig. 19). La proliferación de células 4T1/WISP-1L formó grupos menos definidos que algunas células apartadas de las colonias de crecimiento 35 (Fig. 19). No se observaron colonias de 4T1/WISP-1H y las células se dispersaron en

un patrón aleatorio (Fig. 19). Estos resultados sugieren juntos que la expresión de WISP-1 promueve la migración de células.

### **EJEMPLO 19**

**[0259]** También se evaluó el efecto de WISP-1 sobre la invasión de células 4T1 usando un sistema de cámara de Boyden modificada recubierta con Matrigel de filtros de membrana de PET en formato de 24 pocillos de 8 µm de porosidad (Falcon). Se añadieron células 4T1/control, 4T1/WISP-1L o 4T1/WISP-1H (100.000 células) a la cámara superior en 0,5 ml de medio de Iscove. La cámara inferior se llenó de 0,75 ml del mismo medio que contenía suero bovino fetal al 5% y las placas se incubaron durante la noche a 37°C. Al día siguiente, la cámara superior se limpió con un hisopo de algodón y las células que migraron al lado inferior del inserto se tiñeron con el kit de tinción Diff-Quik (Dade Behring Inc.) y se contaron bajo el microscopio. Los conjuntos de datos por triplicado se promediaron para cada condición. Las células 4T1/WISP-1H y 4T1/WISP-1L demostraron un aumento de 12 y 6 veces en la invasión en comparación con 4T1/control, respectivamente (Fig. 20). Estos resultados sugieren que WISP-1 promueve la invasión de células epiteliales mamarias tumorigénicas y puede desempeñar una función en la metástasis.

### **EJEMPLO 20**

**[0260]** Se evaluaron los efectos de WISP-1 sobre la tumorigénesis de células epiteliales mamarias inyectando  $1,5 \times 10^5$  células (4T1/control 1, 4T1/control 2, 4T1/WISP-1L o 4T1/WISP-1H) en la cuarta bola adiposa mamaria de ratones BALB/c hembra de 6-8 semanas de edad (6 ratones/grupo). Los volúmenes tumorales se midieron tres veces por semana. Treinta y un días después de la inyección, los ratones se sacrificaron, los tumores se extirparon y se pesaron.

**[0261]** La inoculación de células 4T1/WISP-1L (Fig. 21a; cuadrados vacíos) y células 4T1/WISP-1H (Fig. 21a; cuadrados rellenos) generó tumores de crecimiento más rápidamente en comparación con células 4T1/control 1 y 4T1/control 2 (Fig. 21a; círculos vacíos y rellenos). Después de 31 días, los tumores formados por 4T1/WISP-1L y 4T1/WISP-1L inoculados fueron 4 veces más grandes (Fig. 21a) y 3 veces más pesados (Fig. 21b) que los tumores formados por células 4T1/control. Estos resultados sugieren que WISP-1 puede aumentar la proliferación de células tumorales epiteliales mamarias.

### **EJEMPLO 21**

**[0262]** Se midió la expresión de HAS2 y CD44 en tumores formados por las células 4T1/control, 4T1/WISP-1L y 4T1/WISP-1H inoculadas. Cuando se comparó

con el tumor de células 4T1/control, la expresión de CD44 aumentó entre 5 y 23 veces en tumores de células 4T1/WISP-1 (Fig. 22). Por otra parte, la expresión de HAS2 permaneció idéntica en todos los tumores analizados. Estos resultados sugieren que WISP-1 aumenta la expresión de CD44 en ratones inoculados con células 4T1. La expresión en exceso de CD44 en estos tumores puede contribuir a la promoción de metástasis.

### **EJEMPLO 22**

**[0263]** Se evaluaron los efectos de WISP-1 sobre metástasis de células epiteliales mamarias inoculando células 4T1 en bolas adiposas mamarias de ratones (véase el Ejemplo 20) y examinando el grado de la propagación metastásica por tomografía microcomputarizada e histología. Después de 31 días, los ratones inoculados con células 4T1/WISP-1L o 4T1/WISP-1H tenían amplias metástasis tumorales (Fig. 23b y 23d) en comparación con los ratones inyectados con 4T1/control (Fig. 23a y 23c). No se observaron diferencias significativas entre el potencial metastásico de células 4T1/WISP-1L y 4T1/WISP-1H. Los ratones inoculados con células 4T1/control tenían un promedio de 2,11 focos pulmonares con una masa promedio de 0,68 gramos, mientras que los ratones inoculados con células 4T1/WISP-1 tenían un promedio de 20,25 focos pulmonares con una masa promedio de 12,46 gramos. Por tanto, los datos promedio de histología para el pulmón de ratones inyectados con células 4T1/WISP-1 era 0,92 en comparación con 0,11 para los ratones inyectados con células NRK/control.

**[0264]** Usando inmunohistoquímica también se observó que los focos metastásicos pulmonares 4T1/WISP-1 expresaron altos niveles de CD44 (Fig. 23e). En estos tumores, CD44 estaba localizado en la membrana plasmática de las células 4T1/WISP-1 (Fig. 23f). Estos resultados demuestran juntos que WISP-1 promueve el potencial metastásico de células 4T1, aumentando el número de focos metastásicos pulmonares (10 veces) y el tamaño (18 veces). Por tanto, el aumento de la expresión de CD44 se mantuvo después de que 4T1/WISP-1 hubiera metastatizado a los pulmones.

**[0265]** Las observaciones clínicas de ratones inoculados con células 4T1/control 1 o 4T1/WISP-1 demostraron que la expresión de WISP-1 promovió la metástasis en sitios secundarios adicionales. Dos ratones inoculados con 4T1/WISP-1H tenían una masa blanca descolorida sobre el riñón, mientras que ningún otro ratón tenía pruebas de tumores de riñón.

### **Depósito de material**

**[0266]** Los siguientes materiales han sido depositados en la Colección americana

de cultivos tipo, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, EE.UU. (ATCC):

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

**[0267]** Este depósito se hizo bajo las condiciones del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a fines del  
 5 procedimiento de patente y las reglamentaciones en virtud del mismo (Tratado de Budapest). Éste asegura el mantenimiento de un cultivo viable del depósito durante 30 años a partir de la fecha de depósito. El depósito se pondrá a disposición por la ATCC bajo los términos del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento, y sujeto a un  
 10 acuerdo entre Genentech, Inc. y ATCC, que asegura la disponibilidad permanente y de libre acceso de la progenie del cultivo del depósito al público tras la concesión de la patente de EE.UU. pertinente o tras la apertura a consulta por el público de cualquier solicitud de patente de EE.UU. o extranjera, sea cual sea la que venga primero, y asegura la disponibilidad de la progenie a una determinada por el Comisionado de  
 15 '122 y las reglas del Comisionado con arreglo al mismo (incluyendo 37 CFR '1.14, con particular referencia a 886 OG 638).

**[0268]** El cesionario de la presente solicitud está de acuerdo que si un cultivo de los materiales en depósito muere o se pierde o se destruye cuando se cultiva bajo condiciones adecuadas, los materiales serán inmediatamente sustituidos tras la  
 20 notificación por otro igual. La disponibilidad del material depositado no debe interpretarse como una licencia para poner en práctica la invención en contravención de los derechos concedidos bajo la autoridad de cualquier gobierno según sus leyes de patentes.

**[0269]** La descripción anteriormente descrita se considera suficiente para permitir  
 25 que un experto en la materia ponga en práctica la invención. La presente invención no va a limitarse en alcance por el ejemplo presentado en este documento.

Lista de secuencias

**[0270]**

<110> GENENTECH, INC.

- <120> Procedimientos y composiciones para modular y detectar la actividad de wisp
- <130> SJK/FP6270334
- <140> EP 03739341.0
- <141> 28/06/2003
- 5 <150> PCT/US03/20407
- <151> 28/06/2003
- <150> US 60/392.652
- <151> 29/06/2002
- <150> US 60/408.739
- 10 <151> 06/09/2002
- <160> 20
- <210> 1
- <211> 367
- <212> PRT
- 15 <213> Homo sapiens
- <400> 1

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Met | Arg | Trp | Phe | Leu | Pro | Trp | Thr | Leu | Ala | Ala | Val | Thr | Ala | Ala |  |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |  |
| Ala | Ala | Ser | Thr | Val | Leu | Ala | Thr | Ala | Leu | Ser | Pro | Ala | Pro | Thr |  |
|     |     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |  |
| Thr | Met | Asp | Phe | Thr | Pro | Ala | Pro | Leu | Glu | Asp | Thr | Ser | Ser | Arg |  |
|     |     |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |  |
| Pro | Gln | Phe | Cys | Lys | Trp | Pro | Cys | Glu | Cys | Pro | Pro | Ser | Pro | Pro |  |
|     |     |     |     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |  |
| Arg | Cys | Pro | Leu | Gly | Val | Ser | Leu | Ile | Thr | Asp | Gly | Cys | Glu | Cys |  |
|     |     |     |     | 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |  |
| Cys | Lys | Met | Cys | Ala | Gln | Gln | Leu | Gly | Asp | Asn | Cys | Thr | Glu | Ala |  |
|     |     |     |     | 80  |     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |  |
| Ala | Ile | Cys | Asp | Pro | His | Arg | Gly | Leu | Tyr | Cys | Asp | Tyr | Ser | Gly |  |
|     |     |     |     | 95  |     |     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |  |
| Asp | Arg | Pro | Arg | Tyr | Ala | Ile | Gly | Val | Cys | Ala | Gln | Val | Val | Gly |  |
|     |     |     |     | 110 |     |     |     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |  |
| Val | Gly | Cys | Val | Leu | Asp | Gly | Val | Arg | Tyr | Asn | Asn | Gly | Gln | Ser |  |
|     |     |     |     | 125 |     |     |     |     | 130 |     |     |     |     | 135 |  |
| Phe | Gln | Pro | Asn | Cys | Lys | Tyr | Asn | Cys | Thr | Cys | Ile | Asp | Gly | Ala |  |
|     |     |     |     | 140 |     |     |     |     | 145 |     |     |     |     | 150 |  |
| Val | Gly | Cys | Thr | Pro | Leu | Cys | Leu | Arg | Val | Arg | Pro | Pro | Arg | Leu |  |
|     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |     |     |     |     | 165 |  |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Trp | Cys | Pro | His | Pro | Arg | Arg | Val | Ser | Ile | Pro | Gly | His | Cys | Cys | 170 | 175 | 180 |
| Glu | Gln | Trp | Val | Cys | Glu | Asp | Asp | Ala | Lys | Arg | Pro | Arg | Lys | Thr | 185 | 190 | 195 |
| Ala | Pro | Arg | Asp | Thr | Gly | Ala | Phe | Asp | Ala | Val | Gly | Glu | Val | Glu | 200 | 205 | 210 |
| Ala | Trp | His | Arg | Asn | Cys | Ile | Ala | Tyr | Thr | Ser | Pro | Trp | Ser | Pro | 215 | 220 | 225 |
| Cys | Ser | Thr | Ser | Cys | Gly | Leu | Gly | Val | Ser | Thr | Arg | Ile | Ser | Asn | 230 | 235 | 240 |
| Val | Asn | Ala | Gln | Cys | Trp | Pro | Glu | Gln | Glu | Ser | Arg | Leu | Cys | Asn | 245 | 250 | 255 |
| Leu | Arg | Pro | Cys | Asp | Val | Asp | Ile | His | Thr | Leu | Ile | Lys | Ala | Gly | 260 | 265 | 270 |
| Lys | Lys | Cys | Leu | Ala | Val | Tyr | Gln | Pro | Glu | Ala | Ser | Met | Asn | Phe | 275 | 280 | 285 |
| Thr | Leu | Ala | Gly | Cys | Ile | Ser | Thr | Arg | Ser | Tyr | Gln | Pro | Lys | Tyr | 290 | 295 | 300 |
| Cys | Gly | Val | Cys | Met | Asp | Asn | Arg | Cys | Cys | Ile | Pro | Tyr | Lys | Ser | 305 | 310 | 315 |
| Lys | Thr | Ile | Asp | Val | Ser | Phe | Gln | Cys | Pro | Asp | Gly | Leu | Gly | Phe | 320 | 325 | 330 |
| Ser | Arg | Gln | Val | Leu | Trp | Ile | Asn | Ala | Cys | Phe | Cys | Asn | Leu | Ser | 335 | 340 | 345 |
| Cys | Arg | Asn | Pro | Asn | Asp | Ile | Phe | Ala | Asp | Leu | Glu | Ser | Tyr | Pro | 350 | 355 | 360 |
| Asp | Phe | Ser | Glu | Ile | Ala | Asn |     |     |     |     |     |     |     |     | 365 |     |     |

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 2830

&lt;212&gt; ADN

5 &lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 2

cccacgcgtc cgctgggccc agctcccccg agaggaggtc ggatcctctg 50  
ggctgctcgg tcgatgcctg tgccactgac gtccaggcat gaggtgggtc 100  
ctgccctgga cgctggcagc agtgacagca gcagccgcca gcaccgtcct 150  
ggccacggcc ctctctccag cccctacgac catggacttt actccagctc 200  
cactggagga cacctcctca cgcccccaat tctgcaagtg gccatgtgag 250  
tgcccgccat cccacccccg ctgcccgtg ggggtcagcc tcatcacaga 300

tggctgtgag tgctgtaaga tgtgcgctca gcagcttggg gacaactgca 350  
 cggaggctgc catctgtgac cccacccggg gcctctactg tgactacagc 400  
 ggggaccgcc cgaggtaacg aataggagtg tgtgcacagg tggtcggtgt 450  
 gggctgcgtc ctggatgggg tgcgctacaa caacggccag tccttccagc 500  
 ctaactgcaa gtacaactgc acgtgcatcg acggcgcggt gggctgcaca 550  
 ccaactgtgcc tccgagtgcg cccccgcgt ctctggtgcc cccaccgcg 600  
 gcgctgagc atacctggcc actgctgtga gcagtgggta tgtgaggacg 650  
 acgccaagag gccacgcaag accgcacccc gtgacacagg agccttcgat 700  
 gctgtgggtg aggtggaggc atggcacagg aactgcatag cctacacaag 750  
 cccctggagc ccttgcctca ccagctgcgg cctgggggtc tccactcgga 800  
 tctccaatgt taacgcccag tgctggcctg agcaagagag ccgcctctgc 850  
 aacttgccgc catgcgatgt ggacatccat acactcatta aggcagggaa 900  
 gaagtgtctg gctgtgtacc agccagaggc atccatgaac ttcacacttg 950  
 cgggctgcat cagcacacgc tcctatcaac ccaagtactg tggagtgtgc 1000  
 atggacaata ggtgctgcat cccctacaag tctaagacta tcgactgtgc 1050  
 cttccagtgt cctgatgggc ttggcttctc ccgccaggtc ctatggatta 1100  
 atgcctgctt ctgtaacctg agctgtagga atcccaatga catctttgct 1150  
 gacttggaat cctacctga cttctcagaa attgccaaact aggcaggcac 1200  
 aaatcttggg tcttggggac taacccaatg cctgtgaagc agtcagccct 1250  
 tatggccaat aacttttcac caatgagcct tagttaccct gatctggacc 1300  
 cttggcctcc atttctgtct ctaaccattc aaatgacgcc tgatggtgct 1350  
 gctcaggccc atgctatgag ttttctcctt gatatcattc agcatctact 1400  
 ctaaagaaaa atgcctgtct ctactgttgc tggactacac ccaagcctga 1450  
 tccagccttt ccaagtcaact agaagtccct ctggatcttg cctaaatccc 1500  
 aagaaatgga atcaggtaga cttttaatat cactaatttc ttcttttagat 1550  
 gccaaaccac aagactcttt ggggccattc agatgaatag atggaatttg 1600  
 gaacaataga ataatctatt atttgagacc tgccaagagg tactgtaatg 1650  
 ggtaattctg acgtcagcgc accaaaacta tcctgattcc aaatatgtat 1700  
 gcacctcaag gtcacaaaac atttgccaag tgagttgaat agttgcttaa 1750  
 ttttgatttt taatggaaaag ttgtatccat taacctgggc attgttgagg 1800  
 ttaagtttct cttcaccctt acactgtgaa gggtagagat taggtttgtc 1850

```

ccagtcagaa ataaaatttg ataaacattc ctgttgatgg gaaaagcccc 1900
cagttaatac tccagagaca gggaaaggtc agcccatttc agaaggacca 1950
attgactctc aactgaatc agctgctgac tggcagggct ttgggcagtt 2000
ggccaggctc ttccttgaat cttctccctt gtcctgcttg ggttcatagg 2050
aattggttaag gcctctggac tggcctgtct ggcccctgag agtggtgccc 2100
tggaacactc ctctactctt acagagcctt gagagacca gctgcagacc 2150
atgccagacc cactgaaatg accaagacag gttcaggtag ggggtgtgggt 2200
caaaccaaga agtgggtgcc cttggttagca gcctggggtg acctctagag 2250
ctggaggctg tgggactcca ggggcccccg tggtcaggac acatctattg 2300
cagagactca tttcacagcc tttcgttctg ctgaccaa at ggccagtttt 2350
ctggttaggaa gatggagggt taccagttgt ttagaaacag aaatagactt 2400
aataaagggt taaagctgaa gaggttgaag ctaaaaggaa aagggtgttg 2450
ttaatgaata tcaggctatt atttattgta ttaggaaaat ataatttta 2500
ctgttagaat tcttttattt agggcctttt ctgtgccaga cattgctctc 2550
agtgtttgc atgtattagc tcaactgaatc ttcacgacaa tggtgagaag 2600
ttcccattat tatttctgtt ctacaaatg tgaaacggaa gctcatagag 2650
gtgagaaaac tcaaccagag tcaccaggtt ggtgactggg aaagtttagga 2700
ttcagatcga aattggactg tctttataac ccatattttc cccctgtttt 2750
tagagcttcc aaatgtgtca gaataggaaa acattgcaat aaatggcttg 2800
attttttaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2830

```

<210> 3

<211> 440

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 3

100

gaattcacca tgaggtggtt cctgccctgg acgctggcag cagtgcacagc 50  
 agcagccgcc agcaccgtcc tggccacggc cctctctcca gccctacga 100  
 ccatggactt tactccagct ccaactggagg acacctcctc acgccccaa 150  
 ttctgcaagt ggccatgtga gtgcccggca tccccacccc gctgcccgt 200  
 gggggtcagc ctcacacag atggctgtga gtgctgtaag atgtgcgctc 250  
 agcagcttgg ggacaactgc acggaggctg ccatctgtga cccccaccgg 300  
 ggcccttact gtgactacag cggggaccgc ccgaggtagc caataggagt 350

gtgtgcacag gcggccgcac accaccatca ccaccaccat cactaagtga 400  
 ggccgcatag ataactgata cagtgtgctg gaattaattc 440

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 340

&lt;212&gt; ADN

5 &lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 4

gaattcacca tgaggtggtt cctgccctgg acgctggcag cagtgcacagc 50  
 agcagccgcc agcaccgtcc tggccactgc agtggctcgt gtgggctgcg 100  
 tcttgatgg ggtgcgtac aacaacggcc agtccttcca gcctaactgc 150  
 aagtacaact gcacgtgcat cgacggcgcg gtgggctgca caccactgtg 200  
 cctccgagtg cgccccccgc gtctctggtg cccccaccg cggcgcgta 250  
 gcatacctgg ccaactgctg gagcagtggg tatgtgcggc cgcacaccac 300  
 catcaccatc accatcacta agtgaggccg catagataac 340

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 321

10 &lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 5

101

gaattcacca tgaggtggtt cctgccctgg acgctggcag cagtgcacagc 50  
 agcagccgcc agcacctgcc tggccactgc agcatggcac aggaactgca 100  
 tagcctacac aagcccctgg agcccttgct ccaccagctg cggcctgggg 150  
 gtctccactc ggatctccaa tgttaacgcc cagtgcctggc ctgagcaaga 200  
 gagccgcctc tgcaacttgc ggccatgcga tgtggacatc catacactca 250  
 ttaaggcggc cgcacaccac catcaccatc accatcacta agtgaggccg 300  
 catagataac tgatccagtg t 321

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 442

&lt;212&gt; ADN

5 &lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 6

gaattcacca tgaggtggtt cctgccctgg acgctggcag cagtgcacagc 50  
 agcagccgcc agcacctgcc tggccactgc agggagaag tgtctggctg 100  
 tgtaccagcc agaggcatcc atgaacttca cacttgccgg ctgcatcagc 150  
 acacgctcct atcaacccaa gtactgtgga gtttgcctgg acaatagggtg 200  
 ctgcatcccc tacaagtcta agactatcga cgtgtccttc cagtgtcctg 250  
 atgggcttgg cttctccgcg caggctctat ggattaatgc ctgcttctgt 300  
  
 aacctgagct gtaggaatcc caatgacatc tttgctgact tggaatccta 350  
 ccctgacttc tcagaaattg ccaacgcggc cgcacaccac catcaccatc 400  
 accatcacta agtgaggccg catagataac tgatccagtg tg 442

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 619

10 &lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 7

gaattcacca tgaggtggtt cctgccctgg acgctggcag cagtgcacagc 50  
 agcagccgcc agcaccgtcc tggccacggc cctctctcca gccctacga 100  
 ccatggactt tactccagct ccaactggagg acacctcctc acgcccccaa 150  
 ttctgcaagt ggccatgtga gtgcccgcca tccccacccc gctgcccgct 200  
 gggggtcagc ctcatcacag atggctgtga gtgctgtaag atgtgcgctc 250  
 agcagcttgg ggacaactgc acggaggctg ccatctgtga cccccaccgg 300  
 ggcctctact gtgactacag cggggaccgc ccgaggtagc caataggagt 350  
 gtgtgcacag gtggtcggtg tgggctgcgt cctggatggg gtgcgctaca 400  
 acaacggcca gtccttccag cctaactgca agtacaactg cacgtgcatac 450  
 gacggcgcggtg tgggctgcac accactgtgc ctccgagtgc gcccccgcg 500  
 tctctggtgc cccacccgc ggcgcgtgag catacctggc cactgctgtg 550  
 agcagtgggt atgtgcggcc gcacaccacc atcaccatca ccatcactaa 600  
 gtgaggccgc atagataac 619

<210> 8

<211> 885

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 8

gaattcacca tgaggtggtt cctgccctgg acgctggcag cagtgcacagc 50  
 agcagccgcc agcaccgtcc tggccacggc cctctctcca gccctacga 100  
 ccatggactt tactccagct ccaactggagg acacctcctc acgcccccaa 150  
 ttctgcaagt ggccatgtga gtgcccgcca tccccacccc gctgcccgct 200  
 gggggtcagc ctcatcacag atggctgtga gtgctgtaag atgtgcgctc 250  
 agcagcttgg ggacaactgc acggaggctg ccatctgtga cccccaccgg 300  
 ggcctctact gtgactacag cggggaccgc ccgaggtagc caataggagt 350  
 gtgtgcacag gtggtcggtg tgggctgcgt cctggatggg gtgcgctaca 400

103

```

acaacggcca gtccttccag cctaactgca agtacaactg cacgtgcac 450
gacggcgcg tgggctgcac accactgtgc ctccgagtgc gcccccgcg 500
tctctgggtgc cccacccgc ggcgcgtgag catacctggc cactgctgtg 550
agcagtgggt atgtgaggac gacgccaaga ggccacgcaa gaccgcaccc 600
cgtgacacag gaggcttcga tgctgtgggt gaggtggagg catggcacag 650
gaactgcata gcctacacaa gccctggag cccttgctcc accagctgcg 700
gcctgggggt ctccactcgg atctccaatg ttaacgcca gtgctggcct 750
gagcaagaga gccgcctctg caacttgcg ccatgcgatg tggacatcca 800
tacactcatt aaggcgccg cacaccacca tcaccatcac catcactaag 850
tgaggccgca tagataactg atccagtgtg ctgga 885

```

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 1014

&lt;212&gt; ADN

5 &lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 9

```

gaattcacca tgaggtggtt cctgccctgg acgctggcag cagtgcacagc 50
agcagccgcc agcaccgctc tggccacggc cctctctcca gccctacga 100
ccatggactt tactccagct ccaactggagg acacctctc acgcccccaa 150
ttctgcaagt ggccatgtga gtgcccggca tccccacccc gctgcccgct 200
gggggtcagc ctcatcacag atggctgtga gtgctgtaag atgtgcgctc 250
agcagcttgg ggacaactgc acggaggctg ccatctgtga cccccaccgg 300
ggcctctact gtgactacag cggggacccg ccgaggtagc caataggagt 350
gtgtgcacag gtggtcgggtg tgggctgctg cctggatggg gtgcgctaca 400
acaacggcca gtccttccag cctaactgca agtacaactg cacgtgcac 450
gacggcgcggtg tgggctgcac accactgtgc ctccgagtgc gccccccg 500
tctctggtgc cccacccgc ggcgcgtgag catacctggc cactgctgtg 550
agcagtgggt atgtctgcag gcagggaaga agtgtctggc tgtgtaccag 600
ccagaggcat ccatgaactt cacacttgcg ggctgcatca gcacacgctc 650
ctatcaacc aagtactgtg gagtttgcag ggacaatagg tgctgcatcc 700
cctacaagtc taagactatc gacgtgtcct tccagtgtcc tgatgggctt 750
ggcttctccc gccaggctcct atggattaat gcctgcttct gtaacctgag 800
ctgtaggaat cccaatgaca tctttgctga cttggaatcc taccctgact 850
tctcagaaat tgccaacgcg gccgcacacc accatcacca tcaccatcac 900

taagtgaggc cgcatagata actgatccag tgtgctggaa ttaattcgct 950
gtctgcgagg gccagctgtt ggggtgagta ctccctctca aaagcgggca 1000
tgacttctgc gcta 1014

```

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 904

&lt;212&gt; ADN

5 &lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 10

```

gaattcacca tgaggtggtt cctgccctgg acgctggcag cagtgcacgc 50
agcagccgcc agcaccgtcc tggccacggc cctctctcca gcccctacga 100
ccatggactt tactccagct ccaactggagg acacctcctc acgcccccaa 150
ttctgcaagt ggccatgtga gtgcccgccca tccccacccc gctgcccgtc 200
gggggtcagc ctcacacag atggctgtga gtgctgtaag atgtgcgtc 250
agcagcttgg ggacaactgc acggaggctg ccatctgtga cccccaccgg 300
ggcctctact gtgactacag cggggaccgc ccgaggtagc caataggagt 350
gtgtgcgcac gctgtgggtg aggtggaggc atggcacagg aactgcatag 400
cctacacaag cccctggagc ccttgtctca ccagctgcgg cctgggggtc 450
tccactcgga tctccaatgt taacgcccag tgctggcctg agcaagagag 500
ccgcctctgc aacttgcggc catgcgatgt ggacatccat acactcatta 550
aggcagggaa gaagtgtctg gctgtgtacc agccagaggc atccatgaac 600
ttcacacttg cgggctgcat cagcacacgc tcctatcaac ccaagtactg 650
tgaggtttgc atggacaata ggtgctgcat cccctacaag tctaagacta 700
tcgacgtgtc cttccagtgt cctgatgggc ttggcttctc ccgccaggtc 750
ctatggatta atgcctgctt ctgtaacctg agctgtagga atcccaatga 800
catctttgct gacttggaat cctaccctga cttctcagaa attgccaacg 850
cggccgcaca ccaccatcac catcaccatc actaagtgag gccgcataga 900
taac 904

```

<210> 11

<211> 922

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 11

```

gaattcacca tgaggtggtt cctgccctgg acgctggcag cagtgcacgc 50
agcagccgcc agcaccgtcc tggccactgc agtggctcgg gtgggctgcg 100

```

tcctggatgg ggtgcgctac aacaacggcc agtccttcca gcctaactgc 150  
 aagtacaact gcacgtgcat cgacggcgcg gtgggctgca caccactgtg 200  
 cctccgagtg cgccccccgc gtctctggtg cccccacccg cggcgcggtga 250  
 gcataacctg cactgctgt gagcagtggg tatgtgagga cgacgccaag 300  
 aggccacgca agaccgcacc ccgtgacaca ggagccttcg atgctgtggg 350  
 tgaggtggag gcatggcaca ggaactgcat agcctacaca agcccctgga 400  
 gcccttgctc caccagctgc ggcttggggg tctccactcg gatctccaat 450  
 gttaacgccc agtcttgccc tgagcaagag agccgcctct gcaacttgcg 500  
 gccatgcgat gtggacatcc atacactcat taaggcaggg aagaagtgtc 550  
 tggtgtgta ccagccagag gcatccatga acttcacact tgcgggctgc 600  
 atcagcacac gtcctatca acccaagtac tgtggagttt gcatggacaa 650  
 taggtgctgc atcccctaca agtctaagac tatcgacgtg tccttccagt 700  
 gtctgatgg gcttggttc tcccgccagg tcctatggat taatgcctgc 750  
 ttctgtaacc tgagctgtag gaatcccaat gacatctttg ctgacttgga 800  
 atcctaccct gacttctcag aaattgcca cgcgggcgca caccaccatc 850  
 accatcacca tactaagtg aggccgcata gataactgat ccagtgtgct 900  
 ggaattaatt cgctgtctgc ga 922

<210> 12

<211> 19

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<400> 12

ggctgccatc tctgaccca 19

<210> 13

<211> 21

10 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 13

cataggacct gccgggagaa a 21

<210> 14

15 <211> 19

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 14  
 gccgtggcag tctgaggg 19  
 <210> 15  
 <211> 21  
 5 <212> ADN  
 <213> Mus musculus  
 <400> 15  
 cagcaccggg cattgacgtt a 21  
 <210> 16  
 10 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus  
 <400> 16  
 tggagaaaaa tggccgctac a 21  
 15 <210> 17  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus  
 <400> 17  
 20 tggggtgctc ttctcgatgg 20  
 <210> 18  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus  
 25 <400> 18  
 ggacaaatcg gccacgtaca t 21  
 <210> 19  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 30 <213> Mus musculus  
 <400> 19  
 cttgctccat cgggtctgc 19  
 <210> 20  
 <211> 42  
 35 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

108

&lt;400&gt; 20

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Gln | Trp | Val | Cys | Glu | Asp | Asp | Ala | Lys | Arg | Pro | Arg | Lys | Thr |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |
| Ala | Pro | Arg | Asp | Thr | Gly | Ala | Phe | Asp | Ala | Val | Gly | Glu | Val | Glu |
|     |     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |
| Ala | Trp | His | Arg | Asn | Cys | Ile | Ala | Tyr | Thr | Ser | Pro |     |     |     |
|     |     |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     |     |

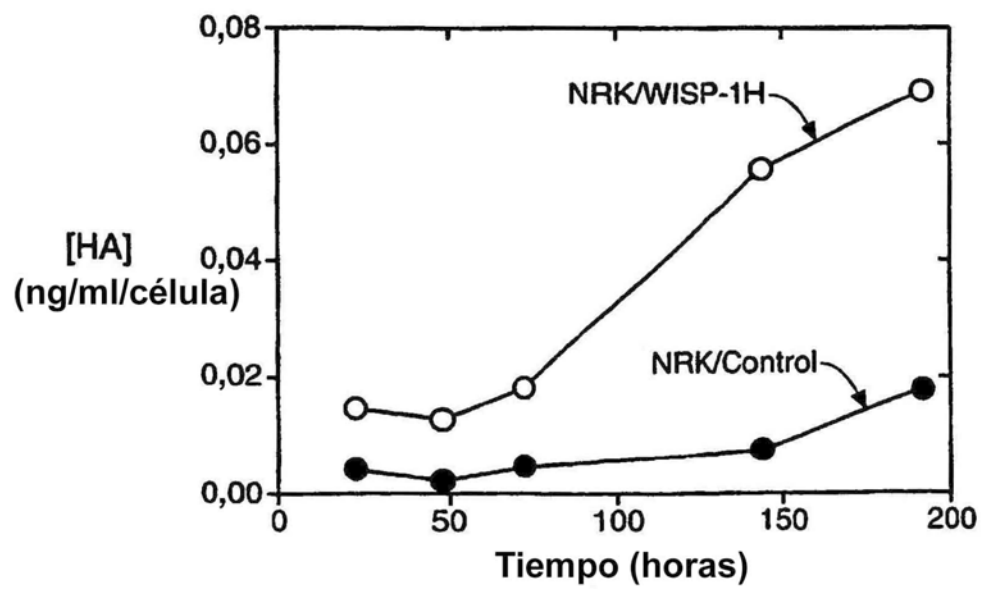
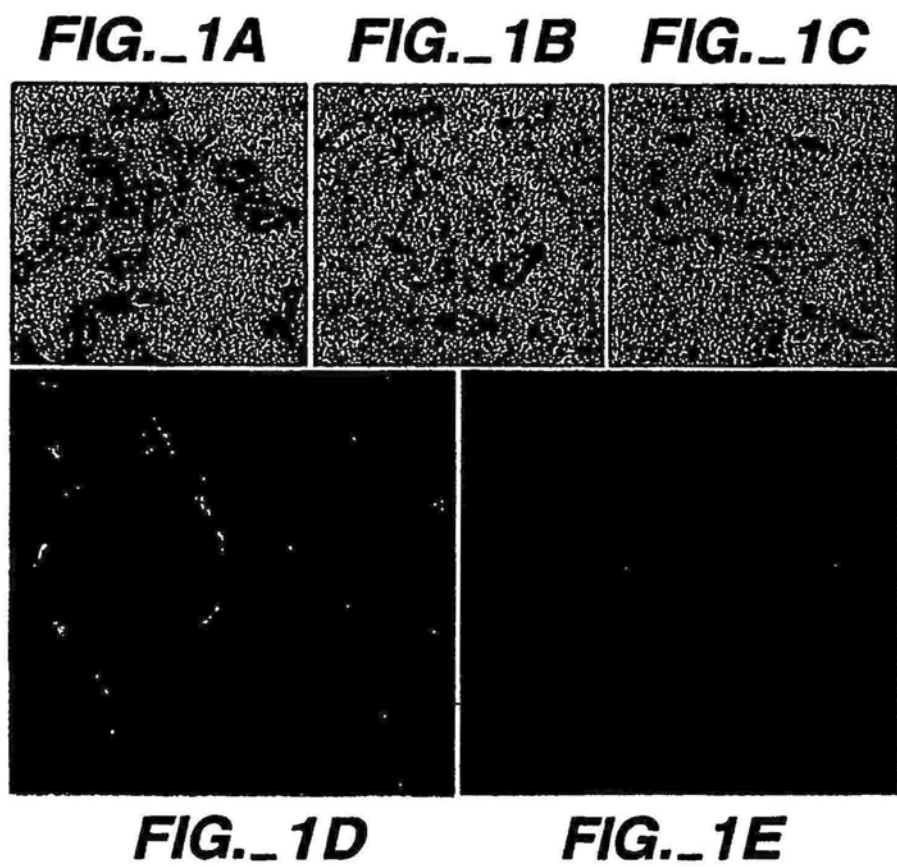
**REIVINDICACIONES**

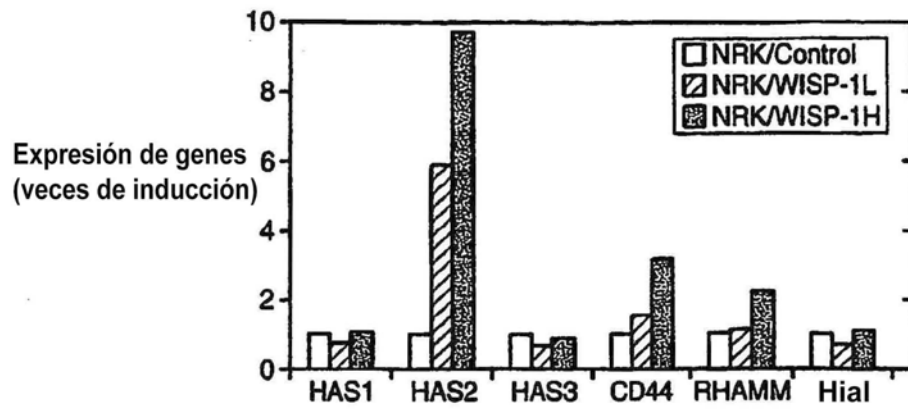
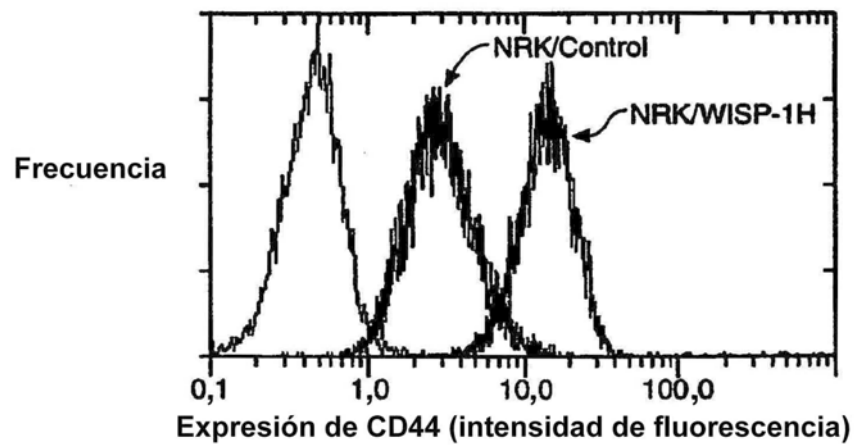
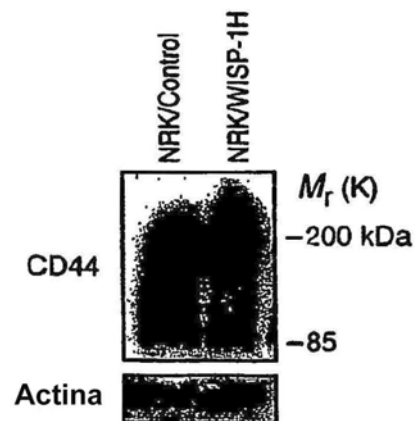
1. Un anticuerpo dirigido contra WISP-1 aislado para uso en un procedimiento para inhibir o reducir la metástasis o motilidad de células cancerosas en  
5 un mamífero, en el que el anticuerpo inhibe o reduce la motilidad o metástasis de células cancerosas.
2. Uso de un anticuerpo dirigido contra WISP-1 para la preparación de un medicamento para inhibir o reducir la metástasis o motilidad de células cancerosas en  
10 un mamífero, en el que el anticuerpo inhibe o reduce la motilidad o metástasis de células cancerosas.
3. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en el que dicho anticuerpo dirigido contra WISP-1 se une al  
15 polipéptido WISP-1 humano natural que comprende los aminoácidos 23-367 de las Figuras 9A-9C (SEQ ID NO:1) o uno o más dominios del polipéptido WISP-1 que comprende los aminoácidos codificados por las secuencias de SEQ ID NO:3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11.
- 20 4. El anticuerpo para uso o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho anticuerpo dirigido contra WISP-1 es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano.
5. El anticuerpo para uso o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1  
25 a 4, en el que dicho cáncer comprende células de cáncer de colon o colorrectal, células de cáncer de mama, células de cáncer de pulmón o células de cáncer de cerebro.
6. El anticuerpo para uso o el uso de la reivindicación 5, en el que dicho anticuerpo inhibe o reduce la metástasis de células de cáncer de pulmón en un sitio en  
30 el mamífero secundario o diferente del sitio del tumor de pulmón primario en el mamífero.
7. El anticuerpo para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 3 a 6, en el que el procedimiento comprende además administrar quimioterapia, radiación,  
35 profármaco, agente citotóxico, agente inhibidor del crecimiento o citocina.

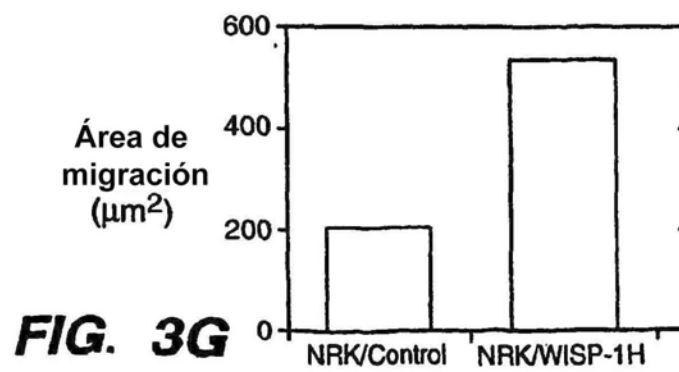
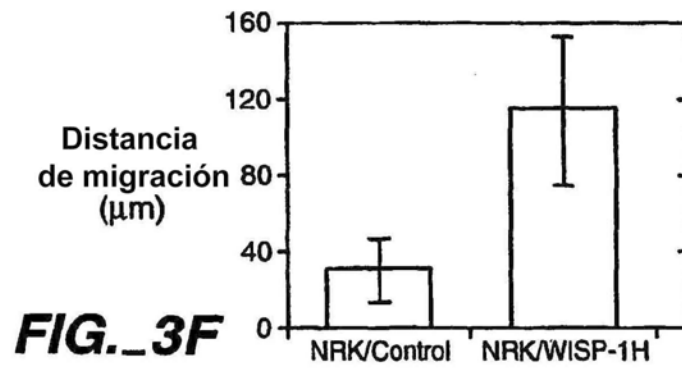
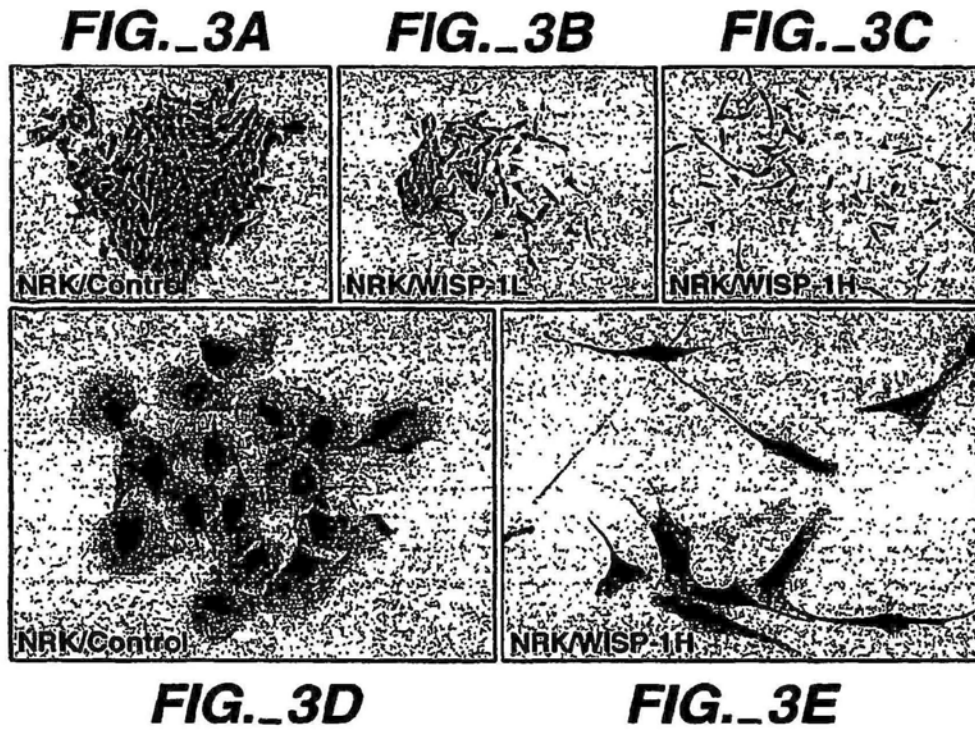
8. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que el anticuerpo es para administración con quimioterapia; radiación, profármaco, agente citotóxico, agente inhibidor del crecimiento o citocina.
- 5 9. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que el medicamento comprende además un agente quimioterapéutico, profármaco, agente citotóxico, agente inhibidor del crecimiento; o citocina.
- 10 10. Un procedimiento *in vitro* para inhibir o reducir la inducción por WISP-1 de la motilidad de células cancerosas de mamífero que comprende exponer dichas células de mamífero a una cantidad eficaz de un anticuerpo como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 15 11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que dichas células de mamífero comprenden células de cáncer de colon o colorrectal, células de cáncer de mama, células de cáncer de pulmón o células de cáncer de cerebro.
12. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 1 o el uso de la  
20 reivindicación 2, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que comprende el anticuerpo 3D11, 11C2, 9C10, 5D4 o 9C11 secretado por el hibridoma depositado con el número de registro de ATCC PTA-4624, PTA-4628, PTA-4626, PTA-4625 o PTA-4627, respectivamente.
- 25 13. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que se une al mismo epítipo que el epítipo al que se une un anticuerpo monoclonal según la reivindicación 12.
- 30 14. El anticuerpo para uso o el uso de la reivindicación 13, en el que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, humano o humanizado.
15. El anticuerpo para el uso de la reivindicación 1 o el uso de la  
35 reivindicación 2, en el que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico que comprende una región variable o hipervariable de un anticuerpo como se define en la

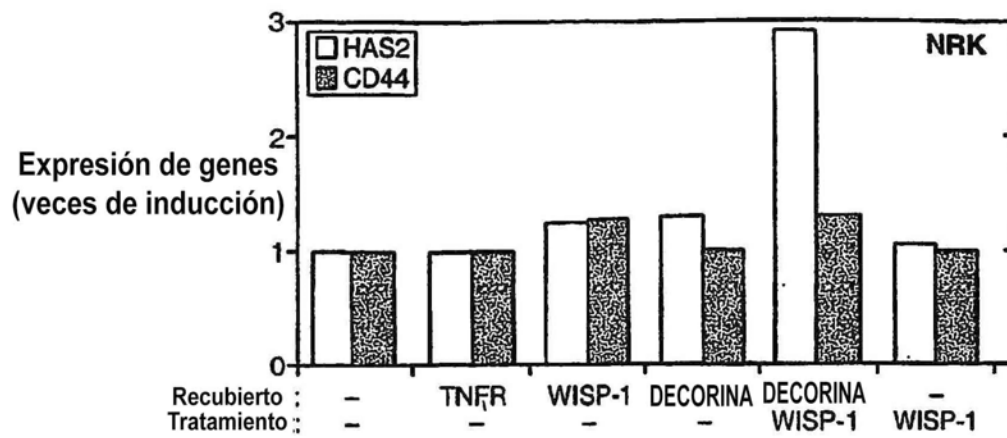
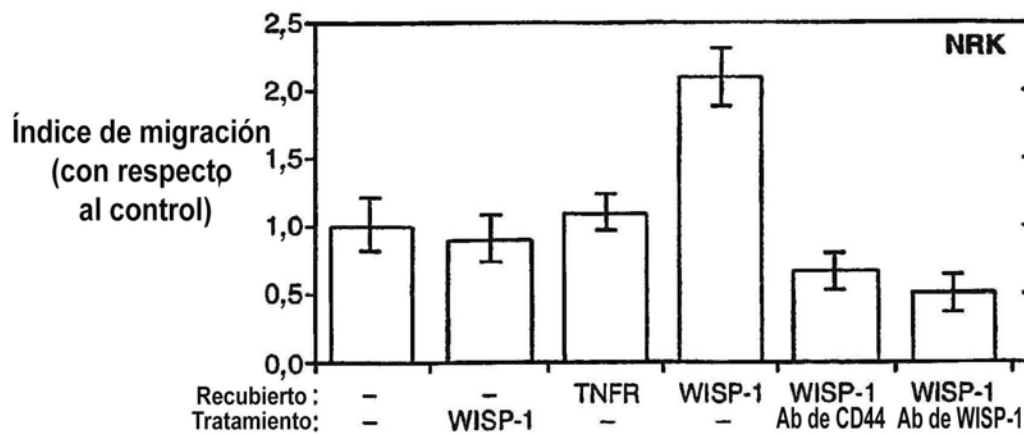
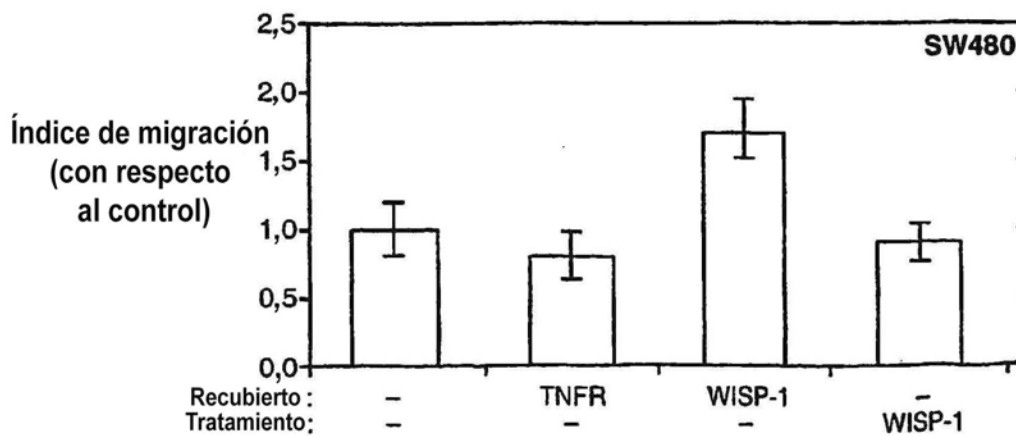
reivindicación 12.

16. El anticuerpo para uso o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en el que el anticuerpo está ligado a uno o más agentes seleccionados del grupo que está constituido por polímero no proteináceo, agente citotóxico, enzima, radioisótopo, compuesto fluorescente y compuesto quimioluminiscente.



**FIG.\_2A****FIG.\_2B****FIG.\_2C**



**FIG.\_4A****FIG.\_4B****FIG.\_4C**

116

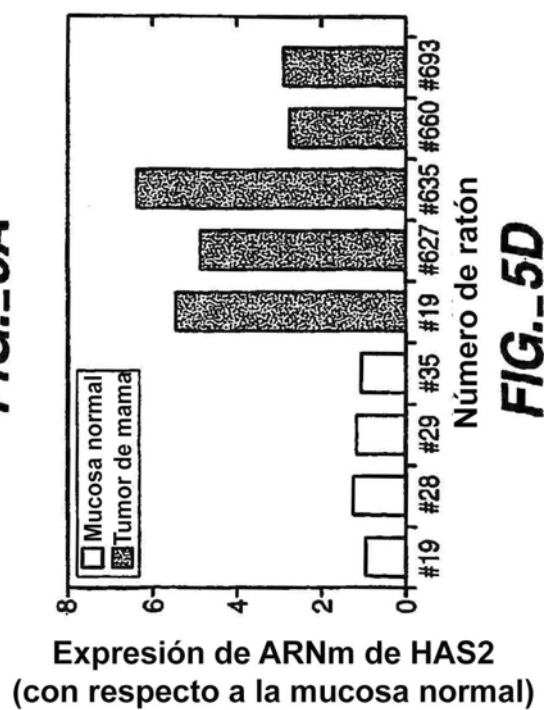
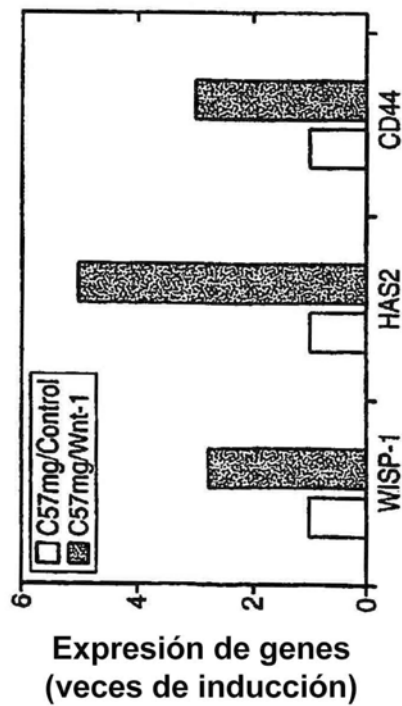
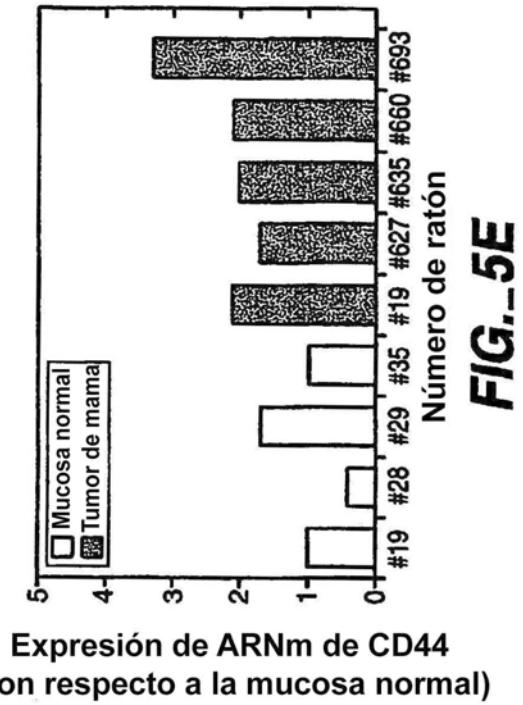
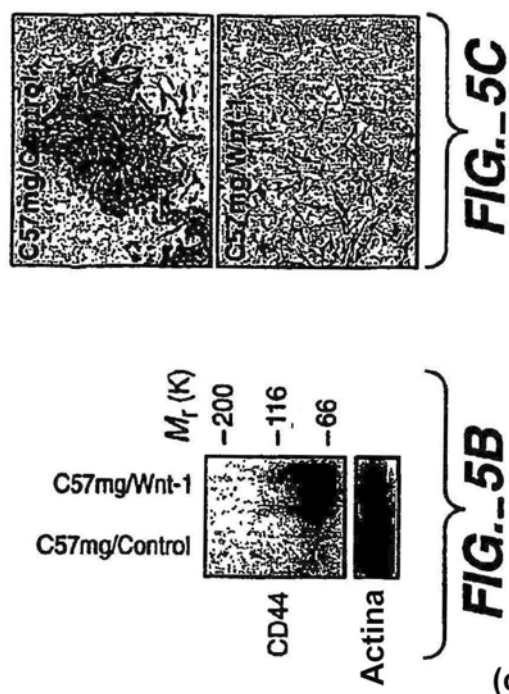


**FIG.\_6A**

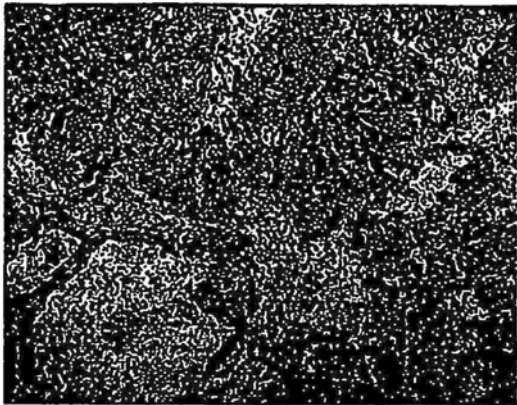


**FIG.\_6B**

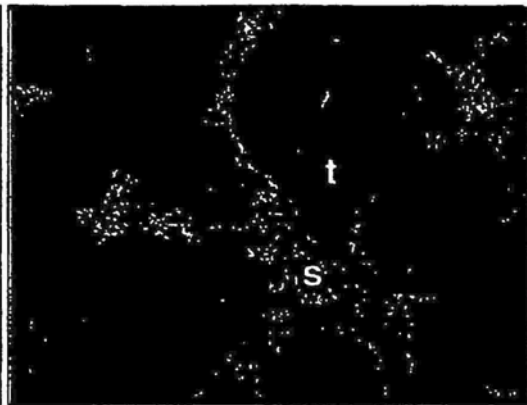


**FIG.\_6C**

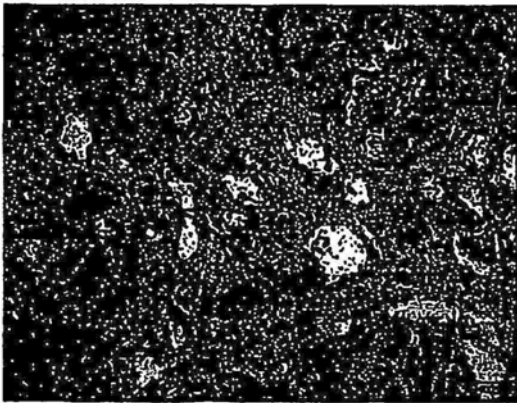


**FIG.\_6D**

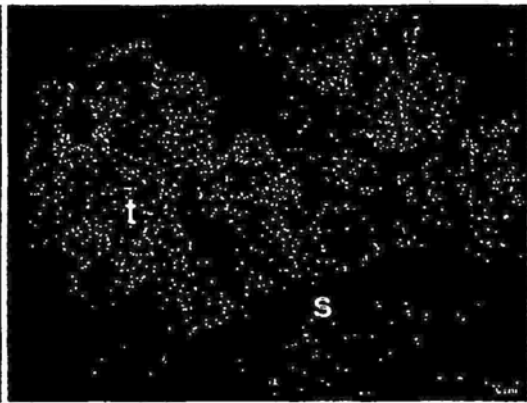


**FIG.\_6E**

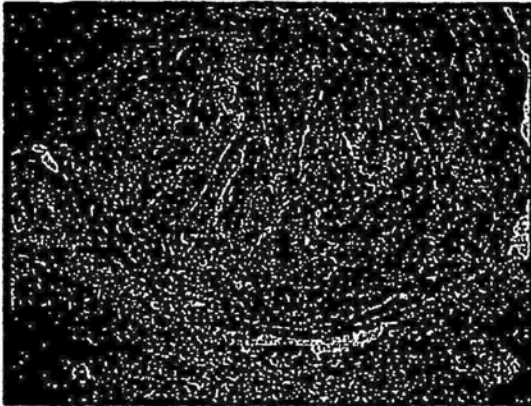


**FIG.\_6F**

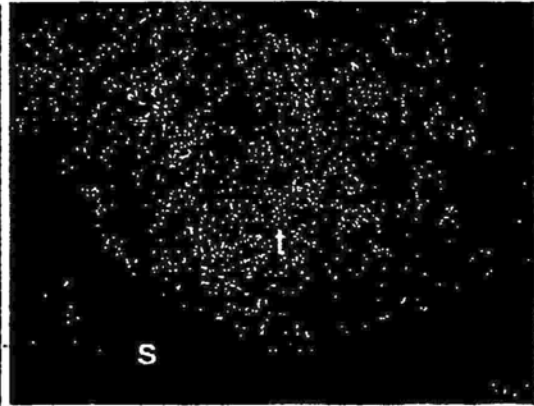


**FIG.\_6G**

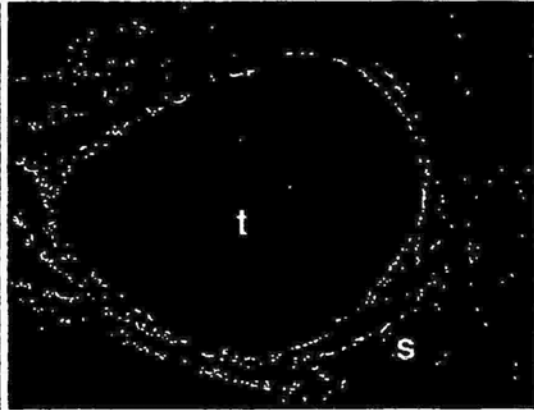
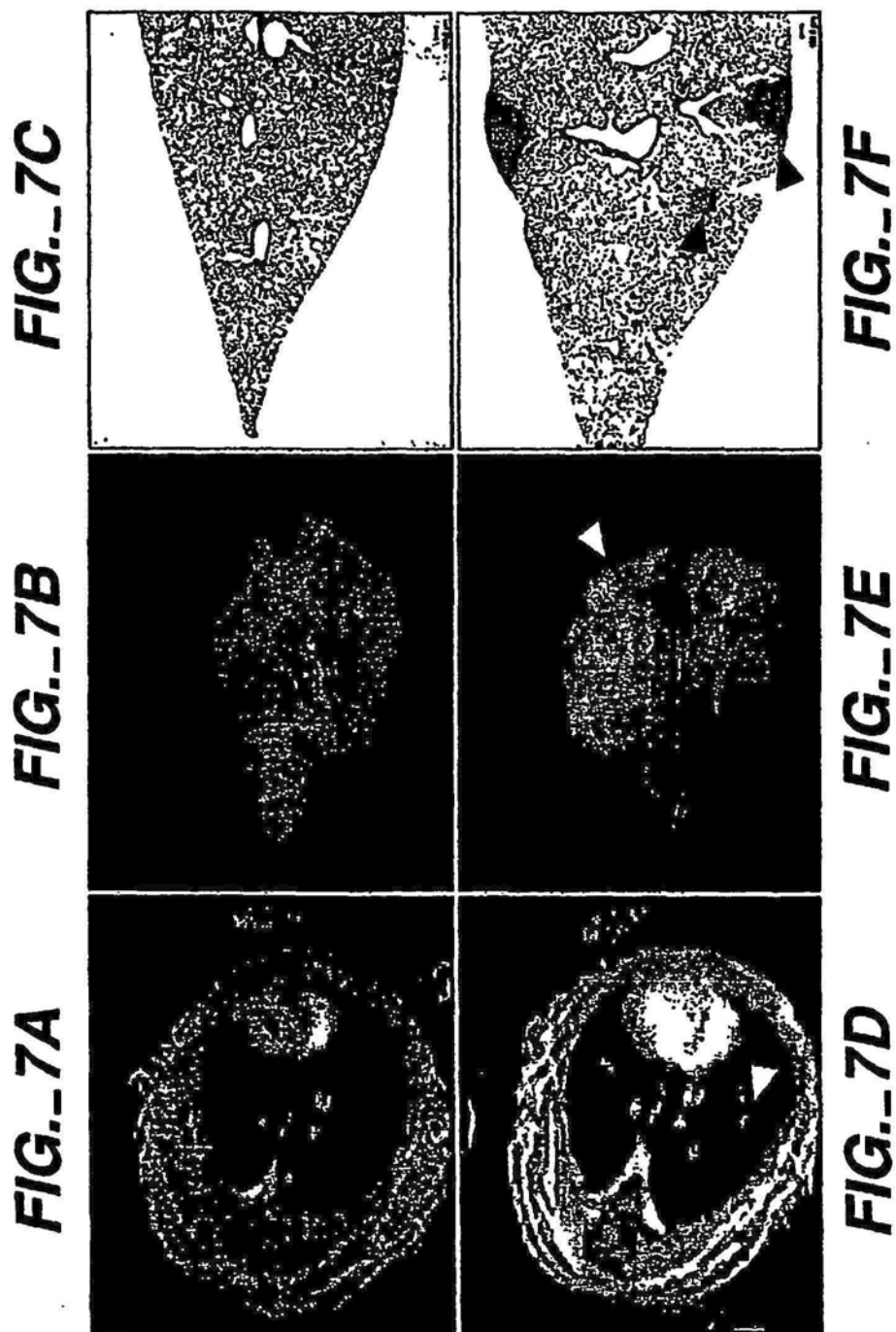
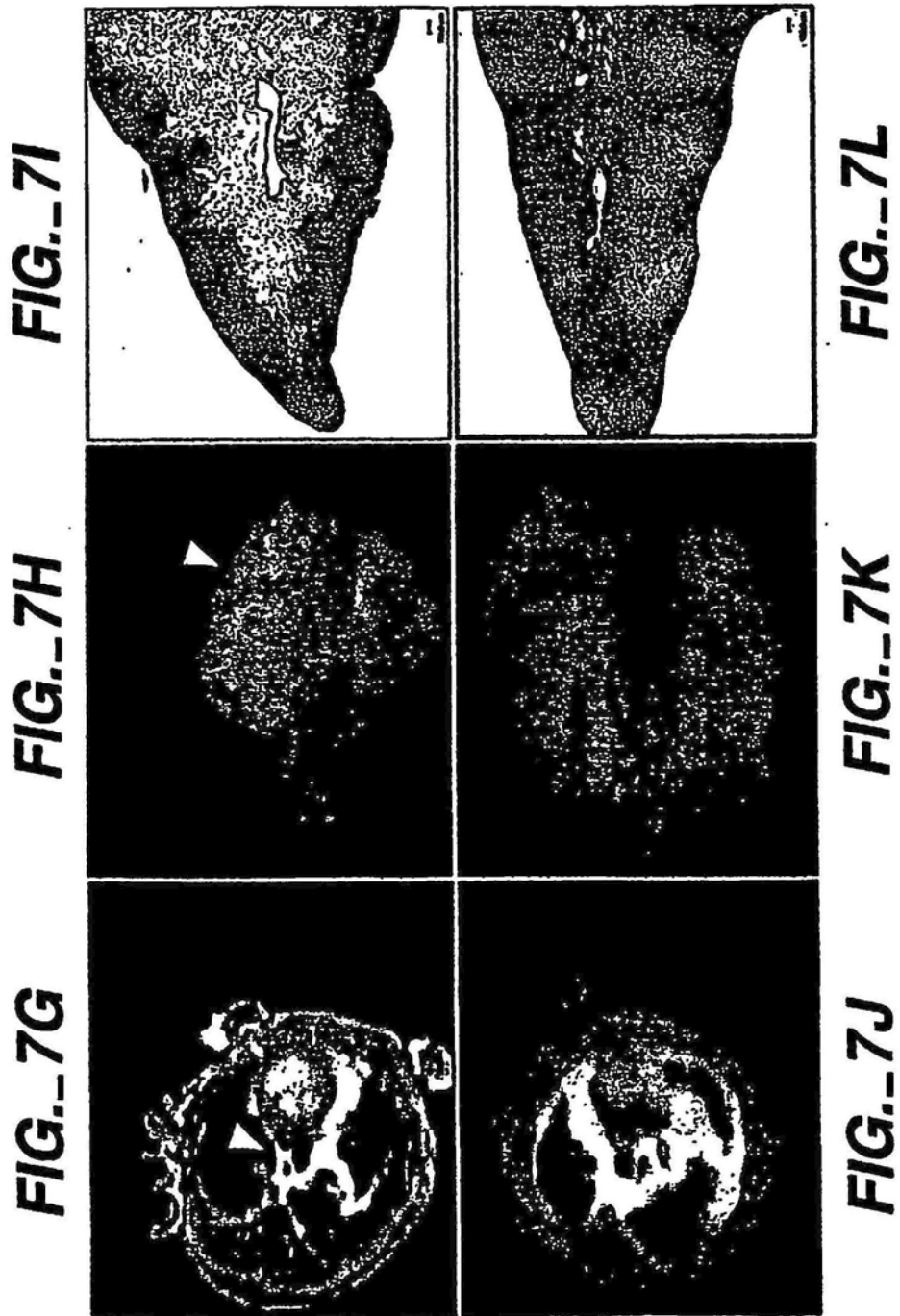
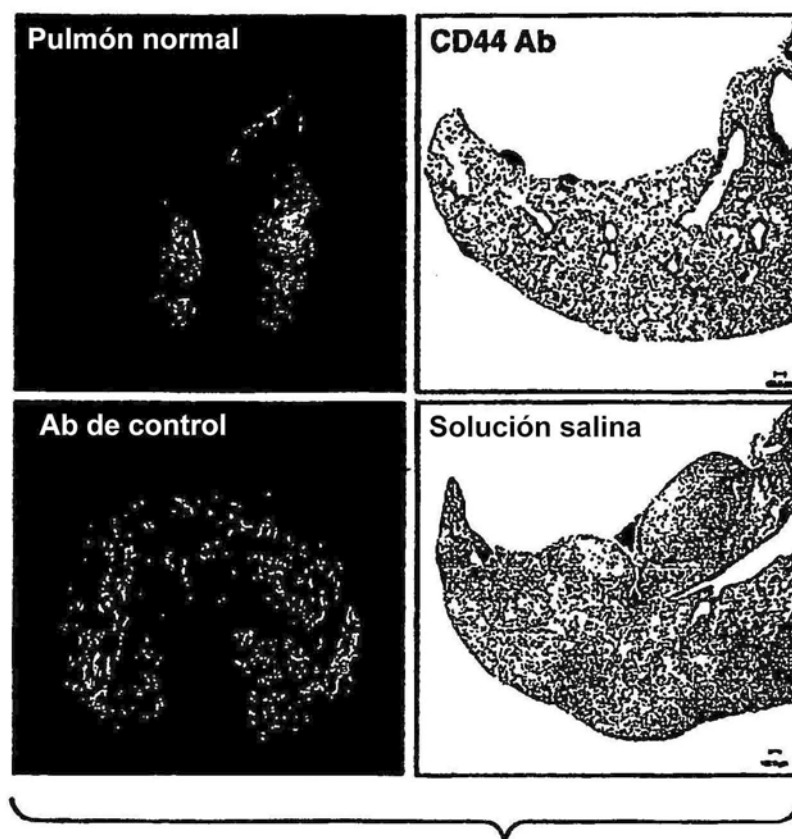
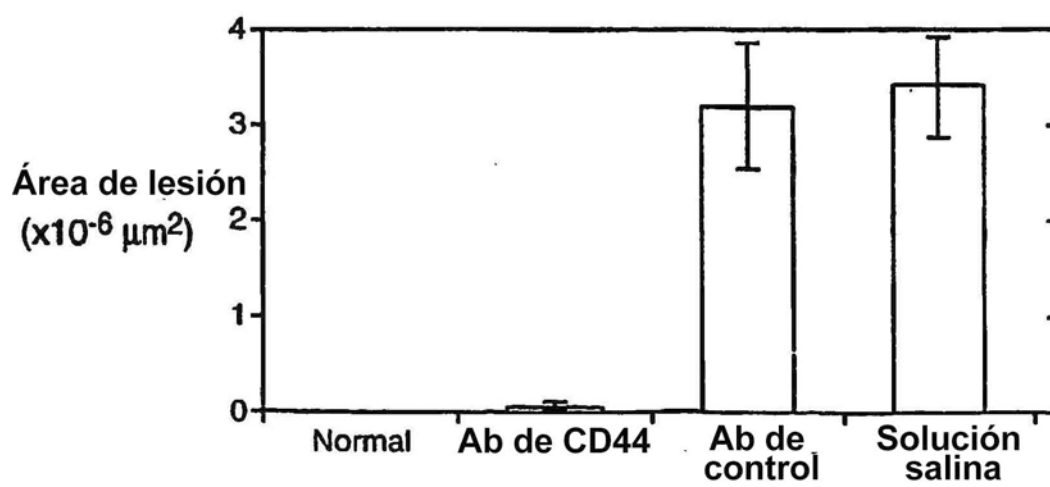


**FIG.\_6H**





**FIG.\_8A****FIG.\_8B**

1 CCACAGCGTC CGTGGGCCC AGCTCCCCCG AGAGTGGTC GGATCCTCTG GGTGCTCGG TCATGCTGAC GTCCAGGCAT GAGTGGTTC  
 GGGTGGCGAG GCGACCCGGG TCGAGGGGSC TCTCCACCAG CCTAGGAGAC CCGACGAGCC AGCTACGGAC ACGTGACTG CAGGTCCGTA CTCACCAAG  
 M R W F  
 101 CTGCGCTGGA CGTGGCAGC AGTGACAGCA GCAGCGGCCA GCACCTCTCT GGCACCGGCC CTCTCTCCAG CCCCTACGAC CATGGACTTT ACTCCAGCTC  
 GACGGGACCT GCGACCGTCG TCACTGTCTG CTTGGCGGT CTTGGCAGGA CCGTGGCTGG GAGAGAGTTC GGGGTGCTG GTACCTGAAA TGAGGTCCGAG  
 5 L P W T L A A V T A A A A S T V L A T A L S P A P T T M D F T P A P  
 201 CACTGGAGGA CACTCTCTCA CGCCCCCAAT TCTGCAAGTG GCCATGTAG TGCCCGCCAT CCCCACCCCG CTGCCCGCTG GGGGTGAGCC TCATCACAGA  
 GTGACCTCTT GTGGAGGAGT GCGGGGGTTA AGAGTTTAC CGGTACACTC ACGGGCGGTA GGGGTGGGGC GACGGCGGAC CCCCAGTGG AGTAGTGTCT  
 39 L E D T S S R P Q F C K W P C E C P P S P P R C P L G V S L I T D  
 301 TGGCTGTGAG TGTGTAAGA TGTGCGTCA GCAGCTTGG GACAATGCA CGGAGGTGC CATCTGTGAC CCCCACCGGG GCCTCTACTG TGACTACAGC  
 ACCGACACTC ACGACATCT ACACGCGAGT CGTCGAACCC CTGTTGACGT GCCTCCGACG GTAGACACTG GGGGTGGCCC CCGAGATGAC ACTGATGTG  
 72 G C E C C K M C A Q Q L G D N C T E A A I C D P H R G L Y C D Y S  
 401 GGGGACCGCC CGAGGTACGC AATAGGAGTG TGTGCACAGG TGGTCGGTGT GGGCTGCTC CTGGATGGG TGCGTACAA CAACGGCAG TCCTTCCAGC  
 CCGCTGGCGG GCTCCATGCG TTATCCTCAC ACAGTGTCC ACCAGCCACA CCGGACGAG GACTACCCC ACGCATGTT GTTGCCGTC AGGAAGGTG  
 105 G D R P R Y A I G V C A Q V V G V G C V L D G V R Y N N G Q S F Q P  
 501 CTAAGTCAA GTACACTGC ACGTGCATCG ACGGCGCGGT GGGCTGCACA CCACTGTGCC TCCGATGCG CCCCCCGGT CTCTGTGTC CCCACCCGCG  
 GATTGACGTT CATGTTGACG TGCACGTAGC TGCCCGGCCA CCGGACGTGT GTGACACGG AGGTCAAGC GGGGGCGCA GAGACCAAG GGGTGGGCGC  
 139 N C K Y N C T C I D G A V G C T P L C L R V R P P R L W C P H P R  
 601 GCGGTGAGC ATACCTGGCC ACTGCTGTGA GCAGTGGGTA TGTGAGGAGC ACGCCAAAG GCCACGCAAG ACCGACCCC GTGACACAGG AGCCTTCGAT  
 CCGGCACTCG TATGGACCGG TGACGACACT CGTCACCCAT ACATCTCTGC TGCGGTTCTC CGGTGCTTC TGGCGTGGG CACTGTGTC TCGGAAGCTA  
 172 R V S I P G H C C E Q W V C E D D A K R P R K T A P R D T G A F D  
 701 GCTGTGGGTG AGGTGGAGGC ATGGCACAGG AACTGCATAG CCTACACAAG CCGCTGGAGC CTTGTCTCCA CCAGTGGCG CTTGGGGTC TCCACTCGGA  
 CGACACCCAC TCCACCTCCG TACCGTGTCC TTGACGTATC GGATGTGTTT GGGACCTTC GGAACGAGGT GGTTCGAGCC GGACCCCGAG AGGTGAGCCT  
 205 A V G E V E A W H R N C I A Y T S P W S P C S T S C G L G V S T R I  
 801 TCTCCAATGT TAACGCCAG TGTGGCCTG AGCAAGAGG CCGCTCTGC AACTTGGGC CATGCGATGT GGACATCCAT ACACATCTTA AGGCAGGGA  
 AGAGGTACA ATTGGGCTC ACGACCGGAC TCGTTCTCTC GCGGAGAGC TTGAACGCG GTACCTAGA CCTGTAGTA TGTGAGTAT TCCGTCCCTT  
 239 S N V N A Q C W P E Q E S R L C N L R P C D V D I H T L I K A G K

FIG.-9A

901 GAAGTGTCTG GCTGTGTACC AGCCAGAGGC ATCCATGAAC TTCACACTTG CGGGTGCAT CAGCACACGC TCCTATCAAC CCAAGTACTG TGGAGTTTGC  
 CTTCACAGAC CGACACATGG TCGGTCTCCG TAGGTACTTG AAGTGTGAAC GCCCGACGTA GTCGTGTCG AGGATAGTTG GGTTCATGAC ACCTCAAACG  
 272 K C L A V Y Q . P E A S M N F T L A G C I S T R S Y Q P K Y C G V C  
 1001 ATGGACAATA GGTGCTGCAT CCCCTACAAG TCTAAGACTA TCGACGTGTC CTTCAGTGT CCTGATGGGC TTGGCTTCTC CCGCCAGGTC CTATGGATTA  
 TACCTGTAT CCACGACGTA GGGGATGTC AGATCTGAT AGTGCACAG GAAGTCACA GGACTACCCG AACCGAAGAG GCGGTGCCAG GATACCTAAT  
 305 M D N R C C I P Y K S K T I D V S F Q C P D G L G F S R Q V L W I N  
 1101 ATGCCGTCTT CTGTAAACCTG AGCTGTAGGA ATCCCAATGA CATCTTTGCT GACTTGGMAT CCTACCTGA CTCTCAGAA ATTGCCAACT AGGCAGGCAC  
 TACGGACGAA GACATGGAC TCGACATCCT TAGGGTTACT GTAGAAACGA CTGAACCTTA GGATGGGACT GAAGAGTCTT TAACGGTTGA TCCGTCCGTG  
 339 A C F C N L S C R N P N D I F A D L E S Y P D F S E I A N O  
 1201 AAATCTTGGG TCTTGGGAC TAACCCAATG CCTGTGAAGC AGTCAGCCCT TATGGCCAAT AACTTTTCAC CAATGAGCCT TAGTTACCCCT GATCTGGACC  
 TTTAGAACCC AGAACCCCTG ATTGGGTTAC GGACACTCG TCAGTCGGGA ATACCGGTTA TTGAAAAGTG GTTACTCGGA ATCAATGGGA CTAGACCTGG  
 1301 CTTGGCCTCC ATTTCTGTCT CTAACCATTC AAATGACGCC TGATGGTGCT GCTCAGGCC ATGCTATGAG TTTTCTCCTT GATATCATTC AGCATCTACT  
 GAACCGGAGG TAAAGACAGA GATTGTGAAG TTTACTGCGG ACTACCACGA CGAGTCCGGG TACGATATC AAAAGAGGAA CTATAGTAAG TCGTAGATGA  
 1401 CTAAGAAAA ATGCCTGTCT CTAGCTGTTT TGGACTACAC CCAAGCCTGA TCCAGCCTTT CCAAGTCACT AGAAGTCTCT CTGATCTTG CCTAAATCCC  
 GATTTCTTTT TACGGACAGA GATCGACAAG ACCTGATGTG GGTTCGGACT AGGTCGGAAA GGTTCAGTGA TCTTCAGGAC GACCTAGAAC GGATTTAGGG  
 1501 AAGAAATGGA ATCAGGTAGA CTTTAAATAT CACTAATTTT TTCTTTTAGAT GCCAAACCCAC AAGACTCTTT GGGTCCATTC AGATGAATAG ATGGAATTTG  
 TTCTTTTACCT TAGTCCATCT GAAATTTATA GTGATTTAAG AAGAAATCTA CGGTTTGGTG TTCTGAGAAA CCCAGGTAAG TCTACTTATC TACCTTAAAC  
 1601 GAACAATAGA ATAAATCTATT ATTTGGAGCC TGCCAAGAGG TACTGTAAATG GGTAATCTG ACGTCAGCGC ACCAAAATA TCCTGATTCC AAATATGTAT  
 CTGTATTCT TATTAGATTA TAAACCTCGG ACGGTTCTCC ATGACATTAC CCATTAAGAC TGCAGTCGCG TGGTTTTGAT AGGACTAAGG TTTATACATA  
 1701 GCACCTCAAG GTCATCAAC ATTTGCCAAG TGAGTTGAAT AGTTGCTTAA TTTTGATTTT TAATGGAAG TTGTATCCAT TAACCTGGGC ATTGTTGAGG  
 CGTGGAGTTC CAGTAGTTTG TAAACGTTT ACTCAACTA TCAACGAAT AAAACTAAA ATTACCTTTC AACATAGTA ATTGGACCCG TAACNACTCC  
 1801 TTAAGTTTCT CTTACCCCTT ACACGTGTGA GGTACAGAT TAGGTTGTC CCAGTCAGAA ATAAATTTG ATAAACATTC CTGTTGATGG GAAAAGCCCC  
 AATCAAGA GAAGTGGGA TGTGACACTT CCGATGTCTA ATCCAAACAG GGTCACTCTT TATTTTAAAC TATTGTGAAG GACAACTACC CTTTTCGGGG  
 1901 CAGTTAATAC TCCAGAGACA GGGAAAGGTC AGCCCATTTT AGAAGGACCA ATTGACTCTC ACACTGAATC AGCTGCTGAC TGGCAGGGCT TTGGGCAGTT  
 GTCAATTATG AGGTCTCTGT CCTTTTCCAG TCGGGTAAAG TCTTCTCTGT TAACTGAGAG TGTGACTTAG TCGACGACTG ACCGTCCCGA AACCCGTCAA

**FIG.--9B**

```

2001 GGCCAGGCTC TTCCTTGAAAT CTCTCTCCCTT GTCTCTGCTTG GGTTCATAGG AATTGGTAAG GCCTCTGGAC TGCCCTGTCT GGGCCCTGAG AGTGGTGCCC
CCGTCCTCGAG AAGGAACTTA GAAGAGGGAA CAGGACGAAC CCAAGTATCC TTAAACCATTC CGGAGACCTG ACCGGACAGA CCGGGGACTC TCACACCGGG

2101 TGGAACACTC CTCTACTCTT ACAGAGCCTT GAGAGACCCA GCTGCAGACC ATGCCAGACC CACTGAAATG ACCAAGACAG GTTCAGGTAG GGTGTGGGT
ACCTGTGTGAG GAGATGAGAA TGTCTCGGAA CTCTCTGGGT CGAGCTCTGG TACGGTCTGG GTGACTTTAC TGGTTCTGTC CAAGTCCATC CCCACACCCA

2201 CAAACCAAGA AGTGGGTGCC CTGTGTAGCA GCCTGGGGTG ACCTCTAGAG CTGGAGGCTG TGGGACTCCA GGGGCCCCCG TGTTCAGGAC ACATCTATTG
GTTTGGTTCT TCACCCACGG GAACCATCGT CGGACCCAC TGGAGATCTC GACCTCCGAC ACCCTGAGGT CCGCGGGGC ACAAGTCCCTG TGTAGATAAC

2301 CAGAGACTCA TTTCACAGCC TTTCGTTCTG CTGACCAAT GGCAGTTTT CTGGTAGGAA GATGAGGTT TACCAGTTGT TTAGAAACAG AAATAGACTT
GTCTCTGAGT AAAGTGTGCG AAAGCAAGAC GACTGTGTTA CCGTCAAAA GACCATCCTT CTACCTCAA ATGGTCAACA AATCTTTGTC TTTATCTGAA

2401 AATAAAGGTT TAAAGCTGAA GAGGTTGNAAG CTAAAGGAA AAGGTTGTTG TTAATGAATA TCAGGCTATT ATTTATTGTA TTAGGAAAT ATAATATTTA
TTATTTCCAA ATTCGACTT CTCCAACCTC GATTTTCCTT TTCCAACAAC AATTACTTAT AGTCCGATAA TAAATAACAT AATCCTTTTA TATTATTAAT

2501 CTGTTAGAAT TCTTTTATT AGGCCCTTTT CTGTGCCAGA CATGTCTCTC AGTGCTTTC ATGTATTAGC TCACTGAATC TTCACGACAA TGTGAGAAG
GACAATCTTA AGAAATATAA TCCCGGAAAA GACACGTCT GTAAACGAGAG TCACGAAACG TACATAATCG AGTGACTTAG AAGTGTCTGT ACAACTCTTC

2601 TTCCCATTTAT TATTTCTGTT CTTACAAATG TGAACGGAA GCTCATAGAG GTGAGAAAC TCACACAGAG TCACCCAGTT GGTGACTGGG AAGTTAGGA
AAGGTAATA ATAAAGACAA GAATGTTTAC ACTTTGCCCT CGAGTATCTC CACTCTTTTG AGTTGGTCTC AGTGGGTCAA CCACTGACCC TTTCAATCCT

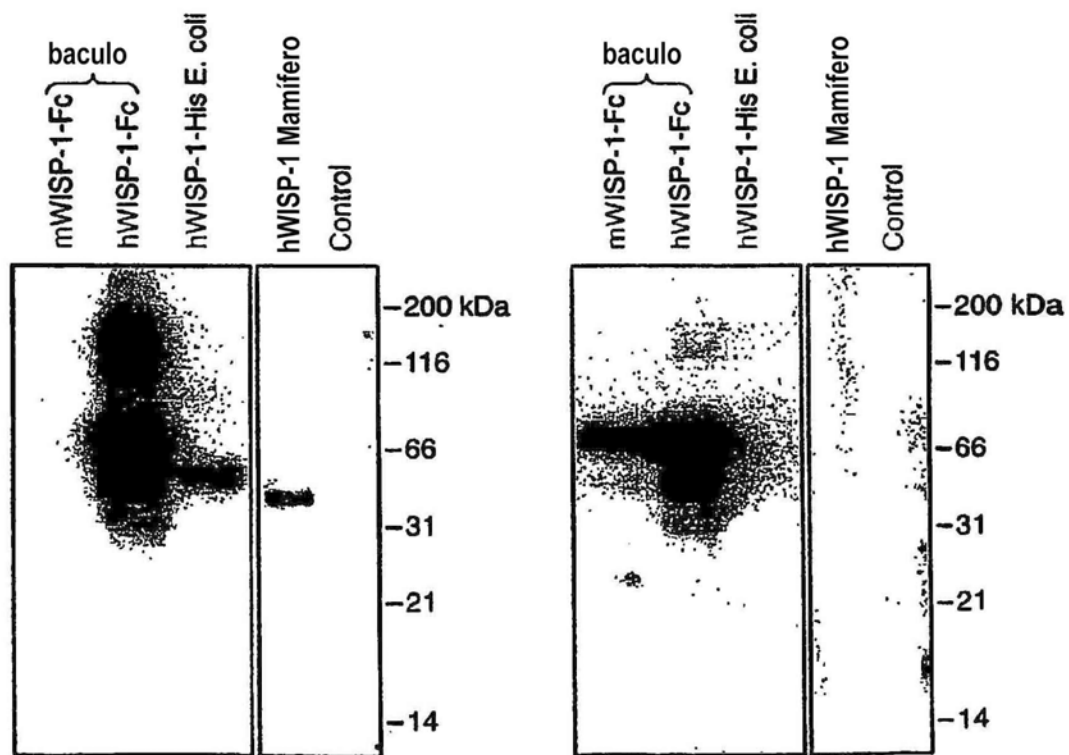
2701 TTCAGATCGA AATGGACTG TCTTTATPAC CCATATTTTC CCCTGTTTT TAGAGCTTCC AAATGTGCA GAATAGGAA ACATTGCAAT AAATGGCTTG
AAGTCTAGCT TTAACCTGAC AGAATATTG GGTATAAAG GGGACAAA ATCTCGAAGG TTTACACAGT CTATCTCTT TGTAAACGTTA TTTACCGAAC

2801 ATTTTTTAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
TAAAAAATTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT

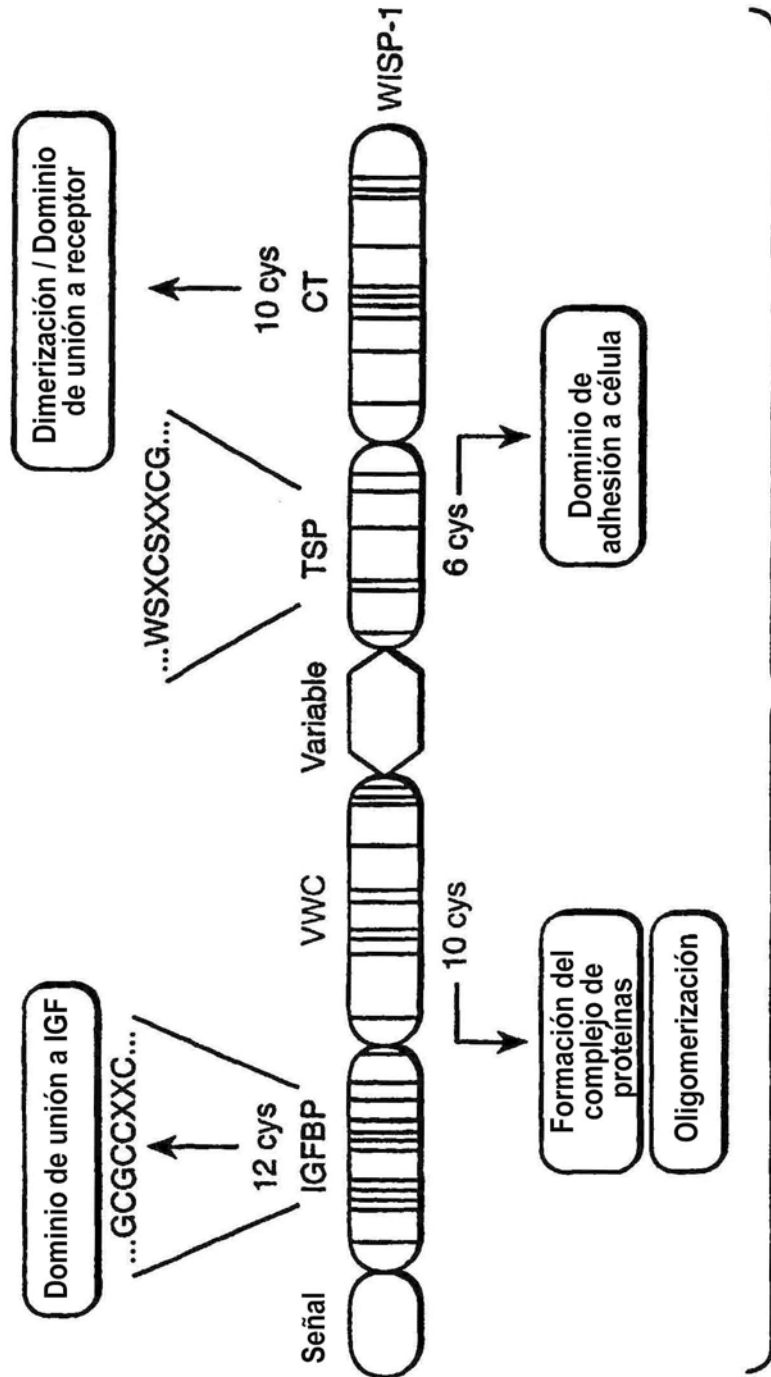
```

FIG.\_9C

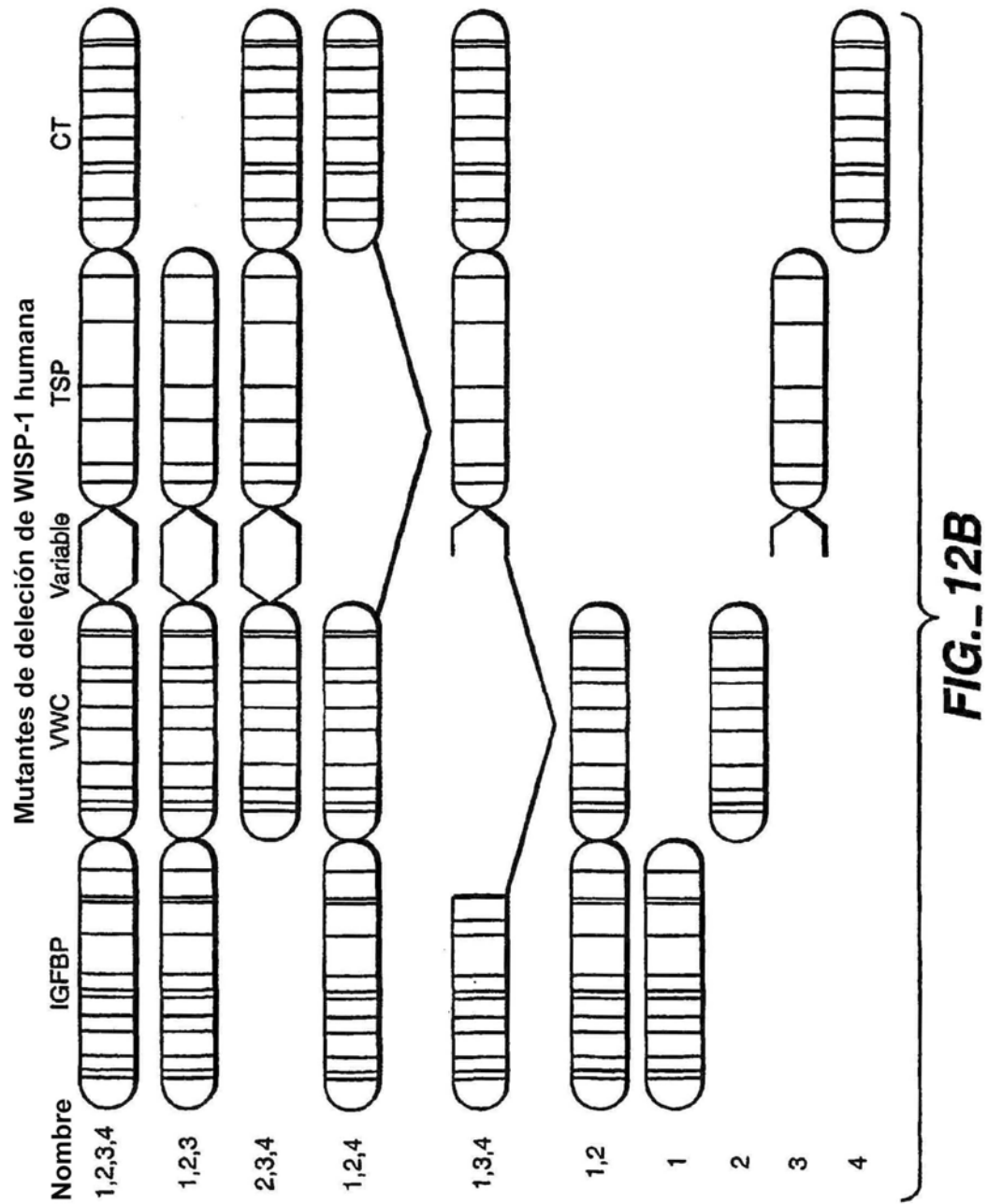
| Efecto de la expresión de WISP-1 sobre el potencial metastásico de NRK |                                         |                                    |               |                  |
|------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------------|---------------|------------------|
| Nº de células<br>inyectadas                                            | Semanas<br>después de<br>la inoculación | Incidencia de metástasis de pulmón |               |                  |
|                                                                        |                                         | NRK/Control                        | NRK/WISP-1L   | NRK/WISP-1H      |
| 2,5 x 10 <sup>5</sup>                                                  | 2                                       | 0/1                                | 0/1           | 2/2 (Grado I)    |
|                                                                        | 3                                       | 0/4                                | 3/3 (Grado I) | 4/4 (Grado I-II) |
|                                                                        | 4                                       | 0/4                                | 4/4 (Grado I) | 3/3 (Grado III)  |
| 0,5 x 10 <sup>5</sup>                                                  | 2                                       | 0/2                                | 0/2           | 1/2 (Grado I)    |
|                                                                        | 3                                       | 0/4                                | 2/4 (Grado I) | 3/4 (Grado I)    |
|                                                                        | 4                                       | 0/4                                | 4/4 (Grado I) | 3/4 (Grado I-II) |

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

WISP-1: Proteína secretada inducida por Wnt-1 (Wnt-1 Induced Secreted Protein)



127



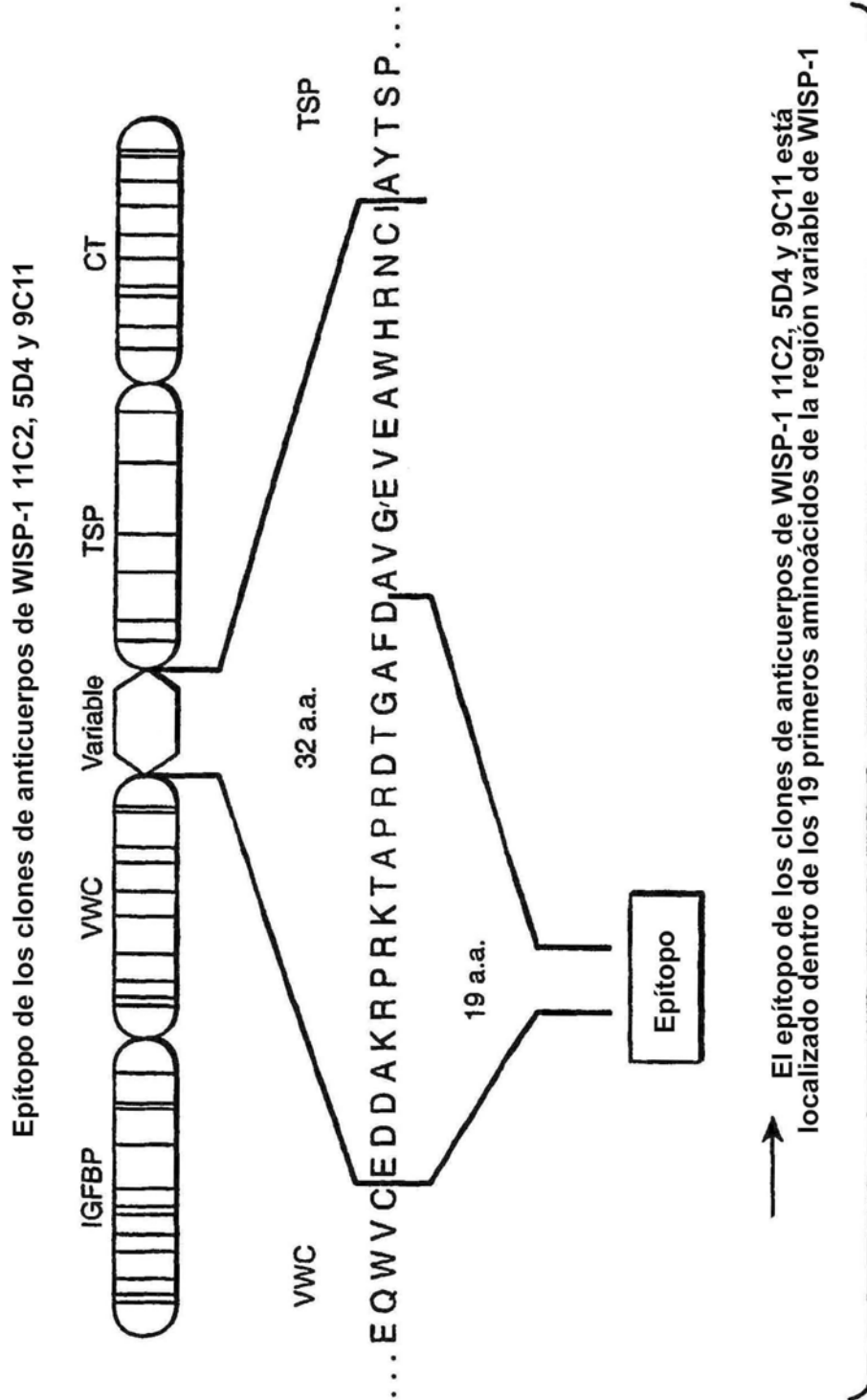
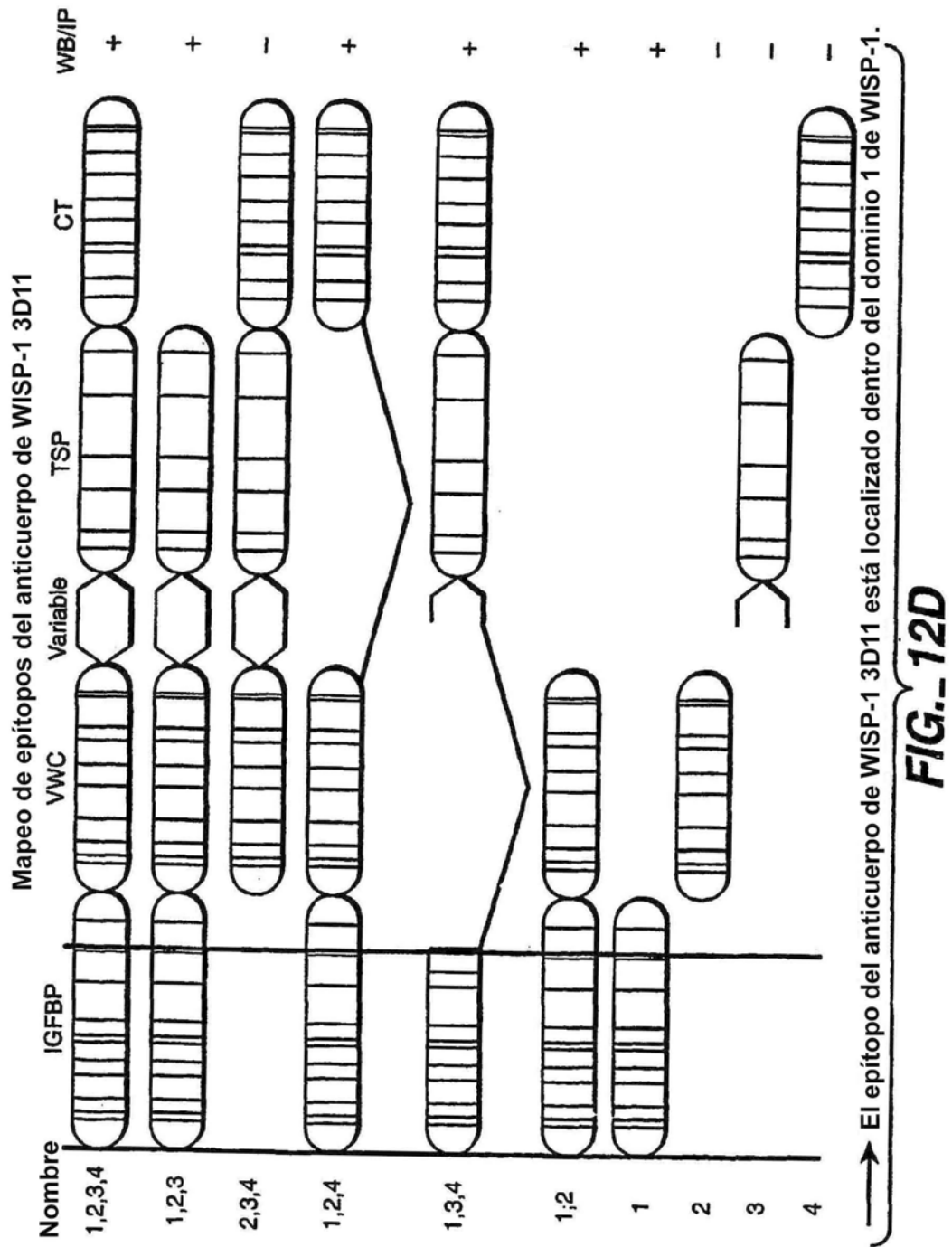
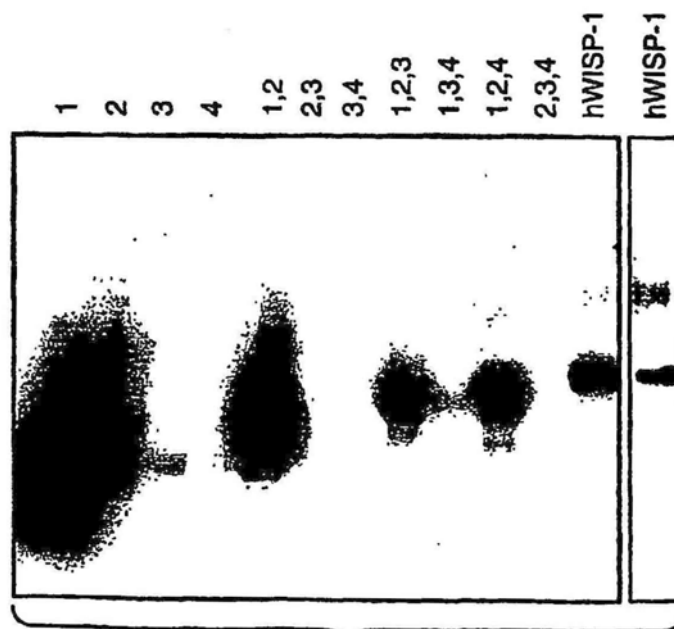
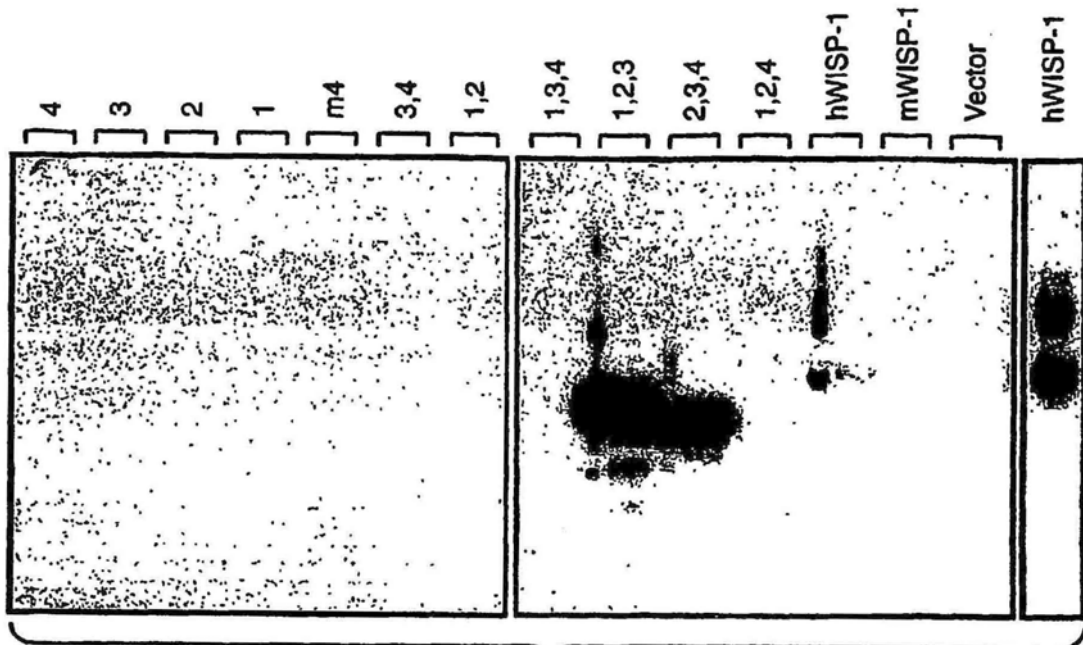
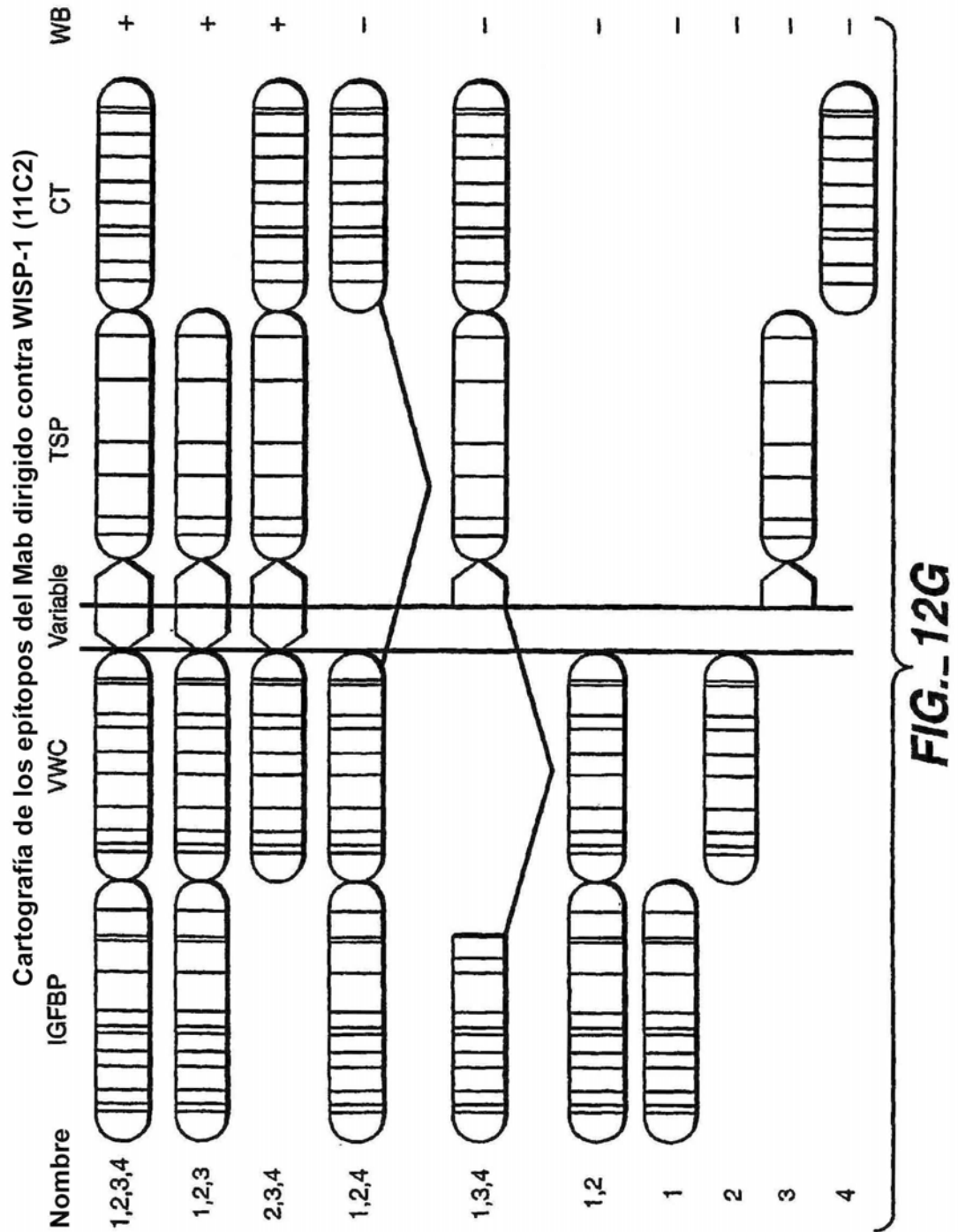


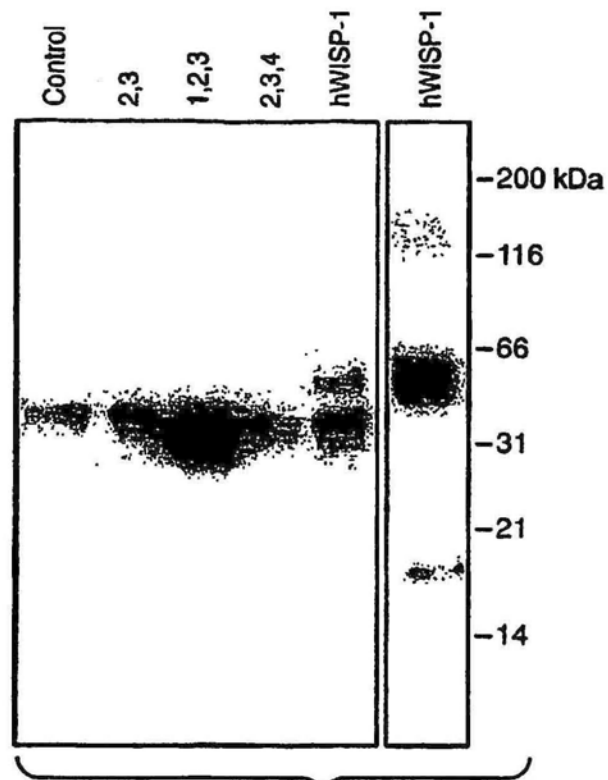
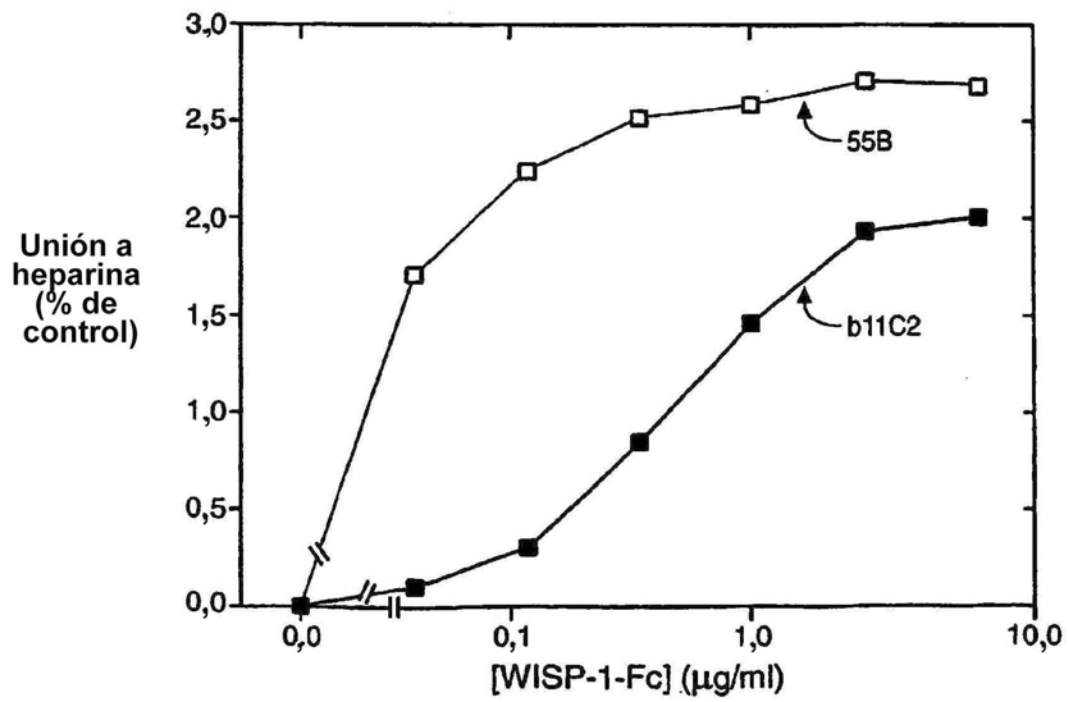
**FIG. 12C**



130





**FIG. 13****FIG. 14**

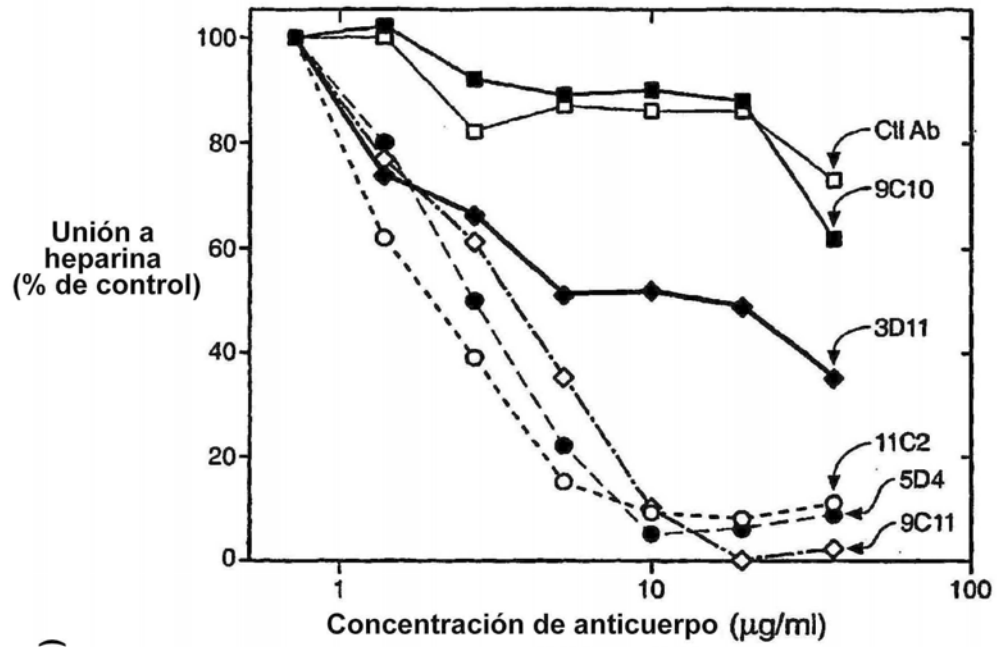


**FIG. 15**

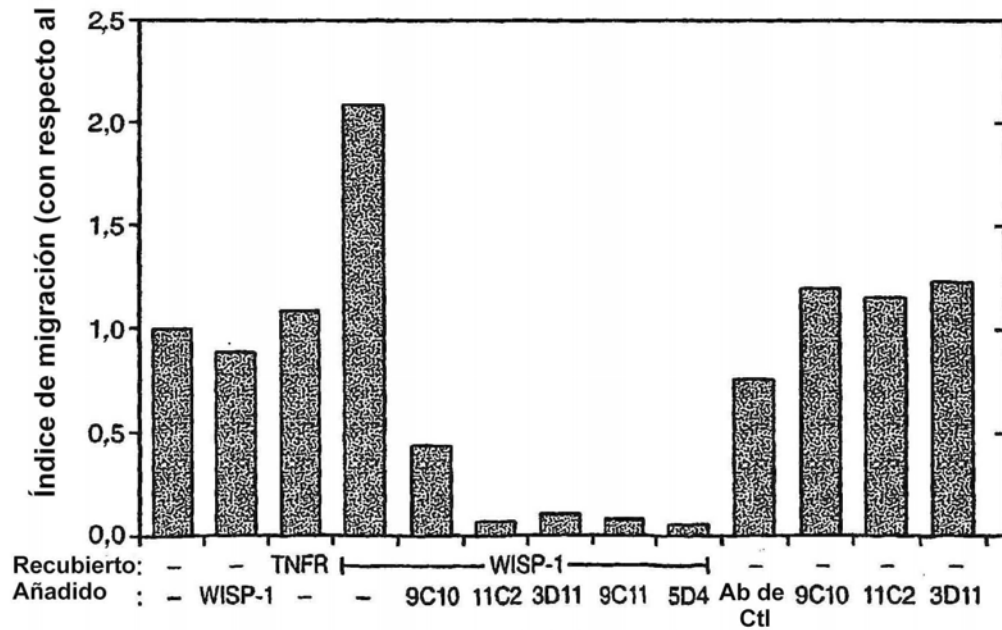
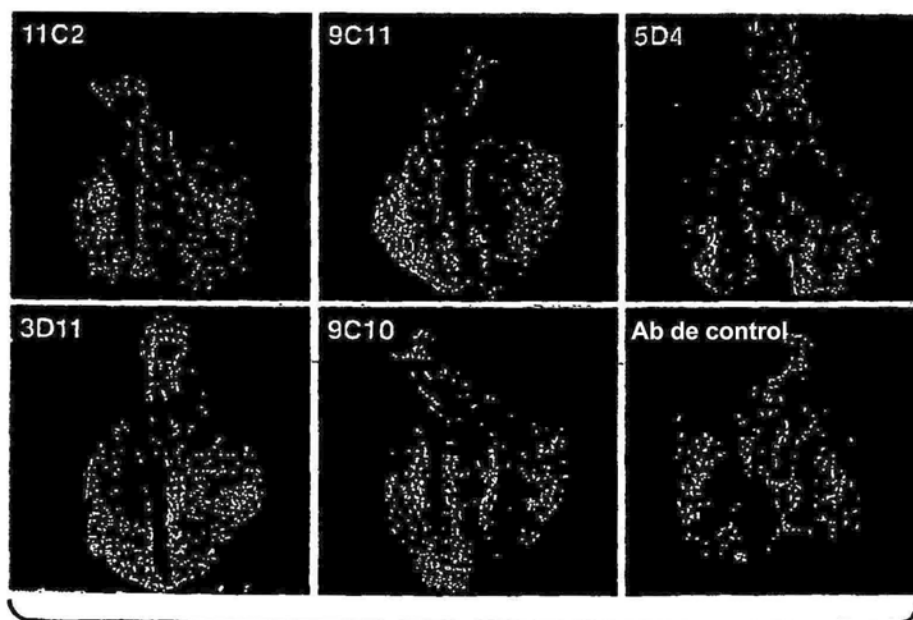
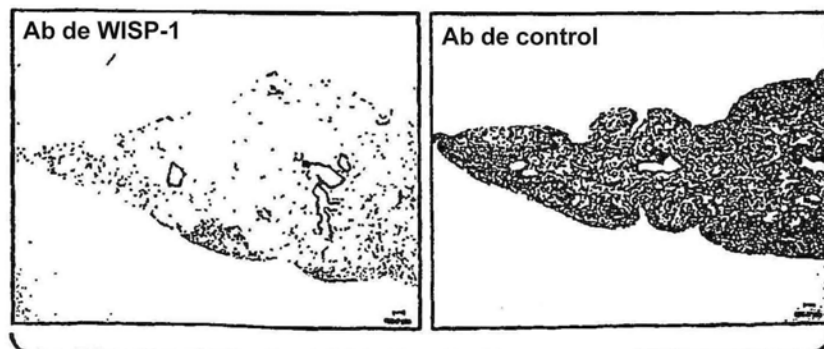
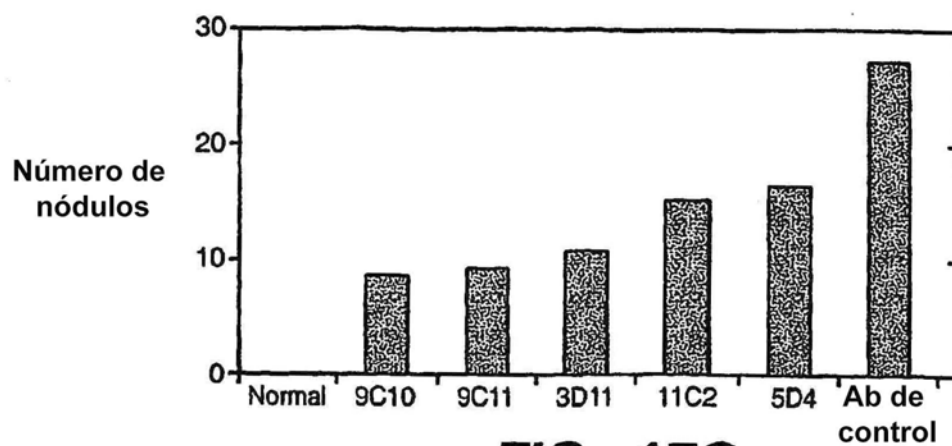
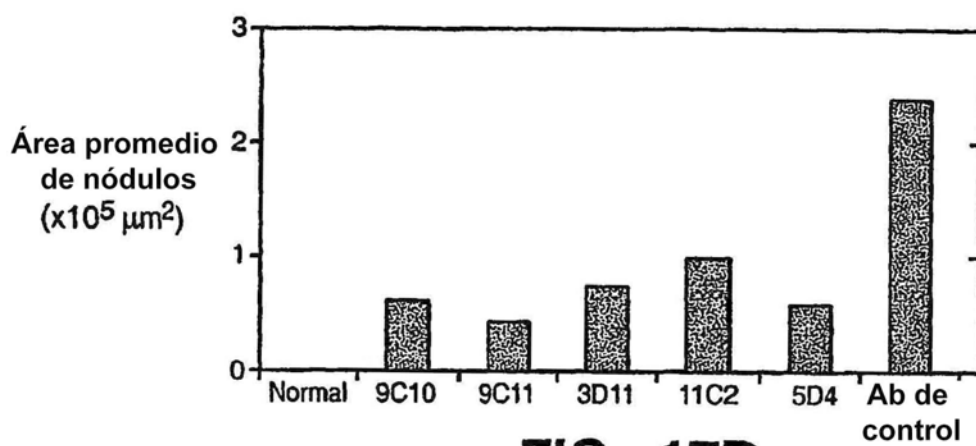
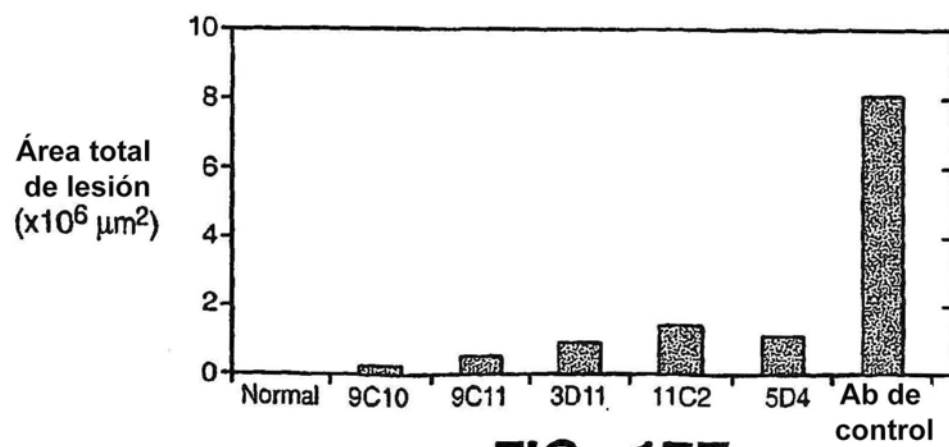


**FIG. 16A**

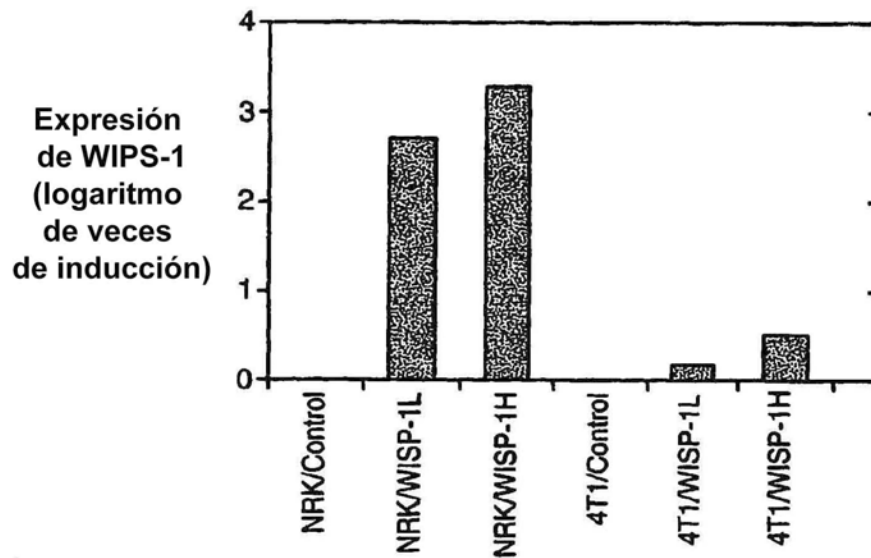
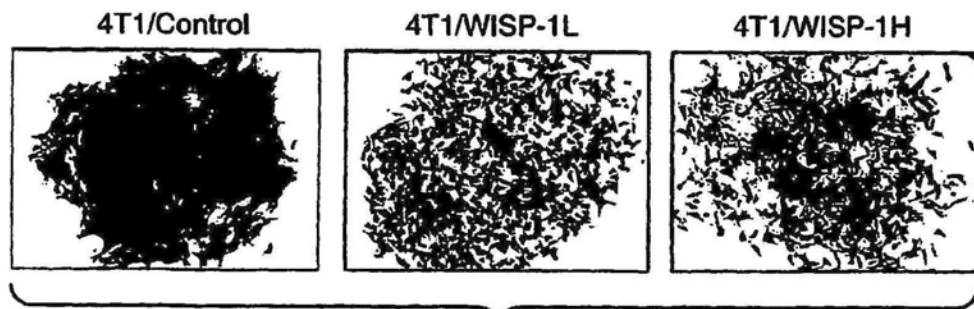
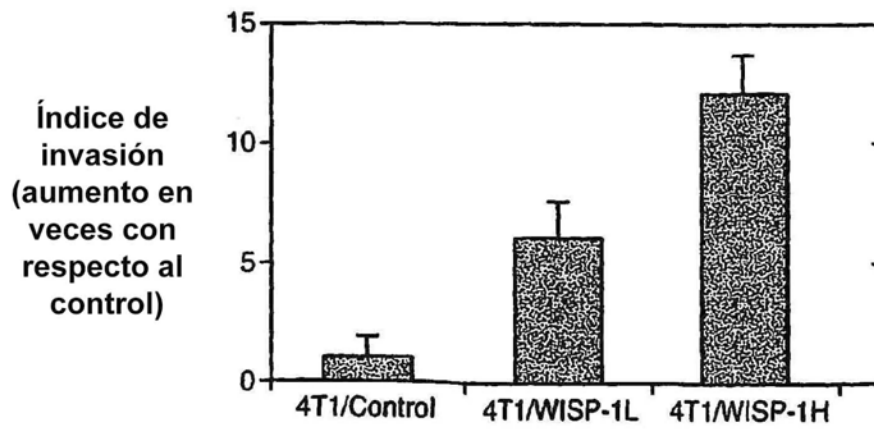
| Caracterización de anticuerpos de WISP-1 |         |                 |                     |    |    |                      |                      |                      |
|------------------------------------------|---------|-----------------|---------------------|----|----|----------------------|----------------------|----------------------|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

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

135

**FIG.. 17C****FIG.. 17D****FIG.. 17E**

136

**FIG.\_18****FIG.\_19****FIG.\_20**

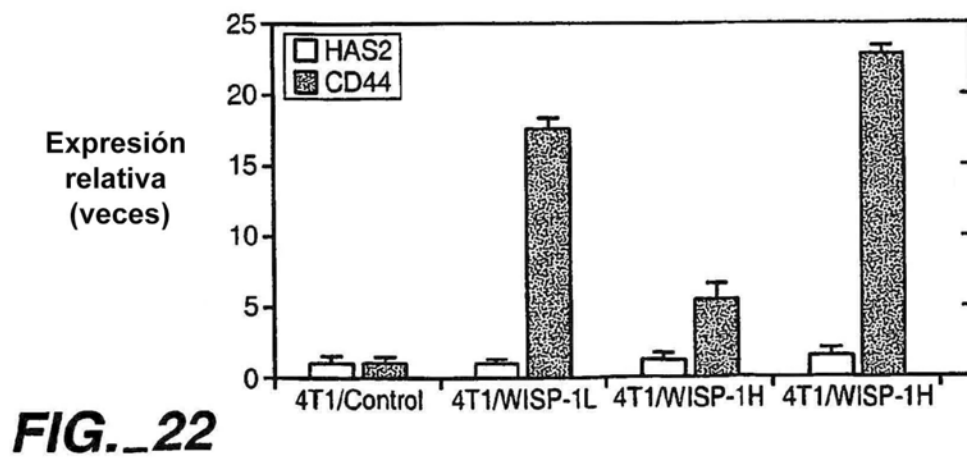
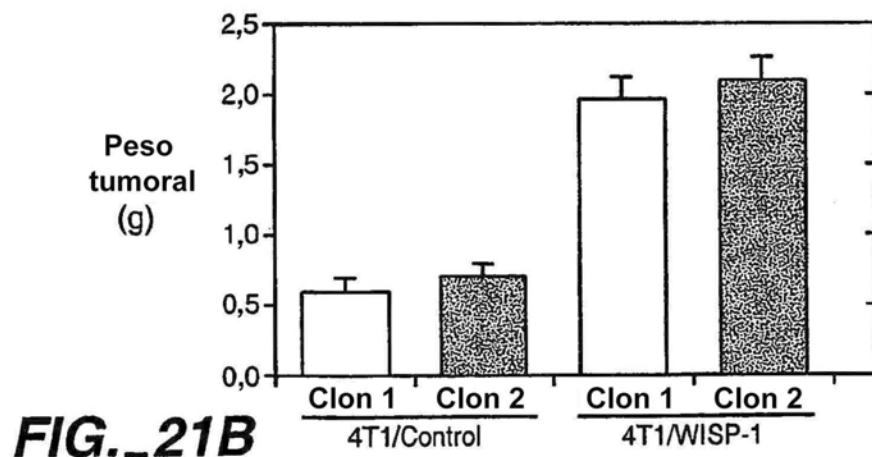
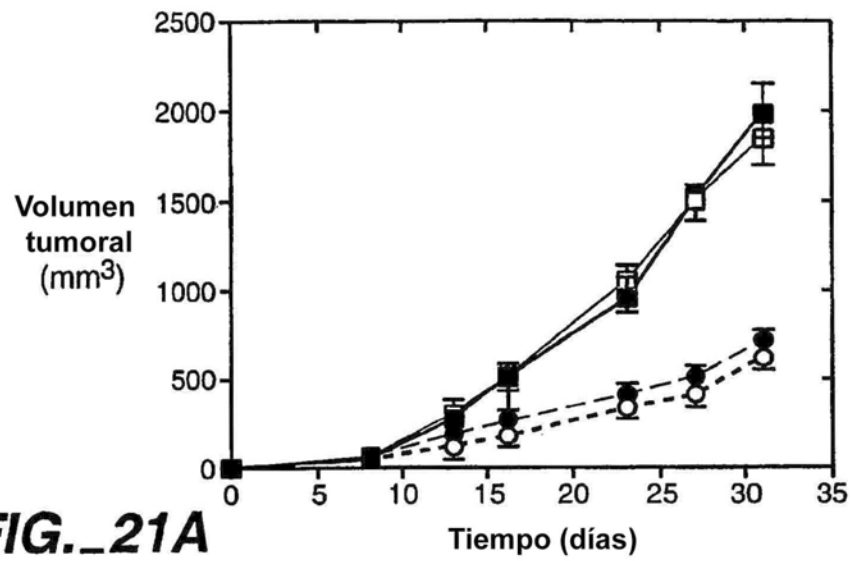


**FIG.\_23B**

**FIG.\_23D**

**FIG.\_23F**

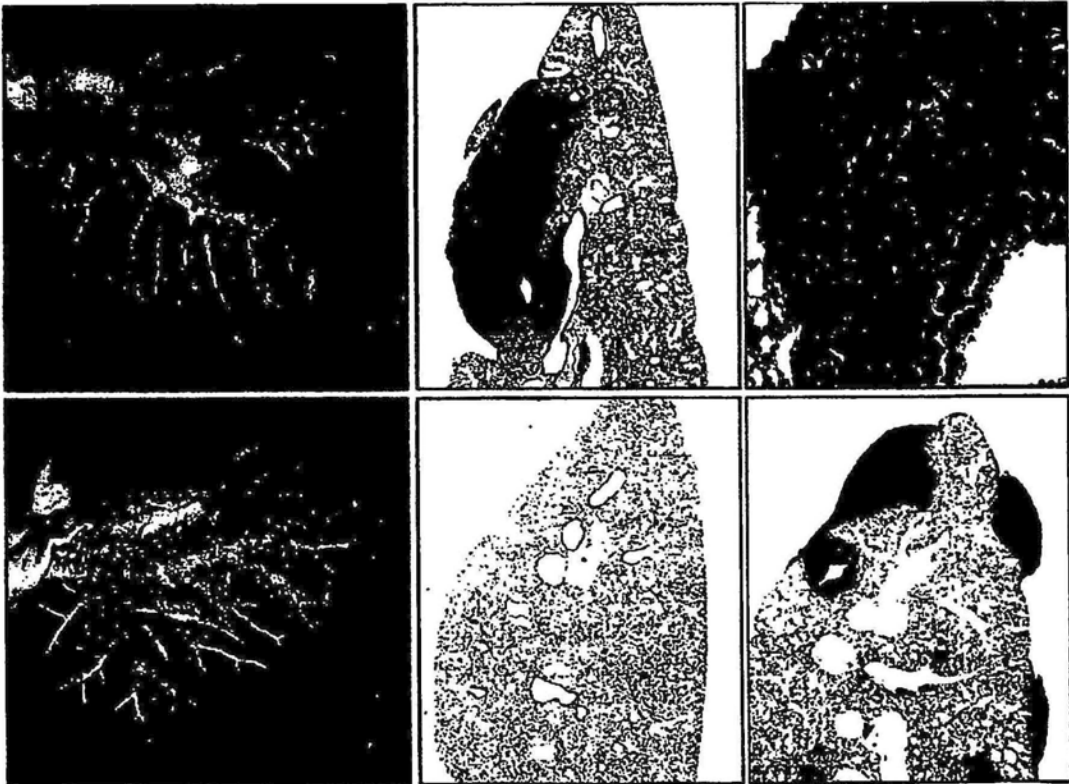


**FIG.\_23A**

**FIG.\_23C**

**FIG.\_23E**

**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

Esta lista de referencias citadas por el solicitante está prevista únicamente para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto el  
 5 máximo cuidado en su realización, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEP declina cualquier responsabilidad al respecto.

**Documentos de patente citados en la descripción**

- |    |                                     |                          |
|----|-------------------------------------|--------------------------|
| 10 | • WO 9517416 A [0006]               | • EP 117060 A [0132]     |
|    | • WO 9921998 A [0011] [0034] [0038] | • EP 117058 A [0132]     |
|    | • WO 9921999 A [0011]               | • US 4767704 A [0133]    |
|    | • WO 982123 A [0013]                | 50 • US 4657866 A [0133] |
|    | • WO 9821236 A [0013]               | • US 4927762 A [0133]    |
| 15 | • US 6387657 B1 [0034]              | • US 4560655 A [0133]    |
|    | • US 4816567 A [0059] [0060] [0146] | • US 5122469 A [0133]    |
|    | [0158]                              | • WO 9003430 A [0133]    |
|    | • US 5545807 A [0062]               | 55 • WO 8700195 A [0133] |
|    | • US 5545806 A [0062]               | • US RE30985 E [0133]    |
| 20 | • US 5569825 A [0062]               | • US 5428130 A [0138]    |
|    | • US 5625126 A [0062]               | • US 4640835 A [0148]    |
|    | • US 5633425 A [0062]               | • US 4496689 A [0148]    |
|    | • US 5661016 A [0062]               | 60 • US 4301144 A [0148] |
|    | • US 5750373 A [0062]               | • US 4670417 A [0148]    |
| 25 | • US 5821333 A [0066]               | • US 4791192 A [0148]    |
|    | • US 5500362 A [0070]               | • US 4179337 A [0148]    |
|    | • US 5821337 A [0070]               | • US 5716805 A [0149]    |
|    | • US 5364934 A [0099]               | 65 • WO 9410308 A [0149] |
|    | • WO 8905859 A [0115]               | • WO 9306213 A [0168]    |
| 30 | • US 4399216 A [0115]               | • WO 9308829 A [0171]    |
|    | • DD 266710 [0116]                  | • WO 9404690 A [0172]    |
|    | • US 4946783 A [0116]               | • US 4676980 A [0174]    |
|    | • EP 139383 A [0117]                | 70 • WO 9100360 A [0174] |
|    | • US 4943529 A [0117]               | • WO 92200373 A [0174]   |
| 35 | • EP 402226 A [0117]                | • EP 03089 A [0174]      |
|    | • EP 183070 A [0117]                | • WO 9429348 A [0175]    |
|    | • EP 244234 A [0117]                | • US 4342566 A [0175]    |
|    | • EP 394538 A [0117]                | 75 • US 5047335 A [0181] |
|    | • WO 9100357 A [0117]               | • US 5510261 A [0181]    |
| 40 | • US 5010182 A [0122]               | • US 5278299 A [0181]    |
|    | • EP 362179 A [0122]                | • WO 8101145 A [0184]    |
|    | • WO 9013646 A [0122]               | • WO 8807378 A [0184]    |
|    | • EP 36776 A [0126]                 | 80 • US 4975278 A [0184] |
|    | • EP 73657 A [0128]                 | • US 5739277 A [0187]    |
| 45 | • GB 2211504 A [0129]               | • US 3773919 A [0193]    |

- US 4657760 A [0197]
  - US 5206344 A [0197]
  - US 5225212 A [0197]
  - EP 616812 A [0200]
  - 5 • US 6387657 B [0207]
  - EP 03739341 A [0270]
  - US 0320407 W [0270]
  - US 60392652 B [0270]
  - US 60408739 B [0270]
- 10

### **Documentos no procedentes de patentes citados en la descripción**

- Oemar ; Luescher. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 1997, vol. 17, 1483-1489
- 15 [0002]
- Brigstock. Endocrine Rev., 1999, vol. 20, 189-206 [0002]
- Babic et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998, vol. 95, 6355-6360 [0002]
- Martinerie et al. Oncogene, 1994, vol. 9, 2729-2732 [0002]
- Martinerie et al. Oncogene, 1996, vol. 12, 1479-1492 [0002]
- 20 • Bork. FEBS Letters, vol. 327, 125-130 [0003]
- Frazier et al. J. Invest. Dermatol., 1996, vol. 107, 404-411 [0003]
- Kireeva et al. Mol. Cell. Biol., 1996, vol. 16, 1326-1334 [0003]
- Yang et al. Cell. Growth Diff., 1991, vol. 2, 351-357 [0003]
- Desnoyers et al. J. Biol. Chem., 2001, vol. 276, 97599-97607 [0003]
- 25 • Hashimoto et al. J. Exp. Med, 1998, vol. 187, 289-296 [0004]
- Zhang et al. Mol. Cell. Biol., 1998, vol. 18, 6131-6141 [0004]
- Holland et al. Dev. Suppl., 1994, 125-133 [0005]
- McMahon. Trends Genet., 1992, vol. 8, 236-242 [0005]
- Nusse ; Varmus. Cell, 1992, vol. 69, 1073-1087 [0005]
- 30 • Gavin et al. Genes Dev., 1990, vol. 4, 2319-2332 [0005]
- Lee et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1995, vol. 92, 2268-2272 [0005]
- Christiansen et al. Mech. Dev., 1995, vol. 51, 341-350 [0005]
- Vant Veer et al. Mol.Cell.Biol., 1984, vol. 4, 2532-2534 [0005]
- Nusse ; Varmus. Cell, 1982, vol. 31, 99-109 [0006]
- 35 • Peifer; Polakis. Science, 2000, vol. 287, 1606-1609 [0007]
- Papkoff ; Schryver. Mol. Cell. Biol., 1990, vol. 10, 2723-2730 [0007]
- Bradley ; Brown. EMBO J., 1990, vol. 9, 1569-1575 [0007]
- Rijsewik et al. Cell, 1987, vol. 50, 649-657 [0008]
- Morata; Lawrence. Dev. Biol., 1977, vol. 56, 227-240 [0008]
- 40 • Baker. Dev. Biol., 1988, vol. 125, 96-108 [0008]
- Klingensmith ; Nusse. Dev. Biol., 1994, vol. 166, 396-414 [0008]
- Herman ; Horvitz. Development, 1994, vol. 120, 1035-1047 [0008]
- McMahon ; Bradley. Cell, 1990, vol. 62, 1073-1085 [0008]
- Thomas ; Cappechi. Nature, 1990, vol. 346, 847-850 [0008]

- Stark et al. *Nature*, 1994, vol. 372, 679-683 [0008]
- Takada et al. *Genes Dev.*, 1999, vol. 8, 174-189 [0008]
- Parr; McMahon. *Nature*, 1995, vol. 374, 350-353 [0008]
- Bradbury et al. *Dev. Biol.*, 1995, vol. 170, 553-563 [0008]
- 5 • Li et al. *Oncogene*, 2000, vol. 19, 1002-1009 [0008] [0225]
- Dzierzak; Medvinsky. *Trends Genet.*, 1995, vol. 11, 359-366 [0009]
- Zon et al. *INSERM*. 1995, vol. 235, 17-22 [0009]
- Kanatsu ; Nishikawa. *Development*, 1996, vol. 122, 823-830 [0009]
- Christiansen et al. *Mech. Devel.*, 1995, vol. 51, 341-350 [0009]
- 10 • Cadigan ; Nusse. *Genes & Dev.*, 1997, vol. 11, 3286-3305 [0010]
- Pennica et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1998, vol. 95, 14717-14722 [0011] [0034]
- Xu et al. *Gene Develop.*, 2000, vol. 14, 585-595 [0011]
- Xie et al. *Cancer Res.*, 2001, vol. 61, 8917-8923 [0011]
- Saxena et al. *Mol. Cell Biochem.*, 2001, vol. 228, 99-104 [0011]
- 15 • Michaelson et al. *Oncogene*, 2001, vol. 20, 5093-5099 [0011]
- Tanaka et al. *Oncogene*, 2001, vol. 20, 5525-5532 [0011]
- Hurvitz et al. *Nature Genetics*, 1999, vol. 23, 94-97 [0012]
- Hardingham et al. *FASEB J.*, 1992, vol. 6, 861-870 [0014]
- Laurent et al. *FASEB J.*, 1992, vol. 6, 2397-2404 [0014]
- 20 • Knudson et al. *FASEB J.*, 1993, vol. 7, 1233-1241 [0014]
- Knudson et al. *CIBA Found. Symp.*, 1989, vol. 143, 150-169 [0014]
- CD44: Structure, Function and Association with the Malignant Process, *Advances. Naor et al. Cancer Research. Academic Press*, 1997, 241-319 [0014] [0015]
- Banerji et al. *J. Cell Biol.*, 1999, vol. 144, 789-801 [0014]
- 25 • Culty et al. *J. Cell Biology*, 1990, vol. 111, 2765-2774 [0015]
- Aruffo et al. *Cell*, 1990, vol. 61, 1303-1313 [0015] [0147]
- Ropponen et al. *Cancer Res.*, 1998, vol. 58, 342-347 [0015] [0092]
- Masaki et al. *Cancer*, 2001, vol. 92, 2539-2546 [0015]
- Wielenga et al. *Am. J. Pathology*, 1999, vol. 154, 515-523 [0015]
- 30 • Lesley et al. *Adv. Immunol.*, 1994, vol. 54, 271-335 [0015]
- Hardwick et al. *J. Cell Biol.*, 1992, vol. 117, 1343-1350 [0016]
- Turley et al. *Exp. Cell Res.*, 1993, vol. 207, 277-282 [0016]
- Bono et al. *Mol. Biol. Cell*, 2001, vol. 12, 891-900 [0017]
- Zhou et al. *J. Biol. Chem.*, 2000, vol. 275, 37733-37741 [0017]
- 35 • Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989 [0042] [0110]
- Chothia et al. *J. Mol. Biol.*, 1985, vol. 186, 653, 663 [0055]
- Novotny ; Haber. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, vol. 82, 4592-4596 [0055]
- Kabat, E.A. et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest. National Institutes of Health*, 1987 [0057]
- 40 • Mage et al. *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications. Marcel Dekker, Inc*, 1987, 79-97 [0059]
- Kohler ; Milstein. *Nature*, 1975, vol. 256, 495 [0060] [0152]
- McCafferty et al. *Nature*, 1990, vol. 348, 552-554 [0060]
- 45 • Vaughan et al. *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 309-314 [0062]

- Sheets et al. PNAS, (USA), 1998, vol. 95, 6157-6162 [0062]
- Hoogenboom ; Winter. J. Mol. Bio., 1991, vol. 227, 381 [0062]
- Marks et al. J. Mol. Biol., 1991, vol. 222, 581 [0062]
- Marks et al. Bio/Technology, 1992, vol. 10, 779-783 [0062] [0074]
- 5 • Lonberg et al. Nature, 1994, vol. 368, 856-859 [0062]
- Morrison. Nature, 1994, vol. 368, 812-13 [0062]
- Fishwild et al. Nature Biotechnology, 1996, vol. 14, 845-51 [0062]
- Neuberger. Nature Biotechnology, 1996, vol. 14, 826 [0062]
- Lonberg ; Huszar. Intern. Rev. Immunol., 1995, vol. 13, 65-93 [0062]
- 10 • Cole et al. Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy. Alan R. Liss, 1985, 77 [0062]
- Boerner et al. J. Immunol., 1991, vol. 147 (1), 86-95 [0062]
- Burton. Molec. Immunol., 1985, vol. 22, 161-206 [0065] [0067]
- Ravetch ; Kinet. Annu. Rev. Immunol., 1991, vol. 9, 457-92 [0070] [0072]
- 15 • Clynes et al. PNAS (USA), 1998, vol. 95, 652-656 [0070]
- Daëron. Annu. Rev. Immunol., 1997, vol. 15, 203-234 [0072]
- Capel et al. Immunomethods, 1994, vol. 4, 25-34 [0072]
- de Haas et al. J. Lab. Clin. Med., 1995, vol. 126, 330-41 [0072]
- Guyer et al. J. Immunol., 1976, vol. 117, 587 [0072]
- 20 • Kim et al. J. Immunol., 1994, vol. 24, 249 [0072]
- Santoro et al. J. Immunol. Methods, 1996, vol. 202, 163 [0073]
- Barbas et al. Proc Nat. Acad. Sci, USA, 1994, vol. 91, 3809-3813 [0074]
- Schier et al. Gene, 1995, vol. 169, 147-155 [0074]
- Yelton et al. J. Immunol., 1995, vol. 155, 1994-2004 [0074]
- 25 • Jackson et al. J. Immunol., 1995, vol. 154 (7), 3310-9 [0074]
- Hawkins et al. J. Mol. Biol., 1992, vol. 226, 889-896 [0074]
- Wilman. Prodrugs in Cancer Chemotherapy. Biochemical Society Transactions, 1986, vol. 14, 375-382 [0077]
- Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery. Stella et al. Directed
- 30 Drug Delivery. Humana Press, 1985, 247-267 [0077]
- Agnew. Chem Intl. Ed. Engl., 1994, vol. 33, 183-186 [0079]
- Cell cycle regulation, oncogens, and antineoplastic drugs. Murakami et al. The Molecular Basis of Cancer. WB Saunders, 1995, 13 [0080]
- Kosaki et al. Cancer Res., 1999, vol. 59, 1141-1145 [0088]
- 35 • Ichikawa et al. J. Invest. Dermatol., 1999, vol. 113, 935-939 [0088]
- Itano et al. Proc. Natl. Acad. Sci., 2002, vol. 99, 3609-3614 [0088]
- Zhang et al. Cancer Res., 1995, vol. 55, 428-433 [0088]
- Toole et al. J. Biol. Chem., 2002, vol. 277, 4593-4596 [0088]
- Pienimäki et al. J. Biol. Chem., 2001, vol. 276, 20428-20435 [0088] [0210]
- 40 • Camenisch et al. J. Clin. Invest., 2000, vol. 106, 349-360 [0088]
- Boyer et al. Biochem. Pharmacol., 2000, vol. 60, 1091-1099 [0088]
- Hay. Acta Anat., 1995, vol. 154, 8-20 [0088]
- Arias. Cell, 2001, vol. 105, 425-431 [0088]
- Turley et al. J. Biol. Chem., 2002, vol. 277, 4589-4592 [0089]
- 45 • Sy et al. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 1996, vol. 213, 129-153 [0089]

- Hall et al. *J. Neurooncol.*, 1995, vol. 26, 221-229 [0089]
- Lipponen et al. *Eur. J. Cancer*, 2001, vol. 37, 849-856 [0092]
- Auvinen et al. *Am. J. Pathol.*, 2000, vol. 156, 529-536 [0092]
- Anttila et al. *Cancer Res.*, 2000, vol. 60, 150-155 [0092]
- 5 • Kogerman et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1997, vol. 94, 13233-13238 [0093]
- Polakis. *Genes Dev.*, 2000, vol. 14, 1837-1951 [0094]
- Brown. *Breast Cancer Res.*, 2001, vol. 3, 351-355 [0094]
- Schlosshauer et al. *Carcinogenesis*, 2000, vol. 21, 1453-1456 [0094]
- Furuuchi et al. *Am. J. Pathol.*, 2000, vol. 156, 1997-2005 [0094]
- 10 • Michaelson et al. *Oncogene*, 2001, vol. 20, 5525-5532 [0094]
- Lin et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2000, vol. 97, 4262-4266 [0094]
- Carter et al. *Nucl. Acids Res.*, 1986, vol. 13, 4331 [0105]
- Zoller et al. *Nucl. Acids Res.*, 1987, vol. 10, 6487 [0105]
- Wells et al. *Gene*, 1985, vol. 34, 315 [0105]
- 15 • Wells et al. *Philos. Trans. R. Soc. London SerA*, 1986, vol. 317, 415 [0105]
- Cunningham ; Wells. *Science*, 1989, vol. 244, 1081-1085 [0106]
- Creighton. *The Proteins*. W.H. Freeman & Co, [0106]
- Chothia. *J. Mol. Biol.*, 1976, vol. 150, 1 [0106]
- Stewart et al. *Solid-Phase Peptide Synthesis*. W.H. Freeman Co, 1969 [0108]
- 20 • Merrifield. *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, vol. 85, 2149-2154 [0108]
- Dieffenbach et al. *PCR Primer: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995 [0110]
- Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach. IRL Press, 1991 [0114]
- Shaw et al. *Gene*, 1983, vol. 23, 315 [0115]
- 25 • Graham; van der Eb. *Virology*, 1978, vol. 52, 456-457 [0115]
- Van Solingen et al. *J. Bact.*, 1977, vol. 130, 946 [0115]
- Hsiao et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 1979, vol. 76, 3829 [0115]
- Keown et al. *Methods in Enzymology*, 1990, vol. 185, 527-537 [0115]
- Mansour et al. *Nature*, 1988, vol. 336, 348-352 [0115]
- 30 • Beach ; Nurse. *Nature*, 1981, vol. 290, 140 [0117]
- Fleer et al. *Bio/Technology*, 1991, vol. 9, 968-975 [0117]
- Louvencourt et al. *J. Bacteriol.*, 1983, vol. 154 (2), 737-742 [0117]
- Berg et al. *Bio/Technology*, 1990, vol. 8, 135 [0117]
- Sreekrishna et al. *J. Basic Microbiol.*, 1988, vol. 28, 265-278 [0117]
- 35 • Case et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1979, vol. 76, 5259-5263 [0117]
- Ballance et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 1983, vol. 112, 284-289 [0117]
- Tilburn et al. *Gene*, 1983, vol. 26, 205-221 [0117]
- Yelton et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, vol. 81, 1470-1474 [0117]
- Kelly ; Hynes. *EMBO J.*, 1985, vol. 4, 475-479 [0117]
- 40 • C. Anthony. *The Biochemistry of Methylotrophs*, 1982, 269 [0117]
- Graham et al. *J. Gen Virol.*, 1977, vol. 36, 59 [0119]
- Urlaub et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 9216 [0119]
- Mather. *Biol. Reprod.*, 1980, vol. 23, 243-251 [0119]
- Mather et al. *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 1982, vol. 383, 44-68 [0119]
- 45 • Urlaub et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 4216 [0125]

- Stinchcomb et al. *Nature*, 1979, vol. 282, 39 [0125]
- Kingsman et al. *Gene*, 1979, vol. 7, 141 [0125]
- Tschemper et al. *Gene*, 1980, vol. 10, 157 [0125]
- Jones. *Genetics*, 1977, vol. 85, 12 [0125]
- 5 • Chang et al. *Nature*, 1978, vol. 275, 615 [0126]
- Goeddel et al. *Nature*, 1979, vol. 281, 544 [0126]
- Goeddel. *Nucleic Acids Res.*, 1980, vol. 8, 4057 [0126]
- deBoer et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, vol. 80, 21-25 [0126]
- Hitzeman et al. *J. Biol. Chem.*, 1980, vol. 255, 2073 [0127]
- 10 • Hess et al. *J. Adv. Enzyme Reg.*, 1968, vol. 7, 149 [0127]
- Holland. *Biochemistry*, 1978, vol. 17, 4900 [0127]
- Gething et al. *Nature*, 1981, vol. 293, 620-625 [0132]
- Mantei et al. *Nature*, 1979, vol. 281, 40-46 [0132]
- Ham et al. *Meth. Enz.*, 1979, vol. 58, 44 [0133]
- 15 • Barnes et al. *Anal. Biochem.*, 1980, vol. 102, 255 [0133]
- Thomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 5201-5205 [0134]
- Deutscher. *Methods in Enzymology*, 1990, 182 [0137]
- Scopes. *Protein Purification: Principles and Practice*. Springer-Verlag, 1982 [0137]
- Chamow et al. *TIBTECH*, 1996, vol. 14, 52-60 [0138]
- 20 • Hoogenboom et al. *Mol. Immunol.*, 1991, vol. 28, 1027-1037 [0145]
- Stamenkovic et al. *Cell*, 1991, vol. 66, 1133-1144 [0147]
- Landschulz. *Science*, 1988, vol. 240, 1759 [0149]
- Hoppe et al. *FEBS Letters*, 1994, vol. 344, 1991 [0149]
- Maniatis et al. *Nature*, 1999, vol. 341, 24 [0149]
- 25 • Field et al. *Mol. Cell. Biol.*, 1988, vol. 8, 2159-2165 [0150]
- Evan et al. *Molecular and Cellular Biology*, 1985, vol. 5, 3610-3616 [0150]
- Paborsky et al. *Protein Engineering*, 1990, vol. 3 (6), 547-553 [0150]
- Hopp et al. *BioTechnology*, 1988, vol. 6, 1204-1210 [0150]
- Martin et al. *Science*, 1992, vol. 255, 192-194 [0150]
- 30 • Skinner et al. *J. Biol. Chem.*, 1991, vol. 266, 15163-15166 [0150]
- Lutz-Freyermuth et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, 6393-6397 [0150]
- Goding. *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*. Academic Press, 1986, 59-103 [0153]
- Kozbor. *J. Immunol.*, 1984, vol. 133, 3001 [0154]
- 35 • Brodeur et al. *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*. Marcel Dekker, Inc, 1987, 51-63 [0154] [0165]
- Munson ; Pollard. *Anal. Biochem.*, 1980, vol. 107, 220 [0155]
- Morrison et al. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1984, vol. 81, 6851 [0158]
- Iliades et al. *FEBS Letters*, 1997, vol. 409, 437-441 [0161]
- 40 • Kortt et al. *Protein Engineering*, 1997, vol. 10, 423-433 [0161]
- Jones et al. *Nature*, 1986, vol. 321, 522-525 [0162]
- Riechmann et al. *Nature*, 1988, vol. 332, 323-327 [0162]
- Verhoeyen et al. *Science*, 1988, vol. 239, 1534-1536 [0162]
- Kozbor. *J. Immunol.*, 1984, vol. 133, 3001 [0165]
- 45 • Jakobovits et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, vol. 90, 2551-255 [0166]

- Jakobovits et al. *Nature*, 1993, vol. 362, 255-258 [0166]
- Mendez et al. *Nature Genetics*, 1997, vol. 15, 146-156 [0167]
- McCafferty et al. *Nature*, 1990, vol. 348, 552-553 [0168]
- Johnson, Kevin S. ; Chiswell, David J. *Current Opinion in Structural Biology*, 1993,  
5 vol. 3, 564-571 [0168]
- Clackson et al. *Nature*, 1991, vol. 352, 624-628 [0168]
- Marks et al. *J. Mol. Biol.*, 1991, vol. 222, 581-597 [0168]
- Griffith et al. *EMBO J.*, 1993, vol. 12, 725-734 [0168]
- Marks et al. *Bio/Technol.*, 1992, vol. 10, 779-783 [0168]
- 10 • Waterhouse et al. *Nucl. Acids Res.*, 1993, vol. 21, 2265-2266 [0168]
- Millstein ; Cuello. *Nature*, 1993, vol. 305, 537-539 [0171]
- Traunecker et al. *EMBO*, 1991, vol. 10, 3655-3659 [0171]
- Suresh et al. *Methods in Enzymology*, 1986, vol. 121, 210 [0173]
- Morimoto et al. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 1992, vol. 24, 107-117 [0175]
- 15 • Brennan et al. *Science*, 1985, vol. 229, 81 [0175]
- Carter et al. *Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 163-167 [0175]
- Jefferis ; Lund. *Chem. Immunol.*, 1997, vol. 65, 111-128 [0177]
- Wright ; Morrison. *TibTECH*, 1997, vol. 15, 26-32 [0177]
- Boyd et al. *Mol. Immunol.*, 1996, vol. 32, 1311-1318 [0177]
- 20 • Wittwe ; Howard. *Biochem.*, 1990, vol. 29, 4175-4180 [0177]
- Wyss ; Wagner. *Current Opin. Biotech.*, 1996, vol. 7, 409-416 [0177]
- Malhotra et al. *Nature Med.*, 1995, vol. 1, 237-243 [0177]
- Umana et al. *Mature Biotech.*, 1999, vol. 17, 176-180 [0177]
- Hse et al. *J. Biol. Chem.*, 1997, vol. 272, 9062-9070 [0181]
- 25 • Massey. *Nature*, 1987, vol. 328, 457-458 [0185]
- Neuberger et al. *Nature*, 1984, vol. 312, 604-608 [0186]
- Remington's *Pharmaceutical Sciences*. 1980 [0187] [0191]
- Remington's. *Pharmaceutical Sciences*. Mack Publishing Co, 1980 [0188]
- *Chemotherapy Service*. Williams & Wilkins, 1992 [0200]
- 30 • Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor  
Press, 1989 [0205]
- Ausubel et al. *Current Protocols in Molecular Biology*. Green Publishing Associates  
and Wiley Interscience, 1989 [0205]
- Innis et al. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press,  
35 Inc, 1990 [0205]
- Harlow et al. *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, 1988  
[0205]
- Gait, M.J. *Oligonucleotide Synthesis*. IRL Press, 1984 [0205]
- R.I. Freshney. *Animal Cell Culture*, 1987 [0205]
- 40 • Coligan et al. *Current Protocols in Immunology*, 1991 [0205]
- Desnoyers et al. *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276, 47599-47607 [0207]
- Xu et al. *Genes Dev.*, 2000, vol. 14, 585-595 [0208] [0209]
- Knudson et al. *J. Cell Sci.*, 1991, vol. 99, 227-235 [0209]
- Winer et al. *Anal. Biochem.*, 1999, vol. 270, 41-49 [0211]
- 45 • Pienimäki et al. *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276, 20428-20435 [0215]

- Bourguignon et al. J. Biol. Chem., 2000, vol. 275, 1829-1838 [0217]
- Lu et al. Cell Vision, 1994, vol. 1, 169-176 [0218]
- Holcomb et al. EMBO J., 01 August 2000, vol. 19 (15), 4046-55 [0218]
- Tsukamoto et al. Cell, 1988, vol. 55, 619-625 [0225]
- 5 • Welch et al. Cancer Res., 2000, vol. 60, 1552-1556 [0227]