Organizacion CSA Ltda

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

PCT DVN NOV

B

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCIÓN

21. EXPEDIENTE N° 07-104186

54. TÍTULO "COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DEL TUMOR"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C12N 15/52

71. SOLICITANTE GENENTECH, INC.

DOMICILIO SAN FRANCISCO, ESTADO DE CALIFORNIA, ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

74. REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLOREDA RICAURTE
T.P.53.215

22. BOGOTÁ,D.C. 0 OCT. 2007

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 07-104186- -00000-0000
Fecha: 2007-10-04 16:19:38 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 300

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL 08/11/07

(1) SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.

(2) SOLICITANTE (71)	Nombre: **GENENTECH, INC.** Dirección: 1 Dna Way, South San Francisco, California 94080, Estados Unidos de América. Nacionalidad o Domicilio: San Francisco, Estado de California, Estados Unidos de América. Lugar de Constitución: Estado de Delaware, Estados Unidos de América. Teléfono: 3264270 Fax: 6069701 E-mail: jllcco@lloredacamacho.com	**IDENTIFICACION** C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____
(3) REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: **ALICIA LLOREDA RICAURTE** Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º, Bogotá, Colombia Teléfono: 3264270 Fax: 6069701 E-mail: jllcco@lloredacamacho.com	C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número 39.690.713 TP 53.215
(4) INVENTOR(ES) (72)	Nombre: DOWD, Patrick; FRANTZ, Gretchen; POLAKIS, Paul; SMITH, Victoria; SPENCER, Susan; WU, Thomas y ZHANG, Zemin. Dirección: 18 Ord Street, San Francisco, California 94114; 2819 Buchanan Street, San Francisco, California 94123; 265 West Blithedale Avenue, Mill Valley, California 94941; 19 Dwight Road, Burlingame, California 94010; 2395 Paradise Drive, Tiburon, California 94920; 41 Nevada Street, San Francisco, California 94110 y 876 Taurus Drive, Foster City, California 94404. Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América.	

(5) PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2006/013501 Fecha: 05/04/06

Publicación Internacional No. WO 2006/110760 A3 Fecha: 19/10/06

(6) Título (54) "COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DEL TUMOR"

(7) Clasificación Internacional (51) C12N 15/52 .

(8) Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	US	08/04/05	11/102, 501

(9) Comprobante de Pago No. 07-77,452 **Fecha:** Septiembre 25 de 2007

1

(10) **ANEXOS**

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- [X] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- [X] Documento de Representación Legal.
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [ ] Declaraciones
- [ ] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones)
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [ ] Copia del Reporte Preliminar Internacional sobre patentabilidad.
- [ ] Traducción del Reporte Preliminar Internacional sobre patentabilidad.
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- [ ] Arte Final 12X12.
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [ ] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- [x] Otros: Reporte de Búsqueda Internacional con su traducción, Publicación con su traducción, Opinión Escrita con su traducción y Listado de Secuencias.

(11) **FIGURA CARACTERISTICA:**

(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA

FIRMA:

C.C. 39.690.713 Usaquén T.P. 53.215

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 07-104186- -00000-0000

Fecha: 2007-10-04 16:19:38 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 300

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 77,452
FECHA : SEPTIEMBRE 25 DE 2007

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	47999507	25/09/2007	5,800,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
		TOTAL : $	482,000.00

SON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores **ALICIA LLOREDA** y/o **GUSTAVO TAMAYO** y/o **IGNACIO SANTAMARIA** y/o **ENRIQUE ALVAREZ** para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se está presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.

ALICIA LLOREDA RICAURTE
T.P. No. 53.215

Traducción Oficial Nº 10-31-191

Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en Inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ilbar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.

APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 1961)

1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. El presente Documento Público ha sido firmado por: TERI LEE
3. actuando en calidad de: Notario Público, Estado de California
4. lleva el sello y estampilla de TERI LEE, Notario Público

CERTIFICADO

5. en Sacramento, California
6. el día tres (3) de Octubre, año 2005
7. por el Secretario Adjunto de Estado, Estado de California
8. Número: **258054**
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (Ilegible)

Secretario de Estado

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCUITO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
13 SET 2007
PABLO [illegible]DEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

N. del T.: hay un sello dorado, seco, en relieve: "The Great Seal of the State of California"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

CALIFORNIA RECONOCIMIENTO PARA TODO FIN

Estado de California)
) ss.
Condado de San Mateo)

El día 13 de Septiembre, año 2005, ante mi, TERI LEE, Notario Público, compareció personalmente TIMOTHY R. SCHWARTZ, a quien personalmente conozco cómo la persona cuyo nombre suscribe el documento, y quien reconoció en mi presencia haber formalizado el mismo dentro de su investidura, y que mediante su firma en el documento, la persona o entidad en cuyo nombre actuó, formalizó el documento.

En TESTIMONIO firmo y sello

Firma (ilegible)

N. del T: hay un sello: TERI LEE, Comisión Nº 1514234, Notario Público, California, Condado de San Mateo.

OPCIONAL

Descripción del documento adjunto

Título o Clase de Documento: Colombia Power
Fecha: 9/13/2005
Número de páginas: 1
Firma diferente de la mencionada anteriormente: *Ninguna*

PODER DE REPRESENTACION LEGAL

Documento escrito en idioma Inglés y Español, suscrito por Genentech, Inc., con domicilio en 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080, EEUU.

DADO Y FIRMADO EL DIA TRECE (13) DE Septiembre año 2005.

Firma (ilegible)

NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA CONCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
13 SET 2007
PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

N. del T.: Hay un sello de tinta: Timothy R. Schwartz, Ph. D.- Asesor Sección de Patentes – Genentech, Inc. – Signatario Corporativo Autorizado.

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920

Traducción Oficial Nº 10-31-192

Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en Inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ilbar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.

APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 1961)

1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. El presente Documento Público ha sido firmado por: Harriet Smith Windsor
3. actuando en calidad de: Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello y estampilla del Despacho del Secretario de Estado

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
13 SET 2007
PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

CERTIFICADO

5. en Dover, Delaware
6. el día siete (7) de Octubre, año 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado Delaware
8. Número: **0265282**
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (Ilegible)

Secretario de Estado

N. del T.: hay un sello dorado, seco, en relieve: "Secretary´s Office - Deiaware"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

174485

Elba Espana

CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 OCT 31 A 10:59

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

PABLO MEN... NOTARIA

13 SET 2007

NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE ME HA SIDO PUESTO A LA VISTA

DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE "GENENTECH, INC." ESTA DEBIDAMENTE INCORPORADO BAJO LAS LEYES DEL ESTADO DE DELAWARE Y GOZA DE BUENA REPUTACION Y TIENE EXISTENCIA CORPORATIVA LEGAL, TAL COMO LO MUESTRAN LOS REGISTROS DE ESTE DESPACHO, EN LA FECHA DEL SIETE (7) DE OCTUBRE, AÑO 2005.

Y ADEMAS CERTIFICO QUE DICHO "GENENTECH, INC." FUE INCORPORADO EL DIA VEINTITRES (23) DE DICIEMBRE DEL AÑO 1986.

Y ADEMAS CERTIFICO QUE LOS REPORTES ANUALES HAN SIDO RADICADOS HASTA LA FECHA.

Y ADEMAS CERTIFICO QUE LOS IMPUESTOS DE FRANQUICIA HAN SIDO PAGADOS HASTA LA FECHA.

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
13 SET 2007
PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

Firma (ilegible)

Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

AUTENTICACIÓN: 4212779 FECHA 10-07-05

N. del T.:. Hay un sello dorado, en relieve: "Secretary´s Office – Delaware"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

7

Traducción Oficial Nº 10-31-193

Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en Inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ilbar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.

APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 1961)

1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. El presente Documento Público ha sido firmado por: Harriet Smith Windsor
3. actuando en calidad de: Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello y estampilla del Despacho del Secretario de Estado

CERTIFICADO

5. en Dover, Delaware
6. el día siete (7) de Octubre, año 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado Delaware
8. Número: **0265283**
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (Ilegible)

Secretario de Estado

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL DE SU CERTIFICADO
13 SET 2007
PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

N. del T.: hay un sello dorado, seco, en relieve: "Secretary´s Office - Delaware"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

8

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 OCT 31 A 10:59

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

17487

Albar Espard

CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

CORSO ROTARIO SEXTO(6) DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE ME TENIDO A LA VISTA

03 SET 2007

PABLO

DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE EL DOCUMENTO ADJUNTO ES UNA COPIA FIEL Y VERDADERA DEL CERTIFICADO REFORMULADO DE "GENENTECH, INC.", REGISTRADO EN ESTE DESPACHO EL DIA VEINTIDOS DE JULIO DEL AÑO 1999, A LAS 9:00 A.M.

Firma (ilegible)

Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

AUTENTICACION: 4212780 FECHA: 10-07-05

N. del T. Hay un sello dorado, en relieve: "Secretary´s Office – Delaware"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Ministerio No. 0920

COMO NOTARIO 69 DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA

13 SET 2007

PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN
MODIFICADO Y REFORMULADO
DE GENENTECH, INC.

Genentech, Inc. (la "**Corporación**"), una corporación organizada y existente bajo y en virtud de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware, por el presente modifica el Certificado de Incorporación de la Corporación, qué fue registrada originalmente el 23 de diciembre,1986 bajo el nombre "Genentech Delaware, Inc.", y posteriormente modificado.

El Certificado de Incorporación de la Corporación es por el presente reformulado y adicionalmente modificado, para leerlo en su integridad como sigue:

ARTÍCULO 1

El nombre de la Corporación es: Genentech Inc.

ARTÍCULO 2

La dirección del domicilio social de la Corporación en el Estado de Delaware es Corporation Service Company, 1013 Centre Road, City of Wilmington, Condado de New Castle, Delaware 19805. El nombre de su agente registrado en tal dirección es Corporation Service Company.

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
13 SET 2007
PABLO MENDOZA BARAJAS
NOTARIO

ARTÍCULO 3

El objetivo social de la Corporación es llevar a cabo cualquier acto o actividad lícita para la cual puedan organizarse las corporaciones bajo la Ley Corporativa General del Estado de Delaware como la misma existe o cómo pueda modificarse de ahora en adelante ("Ley de Delaware").

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920

10

ARTICULO 4

SECCI0N 4.01. *Capital Accionario.* (a) La Corporación está autorizada para emitir dos clases de acciones a ser denominadas respectivamente, acción preferencial y

acción ordinaria. La cantidad total de acciones que la Corporación está autorizada para emitir es de cuatrocientos millones (400.000.000) de acciones. Cien millones (100.000.000) se denominarán acciones preferenciales, valor nominal $0.02 por acción ("**Acción Preferencial**"). Trescientos millones (300.000.000) se denominarán acciones ordinarias, valor nominal $0.02 por acción ("**Acción Ordinaria**") La Acción Ordinaria de la Corporación, será toda de una clase.

(b) El número de acciones autorizadas de cualquier clase o clases de acciones se puede aumentar o disminuir (pero no por debajo del número de acciones de las mismas, entonces circulación) mediante el voto afirmativo de una mayoría con poder de voto de la acciones en circulación de la Corporación tituladas para votar sobre ello, independiente de las disposiciones de la Sección 242(b)(2) de Ley de Delaware.

NOTARIA 13 DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
13 SET 2007

SECCION 4.02. *Acción ordinaria. (a) Emisión y Consideración.* Cualquiera Acción Ordinaria de tesorería o no emitida, puede emitirse para tal consideración según puede fijarse de acuerdo con la ley aplicable periódicamente por la Junta Directiva.

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

17

(b) *Dividendos*. Sujeto a los derechos de los titulares de las Acciones Preferenciales, los titulares de las Acciones Ordinarias tendrán derecho a recibir, cuando y cómo lo declare la Junta Directiva, de los recursos de la Corporación que por ley están disponibles para éllo, dividendos pagables o en dinero en efectivo, o en propiedades, o en acciones y los titulares de Acciones Preferenciales no tendrán derecho a participar de tales dividendos (a menos que la Junta Directiva lo disponga de otra manera mediante una resolución, estipulando la emisión de una serie de Acciones Preferenciales).

SECCI0N 4.03. *Acciones Preferenciales*

(a) Series y Límites de Variaciones entre las Series. Cualquier acción de tesorería o no emitida de Acciones Preferenciales puede emitirse periódicamente en una o más series para tal consideración, según puede fijarse periódicamente por la Junta Directiva. Antes de la emisión de alguna serie particular de Acciones Preferenciales, se debe registrar un certificado ante la Secretaría de Estado de Delaware manifestando la designación, derechos, privilegios, restricciones, y condiciones a ser adjuntas a las Acciones Preferenciales de tal serie y cualesquiera otros asuntos que sean requeridos, y la Junta Directiva fijará y determinará; y por la presente está expresamente facultada para fijar y determinar, en la manera prevista por la ley, los pormenores de las acciones de tal serie (en tanto que no sean inconsistente con las disposiciones de este Artículo 4 aplicables a todas las series de Acciones Preferenciales), incluído, pero no limitado a lo siguiente:

(i) la designación característica de tal serie y el número de acciones que constituirán la misma, cuya cantidad puede aumentarse (excepto cuando la Junta Directiva lo disponga de otra manera en la creación de tal serie) o

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA
13 SET 2007
PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO(A)

LEBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Miniusticia No. 0920

12

disminuirse (pero no por debajo del número de acciones de las mismas entonces circulantes) periódicamente mediante acción similar de la Junta Directiva.

(ii) la tasa anual de dividendos pagables sobre acciones de tal serie, las condiciones sobre las cuales tales dividendos serán pagables y la fecha desde cuando los dividendos serán acumulativos; en tal evento la Junta Directiva determinará qué dividendos serán acumulativos;

(iii) si tal serie tendrá derecho a voto, además de los derechos de votación proporcionados por la ley, y si es así, las condiciones de tales derechos a voto;

(iv) si tal serie tendrá privilegios de conversión y, en ese caso, los términos y condiciones de tal conversión, incluído, pero no limitado a, disposiciones para el ajuste de la tasa de conversión en tales eventos y en tal manera cómo lo determinará la Junta directiva;

(v) si o no, las acciones de tal serie serán redimibles y, en ese caso, los términos y condiciones de tal redención, incluso la fecha o fechas en o después de que ellas sean redimibles, y la cantidad pagable por acción en caso de redención, cuya cantidad puede variar bajo condiciones diferentes y en fechas diferentes de redención;

DEL NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
13 SET 2007
NOTARIO (E)

(vi) si tal serie tendrá un fondo de amortización para la redención o compra de acciones de esa serie y, en ese caso, las condiciones y cantidad de tal fondo de amortización;

(vii) los derechos de las acciones de tal serie en caso de liquidación voluntaria o involuntaria, disolución o liquidación de la Corporación, y los derechos de prioridad relativos, si los hay, de pago de acciones de esa serie; y

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

13

(viii) cualesquiera otros derechos relacionados preferencias y limitaciones de tal serie.

ARTÍCULO 5

SECCIÓN 5.01. *Modificación de los Estatutos por los Directores.* (a.) En apoyo y no en limitación a los poderes conferidos por el estatuto, la Junta Directiva está autorizada expresamente para formular, modificar, corregir, derogar, y rescindir los estatutos de la Corporación, sujeto a las Secciones 5.01(b) y 5.01(c) del presente.

(b) Las secciones 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.03(b), 3.04, 3.05, 3.14, y 5.06, de los estatutos sólo pueden ser modificados, corregidos, derogados, o rescindidos mediante el voto afirmativo de los titulares de capital accionario facultados para votar sobre ello y que representen más del 60% de las acciones tituladas para votación sobre las mismas.

(c) Las secciones 3.03(c) y 3.15 de los estatutos solo pueden modificarse, corregirse, derogarse, o rescindirse, mediante el voto afirmativo de los titulares de capital accionario titulados para votar sobre ello, y que representen más del 90% de las acciones tituladas para votación sobre las mismas.

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
13 SET 2007
PABLO MARIN

SECCIÓN 5.02. *Modificación del Certificado de Incorporación.* La sección 5.01 (b) de este Certificado de Incorporación sólo puede modificarse, corregirse, derogarse, o rescindirse, mediante el voto afirmativo de los titulares de capital accionario facultado para Votar sobre ella, que representen más del 60% de

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

las acciones tituladas para ser votado sobre ello. La sección 5.01 (c) y los Artículos 8 y 9 de este Certificado de Incorporación sólo pueden modificarse, corregirse, derogarse, o rescindirse mediante el voto afirmativo de los titulares de capital accionario facultado para votar sobre ello, que representen más del 90% de las acciones tituladas para ser votado sobre ello.

ARTÍCULO 6

SECCIÓN 6.01 - *Elección de Directores por los Titulares de Acciones Preferenciales.*

Durante cualquier período cuando los titulares de alguna Acción Preferencial o una o más series de las mismas, votando como una clase, sean titulados para elegir un número específico de directores, por razón de dividendos vencidos u otras disposiciones otorgándoles el derecho para hacerlo, entonces y durante ese periodo de tiempo mientras continúe el derecho (i) el entonces autorizado número de directores se aumentará por tal número especificado de directores, y los titulares de tales Acciones Preferenciales o tal serie de las mismas, votando como una clase, se facultarán para elegir a los directores adicionales previstos, de conformidad con las disposiciones de tal Acción Preferencial o serie; (ii) cada director adicional desempeñará el cargo durante tal término y tendrá tales poderes de votación como sea expresado en las disposiciones relacionadas con las Acciones Preferenciales o serie; y (iii) cuando los titulares de alguna Acción Preferencial o serie de las mismas son despojados de tales derechos para elegir un número específico de directores, votando como una clase, conforme a las disposiciones de tal Acción Preferencial o serie, los periodos del cargo de todos los directores elegidos por los titulares de Acciones Preferenciales o serie, votando como una clase conforme a tales

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA CONCUERDA CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
17 ENE 2007
PABLO MENDEZ CARRAJAS
NOTARIO (E)

ILBARA. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Ministerio de Justicia No. 0920
Agosto de 1996

15

disposiciones, o eligieron llenar alguna vacante resultante de la muerte, dimisión o remoción de directores elegidos por los titulares de Acciones Preferenciales o serie, terminará inmediatamente y el número autorizado de directores por consiguiente, se reducirá.

SECCIÓN 6.02. *Papeletas de votación.* Las elecciones de directores en una asamblea anual o especial no necesitan ser mediante papeletas escritas, a menos que los estatutos de la Corporación lo dispongan de otra manera.

SECCIÓN 6.03. *Eliminación de Cierta obligación Personal de los Directores.* (a.) Un director de la Corporación no será responsable ante la Corporación o ante sus accionistas por los daños y perjuicios por contravención de deberes fiduciarios monetarios como director, hasta el punto máximo permitido por la Ley de Delaware.

(b) Cada persona (y los herederos, ejecutores o administradores de tal persona) quién era o es una parte o es amenazada ser hecha una parte a, o está involucrada en alguna amenaza, pendiente o a cumplirse de acción, demanda o procedimiento, sea civil, penal, administrativo o investigativo, por causa del hecho que tal persona es o fue un director de la Corporación, o es o estuvo desempeñando un cargo a petición de la Corporación como un director de otra corporación, sociedad, empresa conjunta, fideicomiso u otra empresa, será indemnizada y será exonerada de responsabilidad por la Corporación, hasta el punto máximo permitido por la Ley de Delaware - El derecho a indemnización conferida en esta Sección 6.03 también incluirá el derecho a ser pagado por la Corporación por los gastos incurridos en relación con cualquiera de tales

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA, D.C. CERTIFICA QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
13 SET 2007
PABLO MENDEZ CARVAJAL

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

procedimientos, anticipadamente a la disposición final, hasta el máximo punto autorizado por la Ley de Delaware. El derecho a indemnización conferida en esta Sección 6.03 será un derecho contractual.

(c) La Corporación puede, mediante la acción de su Junta Directiva, proporcionar la indemnización a tales funcionarios, empleados y agentes de la Corporación hasta el alcance y hasta tal efecto como lo determine la Junta Directiva que sea apropiado y autorizado por la Ley de Delaware.

(d) La Corporación tendrá la facultad para adquirir y mantener seguros en nombre de cualquier persona que es o fue director, funcionario, empleado o agente, de la Corporación o es o estuvo desempeñando un cargo a petición de la Corporación como director, funcionario, empleado o agente, de otra corporación, sociedad, empresa conjunta, fiduciaria u otra empresa; contra cualquier gasto, obligación o pérdida, incurrida por tal persona en cualquier capacidad o surgida de su status como tal, la Corporación tuviera o no la facultad para indemnizarlo contra tal obligación bajo la Ley de Delaware.

(e) Los derechos y autoridad conferidos en esta Sección 6.03 no serán excluyentes de cualquier otro derecho el cual cualquier persona de otra manera pudiera tener o adquirir de ahora en adelante.

(f) Ni la modificación, corrección, derogación o rescisión de esta Sección 6.03, ni la adopción de cualquier provisión de este Certificado de Incorporación o los Estatutos de la Corporación, tampoco, al alcance máximo permitido por la Ley de Delaware, cualquier modificación legal, eliminará o reducirá el efecto de esta Sección 6.03 con respecto de cualesquier actos u omisiones que ocurran antes de tal modificación, corrección, derogación, rescisión, adopción o modificación.

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
13 SET 2007

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

17

ARTÍCULO 7

SECCION 7.01. *Sección 203 de Ley de Delaware*. La Corporación por el presente, elige no ser regida por la Sección 203 de Ley de Delaware.

ARTÍCULO 8

SECCIÓN 8.01. *Relación con Roche*. En anticipación a que la Corporación deje de ser una subsidiaria totalmente propiedad de Roche Holdings, Inc., pero que Roche (como se definió en la Sección 8.05) siga siendo accionista de la Corporación, y en anticipación a que la Corporación (como se definió en la sección 8.05) y Roche puedan involucrarse en similares o en las mismas actividades o líneas comerciales y tengan interés en las mismas áreas de oportunidades corporativas, y en reconocimiento de (i) los beneficios a ser derivados por la Corporación a través de sus continuas relaciones contractuales, corporativas y comerciales con Roche (incluyendo el servicio de funcionarios y directores de Roche como directores de la Corporación) y (ii) las dificultades inherentes a cualquier director quien desea y se esfuerza plenamente para satisfacer tales obligaciones fiduciarias del director, en la determinar el alcance total de tales obligaciones en una situación particular, las disposiciones de este Artículo 8 son expresadas para regular, definir y guiar la conducta de ciertos negocios de la Corporación por cuanto ellos pueden involucrar a Roche y a sus funcionarios y directores, y las facultades, derechos obligaciones y responsabilidades de la Corporación y sus funcionarios, directores y accionistas en conexión con las mismas.

SECCIÓN 8.02. *Actividades Comerciales Similares*. Excepto que Roche Holdings, Inc - pueda de otro modo aceptar por escrito.

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA CORRESPONDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
13 SET 2007
PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

(a) Roche no tendrá una obligación de abstenerse, de comprometerse directa o indirectamente, en las mismas o similares actividades comerciales o líneas comerciales como la Corporación, y

(b) ni Roche ni ningún funcionario o director del mismo serán responsables ante la Corporación o ante sus accionistas por la trasgresión de cualquier deber fiduciario por causa de cualquiera de tales actividad de Roche o de la participación en ello de tal persona.

En caso que Roche tenga conocimiento de una transacción potencial o materia que pueda ser una oportunidad corporativa para Roche y la Corporación;

Roche no tendrá el deber de comunicar u ofrecer tal oportunidad corporativa a la Corporación y no será responsable ante la Corporación o ante sus accionistas por la trasgresión de cualquier deber fiduciario como accionista de la Corporación o persona controladora de un accionista por el hecho que Roche prosiga o adquiera tal oportunidad corporativa para sí misma, dirija tal oportunidad corporativa a otra persona o entidad o no comunique la información referente, o no ofrezca tal oportunidad corporativa a la Corporación.

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA ANTERIOR ES FIEL Y EXACTA A LA QUE HE TENIDO A LA VISTA
13 SET 2007
PABLO [illegible] PARRADO
NOTARIO

SECCIÓN 8.03. *Oportunidades Corporativas*. En caso que un director, funcionario o empleado de la Corporación que también es director, funcionario o empleado de Roche, tenga conocimiento de una transacción potencial o material que pueda ser una oportunidad corporativa para la Corporación y Roche (si tal transacción potencial o material es propuesta por un tercero o es concebida por tal director, funcionario o empleado de la Corporación), tal director, funcionario o empleado tendrá el privilegio de ofrecer tal oportunidad corporativa a la Corporación o a Roche, según tal director, funcionario o

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

empleado, lo juzgue apropiado bajo las circunstancias y a su entera discreción; y ningún director, funcionario o empleado, será responsable ante la Corporación o ante sus Accionistas por la infracción de cualquier deber fiduciario o deber de lealtad o falta de actuar en (o no opuesto a) los mejores intereses de la Corporación o la derivación de cualquier beneficio personal impropio por causa del hecho que (i) tal director, funcionario o empleado, ofreció tal oportunidad corporativa a Roche (en lugar de la Corporación) o no comunicó la información referente a tal oportunidad corporativa a la Corporación o (ii) Roche prosigue o adquiere tal oportunidad corporativa para sí mismo o dirige tal oportunidad corporativa a otra persona o no comunica la información referente a tal oportunidad corporativa a la Corporación.

SECCIÓN 8.04. *Consentimiento Implícito de los Accionistas.* Cualquier persona o entidad comprando o adquiriendo algún interés en cualquier acción del capital accionario de la Corporación será considerada que ha tenido aviso de y ha consentido a las disposiciones de este Artículo 8.

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
13 SET 2007
PABLO MENDEZ BARRAJAS
NOTARIO (E)

SECCIÓN 8.05. *Definiciones.* Para los propósitos de este Artículo 8 y Artículo 9 solamente, (i) el término "**Corporación**" significará la Corporación y todas las corporaciones, sociedades, empresas conjuntas, asociaciones y otras entidades en las cuales la Corporación posea beneficiosamente (directa o indirectamente) cincuenta por ciento o más de las acciones votantes en circulación, poder de voto o intereses de votación similares, y (ii) el término "**Roche**" significará Roche Holdings, Inc. y todas las corporaciones, sociedades, empresas conjuntas , asociaciones y otras entidades (diferentes de la

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

20

Corporación, definida de acuerdo con la cláusula (i) de esta Sección 8.05) que son las "**afiliadas**" (como se definió en la Norma 12b-2 bajo las Leyes de la Bolsa de Valores (Securities Exchange) de 1934, (según enmienda) de Roche Holdings. Inc.

SECCIÓN 8.06. *Terminación: Efecto Vinculante*. No obstante algo al contrario en este Certificado de Incorporación, las disposiciones anteriores de este Artículo 8 expirarán en la fecha cuando Roche deje de poseer Acciones Ordinarias que representen por lo menos el 5% del número de acciones circulantes de Acciones Ordinarias de la Corporación y ninguna persona que siendo director o funcionario de la Corporación, sea también director o funcionario de Roche. Tampoco tal expiración, ni la modificación, corrección, cambio o derogación, de cualquier provisión de este Artículo 8, tampoco la adopción de cualquier provisión de este Certificado de Incorporación Enmendado y Reformulado, inconsistente con cualquier provisión de este Artículo 8, eliminará o reducirá el efecto de este Artículo 8 con respecto de cualquier asunto que ocurra o cualquier causa de acción, demanda o reivindicación que, pero para este Artículo 8°, se acumularía o surgiera, antes de tal expiración, modificación, corrección, revocación o adopción.

EL SUSCRITO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA, HACE CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
13 SET 2007
PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO

SECCIÓN 8.07. *Artículo 9.* Las disposiciones de este Artículo 8 son adiciones a las disposiciones del Artículo 9.

ARTÍCULO 9

SECCIÓN 9.01. *Acuerdos no Invalidados*. Ningún contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier corrección, modificación o terminación de ellos) entre

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0923
Agosto de 1996

la Corporación y Roche será inválido, nulo o anulable, solamente por la razón que Roche es una de las partes de ellos o solamente porque algunos directores o funcionarios de la Corporación quienes están afiliados con Roche, están presentes en o participan en la asamblea de la Junta Directiva o comité de los mismos, lo cual autoriza el contrato, acuerdo, arreglo, transacción, corrección, modificación o terminación, o solamente porque su o sus votos se cuentan para tal propósito; pero tal contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o cualquier corrección, modificación o terminación de los mismos) se regirá por las disposiciones de estos Estatutos de la Corporación Modificados y Reformulados, los Estatutos de la Corporación, la Ley de Delaware y alguna otra ley aplicable. Para los propósitos de este Artículo 9, las expresiones la "**Corporación**" y "**Roche**" tienen los significados manifestados en la Sección 8.05.

SECCIÓN 9.02. *Quórum.* Los Directores de la Corporación que también son directores o funcionarios de Roche pueden ser contabilizados en la determinación de la presencia de un quórum en una asamblea de la Junta Directiva o de un comité que autoriza o aprueba algún contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o corrección, modificación o terminación del mismo). Las Acciones Circulantes Ordinarias poseídas por Roche pueden contabilizarse para la determinación de la presencia de un quórum en una asamblea de accionistas que autoriza o aprueba cualquier contrato, acuerdo, arreglo o transacción (o corrección, modificación o terminación del mismo).

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO
DE PICHINCHA CERTIFICO QUE ESTA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA
13 SET 2001
PABLO MENDEZ BARRIAS
NOTARIO (E)

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

22

SECCIÓN 9.03 - *Ninguna Responsabilidad Por Actividades de Buena Fe.* Roche ni cualquier funcionario o director será responsable ante la Corporación o ante los accionistas para la infracción de cualquier deber fiduciario o deber de lealtad o falta para actuar en (o no opuesto a) los mejores intereses de la Corporación o la derivación de cualquier beneficio personal impropio por el hecho de que Roche o algún funcionario o director del mismo, emprende cualquier acción o ejerce algunos derechos o entrega o retiene de buena fe cualquier aprobación en relación con cualquier acuerdo o contrato entre Roche y la Corporación. Ningún voto sufragado u otra acción tomada por alguna persona que es director, funcionario u otro representante de Roche, cuyo voto es sufragado o tal persona emprende una acción en su capacidad como director de esta Corporación, constituirá una acción de o el ejercicio de un derecho por o un consentimiento de Roche para los efectos de algún acuerdo o contrato.

SECCIÓN 9.04. *Consentimiento Implícito de los Accionistas.* Cualquier persona o entidad comprando o adquiriendo algún interés en cualquier acción del capital accionario de la Corporación será considerada que ha tenido aviso de y ha consentido a las disposiciones de este Artículo 9.

EL SUSCRITO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
13 SET 2007
PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

SECCIÓN 9.05 - *Contratos Protegidos.* Para los propósitos de este Artículo 9, cualquier contrato, acuerdo, arreglo o transacción con la Corporación o con cualquier corporación, sociedad, empresa conjunta, asociación u otra entidad en la cual la Corporación posea beneficios (directa o indirectamente) del cincuenta por ciento o más de la acciones votantes en circulación, poder de

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

voto o intereses de votación similares, se juzgará ser un contrato, acuerdo, arreglo o transacción con la Corporación.

SECCIÓN 9.06. *Efecto Vinculante.* Ni la modificación, corrección, cambio o derogación de cualquier provisión de este Artículo 9, tampoco la adopción de cualquier provisión inconsistente con cualquier provisión de este Artículo 9, eliminará o reducirá el efecto de este Artículo 9 con respecto de cualquier asunto que ocurra o cualquier causa de acción, demanda o reivindicación que, pero para este Artículo 9, se acumulara o surgiera, antes de tal alteración, modificación, cambio, revocación o adopción.

SECCIÓN 9.07. *Artículo 8.* Las disposiciones de este Artículo 9 son en adición a las disposiciones del Artículo 8.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, este Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado, habiendo sido debidamente adoptado de acuerdo con las Secciones 242 y 245 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware y por el consentimiento escrito del único accionista de la Corporación de acuerdo con la Sección 228 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware, ha sido otorgado este día veintidós (22) de Julio 1999.

DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
13 SET 200

GENENTECH, INC.
Por: /s/ Stephen G. Juelsgaard
Nombre: Stephen G. Juelsgaard
Título; Vicepresidente Senior.
Asesor General y Secretario.

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

Traducción Oficial Nº 10-31-194

Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en Inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ilbar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.

APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 1961)

1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. El presente Documento Público ha sido firmado por: Harriet Smith Windsor
3. actuando en calidad de: Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello y estampilla del Despacho del Secretario de Estado

CERTIFICADO

5. en Dover, Delaware
6. el día siete (7) de Octubre, año 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado Delaware
8. Número: **0265284**
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (Ilegible)

Secretario de Estado

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE SE TENIDO A LA VISTA
SET 2007
PABLO MENDEZ RAFAEL
NOTARIO

N. del T.: hay un sello dorado, seco, en relieve: "Secretary's Office - Delaware"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920

20

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

174488

2005 OCT 31 A 10:59

Ilbar Espeinol

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

PÁBLO MEJÍA

13 SET 2007

NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA

DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE EL DOCUMENTO ADJUNTO ES UNA COPIA FIEL Y VERDADERA DEL CERTIFICADO DE MODIFICACION DE "GENENTECH, INC.", REGISTRADO EN ESTE DESPACHO EL DIA QUINCE (15) DE MAYO DEL AÑO 2000, A LAS 5:00 P.M.

Firma (ilegible)

Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

AUTENTICACION: 4212781 FECHA: 10-07-05

N. del T. Hay un sello dorado, en relieve: "Secretary´s Office, Delaware"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA

11 SET 2007

PABLO MENDEZ P.
NOTARIO

ESTADO DE DELAWARE
SECRETARIA DE ESTADO
DIVISIÓN DE CORPORACIONES
ARCHIVADO 05:00 PM 05/15/2000
001245251 – 2112549

CERTIFICADO DE MODIFICACION DEL CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN MODIFICADO Y REFORMULADO

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y en virtud de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware.

POR LA PRESENTE CERTIFICA:

PRIMERO: Que en una asamblea de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente las resoluciones expresando una propuesta modificación al Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado de dicha corporación, declarando que dicha modificación era aconsejable y convocando una asamblea de los accionistas de dicha corporación para la consideración de ello. La resolución expresando la propuesta modificación es la siguiente:

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
13 SET 2007
NOTARIO (E)

RESUELTO, que el Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado de esta corporación se modifique cambiando "Sección 4.01 (a)" del Artículo número "4" para que una vez modificada dicha Sección y dicho Artículo se lea como sigue:

"Sección 4.01. *Capital Accionario*. (a) La Corporación está autorizada para emitir dos clases de acciones a ser denominadas: acción preferencial y acción ordinaria, respectivamente. La cantidad total de acciones que la Corporación está autorizada para emitir es de setecientos millones

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920

(700.000.000) de acciones. Cien millones (100.000.000) se denominarán acciones preferenciales, con un valor nominal de $0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Seiscientos millones (600.000.000) se denominarán acciones ordinarias, con un valor nominal de $0.02 por acción ("Acción Ordinaria"). La Acción ordinaria de la Corporación será toda de una clase."

SEGUNDO: Que posteriormente, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la asamblea regular de los accionistas de la corporación fue debidamente convocada y notificada de acuerdo con la Sección 222 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware, en cuya asamblea el número necesario de acciones requeridas por los estatutos votó a favor de la modificación.

TERCERO: Que dicha modificación se adoptó debidamente de acuerdo con las disposiciones de la Sección 242 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de la corporación no se reducirá bajo o por causa de dicha modificación.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicho Genentech, Inc. ha ordenado que este Certificado de Modificación sea suscrito por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este día quince (15) de Mayo, año 2000.

GENENTECH, INC.

Por: (firma ilegible)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente Senior, Asesor General y Secretario.

EL SUSCRITO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTÁ, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
13 SET 2007
PABLO [illegible] BARAJAS
NOTARIO (E)

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Miniusticia No. 0920

28

Traducción Oficial Nº 10-31-195

Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en Inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ilbar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.

APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 1961)

1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. El presente Documento Público ha sido firmado por: Harriet Smith Windsor
3. actuando en calidad de: Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello y estampilla del Despacho del Secretario de Estado

CERTIFICADO

5. en Dover, Delaware
6. el día siete (7) de Octubre, año 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado Delaware
8. Número: **0265285**
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (Ilegible)

Secretario de Estado

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
13 SET 2007
PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

N. del T.: hay un sello dorado, seco, en relieve: "Secretary´s Office - Delaware"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920

29

DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE EL DOCUMENTO ADJUNTO ES UNA COPIA FIEL Y VERDADERA DEL CERTIFICADO MODIFICADO DE "GENENTECH, INC.", REGISTRADO EN ESTE DESPACHO EL DIA DIEZ (10) DE MAYO DEL AÑO 2001, A LAS 2:05 P.M.

Firma: Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

AUTENTICACION: 4212782 FECHA: 10-07-05

N. del T. Hay un sello dorado, en relieve: "Secretary's Office – Delaware"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA, DAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE ME FUE PRESENTADO A LA VISTA

13 SET 2007

PABLO MENDEZ CARAJAS
NOTARIO (E)

ESTADO DE DELAWARE
SECRETARIA DE ESTADO
DIVISIÓN DE CORPORACIONES
ARCHIVADO 02:05 PM 05/10/2001
010226224 – 2112549

CERTIFICADO DE MODIFICACION
DEL CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN MODIFICADO Y REFORMULADO

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y en virtud de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware.

POR LA PRESENTE CERTIFICA:

PRIMERO: Que en una asamblea de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente las resoluciones expresando una propuesta modificación al Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado de dicha corporación, declarando que dicha modificación era aconsejable y convocando una asamblea de los accionistas de dicha corporación para la consideración de ello. La resolución expresando la propuesta modificación es la siguiente:

RESUELTO, que el Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado de esta corporación se modifique cambiando "Sección 4.01" del Artículo numero "4" para que una vez modificada dicha Sección y dicho Artículo se lea como sigue:

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA PRESENTE COPIA ES FIEL Y EXACTA CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
13 SET 2007
PABLO MAYOR CARAJAS

"Sección 4.01. *Capital Accionario*. (a) La Corporación está autorizada para emitir dos clases de acciones a ser denominadas: acción preferencial y acción ordinaria, respectivamente. La cantidad total de acciones que la Corporación está autorizada para emitir es de mil trescientos millones

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920

(1.300.000.000) de acciones. Cien millones (100.000.000) se denominarán acciones preferenciales, con un valor nominal de $0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Un mil doscientos millones (1.200.000.000) se denominarán acciones ordinarias, con un valor nominal de $0.02 por acción ("Acción Ordinaria"). La Acción Ordinaria de la Corporación será toda de una clase."

SEGUNDO: Que posteriormente, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la asamblea regular de los accionistas de la corporación fue debidamente convocada y notificada de acuerdo con la Sección 222 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware, en cuya asamblea el número necesario de acciones requeridas por los estatutos votó a favor de la modificación.

TERCERO: Que dicha modificación se adoptó debidamente de acuerdo con las disposiciones de la Sección 242 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de la corporación no se reducirá bajo o por causa de dicha modificación.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicho Genentech, Inc. ordenado que este Certificado de Modificación sea suscrito por Stephen G. Juelsgaard, un Funcionario Autorizado, este día diez (10) de Mayo, año 2001.

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO
EL SUSCRITO HACE CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA
13 SET 2007

GENENTECH, INC.

Por: (firma ilegible)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente Senior, Asesor General y Secretario.

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Ministerio de Justicia No. 0920

32

Traducción Oficial Nº 10-31-196

Traducción Oficial de un documento escrito originalmente en Inglés, el cual para identificación lleva el sello de Ilbar A. Español Español, Traductor e Intérprete Oficial, según Resolución # 0920, 1996 del Ministerio de Justicia, República de Colombia.

APOSTILLA

(Convención de la Haya Octubre 1961)

1. País: ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
2. El presente Documento Público ha sido firmado por: Harriet Smith Windsor
3. actuando en calidad de: Secretaria de Estado de Delaware
4. lleva el sello y estampilla del Despacho del Secretario de Estado

CERTIFICADO

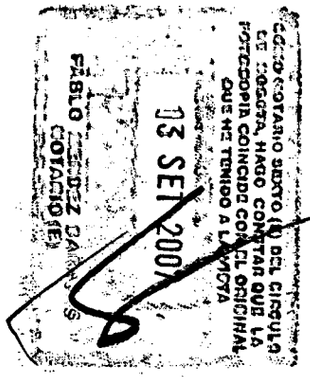
5. en Dover, Delaware
6. el día siete (7) de Octubre, año 2005
7. por el Secretario de Estado, Departamento de Estado Delaware
8. Número: **0265286**
9. Sello/Estampilla
10. Firma: (Ilegible)

Secretario de Estado

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
13 SET 2007
PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

N. del T.: hay un sello dorado, seco, en relieve: "Secretary´s Office - Delaware"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996



MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

174490

Jlbar Español

CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPEÑA LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 OCT 31 A 11:00

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

DELAWARE

EL PRIMER ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIA DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, POR EL PRESENTE CERTIFICO QUE EL DOCUMENTO ADJUNTO ES UNA COPIA FIEL Y VERDADERA DEL CERTIFICADO MODIFICADO DE "GENENTECH, INC.", REGISTRADO EN ESTE DESPACHO EL DIA DIEZ Y SEIS (16) DE ABRIL DEL AÑO 2004, A LAS 7:39 P.M.

Firma: Harriet Smith Windsor, Secretaria de Estado

AUTENTICACION: 4212783 FECHA: 10-07-05

N. del T. Hay un sello dorado, en relieve: "Secretary's Office – Delaware"

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Minjusticia No. 0920
Agosto de 1996

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
13 SET 2007
PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

ESTADO DE DELAWARE
SECRETARIA DE ESTADO
DIVISIÓN DE CORPORACIONES
ARCHIVADO 07:39 PM 04/16/2004
040281669 – 2112549

CERTIFICADO DE TERCERA MODIFICACION
DEL CERTIFICADO DE INCORPORACIÓN MODIFICADO Y REFORMULADO

Genentech, Inc. una corporación organizada y existente bajo y en virtud de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware.

POR LA PRESENTE CERTIFICA:

PRIMERO: Que en una asamblea de la Junta Directiva de Genentech, Inc. se adoptaron debidamente las resoluciones expresando una propuesta modificación al Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado de dicha corporación, declarando que dicha modificación era aconsejable y convocando una asamblea de los accionistas de dicha corporación para la consideración de ello. La resolución expresando la propuesta modificación es la siguiente:

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
SEP 1 2007
PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

RESUELTO, que el Certificado de Incorporación Modificado y Reformulado de esta corporación se modifique cambiando "Sección 4.01 (a)" del Artículo número "4" para que una vez modificada dicha Sección y dicho Artículo se lea como sigue:

"Sección 4.01. *Capital Accionario.* (a) La Corporación está autorizada para emitir dos clases de acciones a ser denominadas: acción preferencial y acción ordinaria, respectivamente. La cantidad total de acciones que la Corporación está autorizada para emitir es de tres mil cien millones

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Miniusticia No. 0920

35

(3.100.000.000) de acciones. Cien millones (100.000.000) se denominarán acciones preferenciales, con un valor nominal de $0.02 por acción ("Acción Preferencial"). Tres mil millones (3.000.000.000) se denominarán acciones ordinarias, con un valor nominal de $0.02 por acción ("Acción Ordinaria"). La Acción Ordinaria de la Corporación será toda de una clase."

SEGUNDO: Que posteriormente, de acuerdo con la resolución de su Junta Directiva, la asamblea regular de los accionistas de la corporación fue debidamente convocada y notificada de acuerdo con la Sección 222 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware, en cuya asamblea el número necesario de acciones requeridas por los estatutos votó a favor de la modificación.

TERCERO: Que dicha modificación se adoptó debidamente de acuerdo con las disposiciones de la Sección 242 de la Ley Corporativa General del Estado de Delaware.

CUARTO: Que el capital de la corporación no se reducirá bajo o por causa de dicha modificación.

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, dicho Genentech, Inc. ha ordenado que este Certificado de Modificación sea suscrito por Stephen G. Juelsgaard, Funcionario Autorizado, este día diez y seis (16) de Abril, año 2004.

GENENTECH, INC.

Por: (firma ilegible)

Nombre: Stephen G. Juelsgaard

Título: Vicepresidente Senior, Asesor General y Secretario.

NOTARIA 13 DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA PRESENTE FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE ME FUE PRESENTADO A LA VISTA
13 SET 2007
PABLO MENDEZ PEÑARANDA
NOTARIO (E)

ILBAR A. ESPAÑOL ESPAÑOL
Traductor e Interpetre Oficial
Inglés Español Inglés
Resolución Miniusticia No. 0920

State of California

SECRETARY OF STATE

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. *Country: United States of America*
   This public document
2. *has been signed by TERI LEE*
3. *acting in the capacity of Notary Public, State of California*
4. *bears the seal/stamp of TERI LEE, Notary Public, State of California*

CERTIFIED

5. *At Sacramento, California*
6. *the 3rd day of October 2005*
7. *by Deputy Secretary of State, State of California*
8. *No. 258054*
9. *Seal/Stamp:*

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA

13 SET 2007

PABL MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

10. *Signature*

Secretary of State

OFFICE OF THE SECRETARY OF STATE

NP-24 A (REV. 4-05)

BY

OSP 05 90772

CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California
County of San Mateo } ss.

On 9/13/2005 (Date) before me, Teri Lee, Notary Public (Name and Title of Officer (e.g., "Jane Doe, Notary Public"))

personally appeared Timothy R. Schwartz (Name(s) of Signer(s))

☒ personally known to me
☐ proved to me on the basis of satisfactory evidence

to be the person(s) whose name(s) is/~~are~~ subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/~~they~~ executed the same in his/~~her/their~~ authorized capacity(~~ies~~), and that by his/~~her/their~~ signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) ~~acted~~, executed the instrument.

WITNESS my hand and official seal.

Signature of Notary Public

TERI LEE
Commission # 1514234
Notary Public - California
San Mateo County
My Comm. Expires Sep 18, 2008

OPTIONAL

Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document: Colombia Power

Document Date: 9/13/2005 Number of Pages: 1

Signer(s) Other Than Named Above: None

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
13 SET 2007
RIGHT THUMBPRINT OF SIGNER
Top of thumb here
MELINDA BARAJAS
NOTARIO (E)

Capacity(ies) Claimed by Signer

Signer's Name: _____

☐ Individual
☐ Corporate Officer — Title(s): _____
☐ Partner — ☐ Limited ☐ General
☐ Attorney-in-Fact
☐ Trustee
☐ Guardian or Conservator
☐ Other: _____

Signer Is Representing: _____

© 1999 National Notary Association • 9350 De Soto Ave., P.O. Box 2402 • Chatsworth, CA 91313-2402 • www.nationalnotary.org Prod. No. 5907 Reorder: Call Toll-Free 1-800-876-6827

Los abajo firmados,

GENENTECH, INC.
Una sociedad organizada y existente bajo las leyes del Estado de Delaware Estados Unidos de America.

con domicilio en

1 DNA way
South San Francisco, CA 94080, USA

nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogoté, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado a los 13 dias de Sep. 2005

Timothy R. Schwartz, Ph.D.
Section Patent Counsel
Genentech, Inc.
Authorized Corporate Signatory

The undersigned,

Genentech, Inc
A Corporate organized and existing under the laws od State of Delaware, E.U.A

domiciled at

1 DNA Way
South San Francisco, CA 94080, USA

hereby appoint, ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, of Bogota, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

We also authorize doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

Given and signed this 13 Sept 2005

NOTA RY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE

See attached.

COPIA DE LA NOTARIA DEL CIRCULO DE BOGOTA. HAGO CONSTAR QUE LA PRESENTE COPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE TUVE A LA VISTA
13 SET 2007
ALBA MENDEZ BARAJAS

(2)

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. *Country: United States of America*

This public document:

2. *has been signed by Harriet Smith Windsor*

3. *acting in the capacity of Secretary of State of Delaware*

4. *bears the seal/stamp of Office of Secretary of State*

Certified

5. *at Dover, Delaware*

6. *the seventh day of October, A.D. 2005*

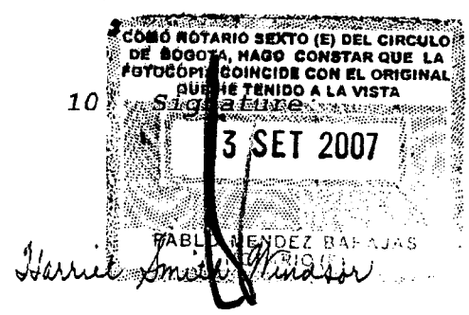
7. *by Secretary of State, Delaware Department of State*

8. *No. 0265282*

9. *Seal/Stamp:*



10 *Signature:*



Harriet Smith Windsor

Secretary of State

Delaware

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY "GENENTECH, INC." IS DULY INCORPORATED UNDER THE LAWS OF THE STATE OF DELAWARE AND IS IN GOOD STANDING AND HAS A LEGAL CORPORATE EXISTENCE SO FAR AS THE RECORDS OF THIS OFFICE SHOW, AS OF THE SEVENTH DAY OF OCTOBER, A.D. 2005.

AND I DO HEREBY FURTHER CERTIFY THAT THE SAID "GENENTECH, INC." WAS INCORPORATED ON THE TWENTY-THIRD DAY OF DECEMBER, A.D. 1986.

AND I DO HEREBY FURTHER CERTIFY THAT THE ANNUAL REPORTS HAVE BEEN FILED TO DATE.

AND I DO HEREBY FURTHER CERTIFY THAT THE FRANCHISE TAXES HAVE BEEN PAID TO DATE.

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA

13 SET 2007

PABLO [illegible]

SECRETARY'S OFFICE DELAWARE

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

2112549

050823723

AUTHENTICATION: 4212779

DATE: 10-07-05

(3)

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. *Country: United States of America*

This public document:

2. *has been signed by Harriet Smith Windsor*

3. *acting in the capacity of Secretary of State of Delaware*

4. *bears the seal/stamp of Office of Secretary of State*

Certified

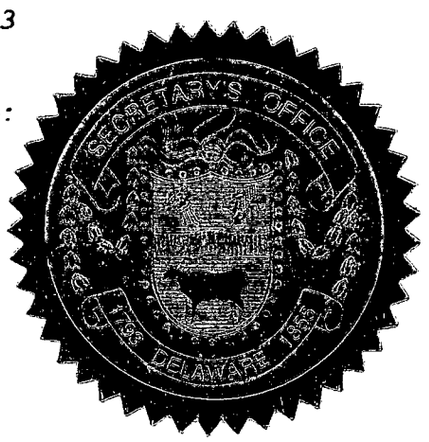
5. *at Dover, Delaware*

6. *the seventh day of October, A.D. 2005*

7. *by Secretary of State, Delaware Department of State*

8. *No. 0265283*

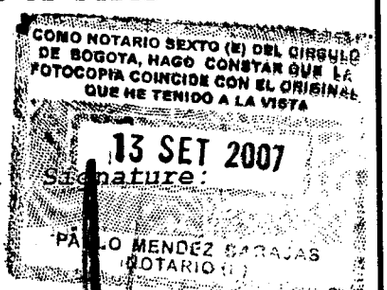
9. *Seal/Stamp:*



10. *Signature:*

Harriet Smith Windsor

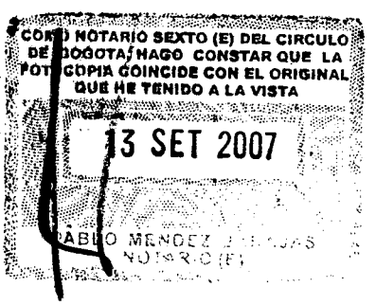
Secretary of State



Delaware

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE RESTATED CERTIFICATE OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE TWENTY-SECOND DAY OF JULY, A.D. 1999, AT 9 O'CLOCK A.M.





Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

2112549

050823723

AUTHENTICATION: 4212780

DATE: 10-07-05

AMENDED AND RESTATED

CERTIFICATE OF INCORPORATION

GENENTECH, INC.

Genentech, Inc. (the "**Corporation**"), a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware, does hereby amend the Certificate of Incorporation of the Corporation, which was originally filed on December 23, 1986 under the name "Genentech Delaware, Inc.", and subsequently amended.

The Certificate of Incorporation of the Corporation is hereby restated and further amended to read in its entirety as follows:

ARTICLE 1

The name of the Corporation is: Genentech, Inc.

ARTICLE 2

The address of the registered office of the Corporation in the State of Delaware is Corporation Service Company, 1013 Centre Road, City of Wilmington, County of New Castle, Delaware 19805. The name of its registered agent at such address is Corporation Service Company.

ARTICLE 3

The purpose of the Corporation is to engage in any lawful act or activity for which corporations may be organized under the General Corporation Law of the State of Delaware as the same exists or may hereafter be amended ("**Delaware Law**").

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA

13 SET 2007

PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

STATE OF DELAWARE
SECRETARY OF STATE
DIVISION OF CORPORATIONS
FILED 09:00 AM 07/22/1999
991302331 - 2112549

ARTICLE 4

SECTION 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is four hundred million (400,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value $0.02 per share ("**Preferred Stock**"). Three hundred million (300,000,000) shares shall be designated common stock, par value $0.02 per share ("**Common Stock**") The Common Stock of the Corporation shall be all of one class.

(b) The number of authorized shares of any class or classes of stock may be increased or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) by the affirmative vote of a majority in voting power of the outstanding stock of the Corporation entitled to vote thereon irrespective of the provisions of Section 242(b)(2) of Delaware Law.

SECTION 4.02. *Common Stock.* (a) *Issuance and Consideration.* Any unissued or treasury shares of the Common Stock may be issued for such consideration as may be fixed in accordance with applicable law from time to time by the Board of Directors.

(b) *Dividends.* Subject to the rights of holders of the Preferred Stock, the holders of the Common Stock shall be entitled to receive, when and as declared by the Board of Directors, out of the assets of the Corporation which are by law available therefor, dividends payable either in cash, in property, or in shares of stock and the holders of the Preferred Stock shall not be entitled to participate in any such dividends (unless otherwise provided by the Board of Directors in any resolution providing for the issue of a series of Preferred Stock).

SECTION 4.03. *Preferred Stock.*

(a) *Series and Limits of Variations between Series.* Any unissued or treasury shares of the Preferred Stock may be issued from time to time in one or more series for such consideration as may be fixed from time to time by the Board of Directors. Before any shares of Preferred Stock of any particular series shall be issued, a certificate shall be filed with the Secretary of State of Delaware setting forth the designation, rights, privileges, restrictions, and conditions to be attached to the Preferred Stock of such series and such other matters as may be required, and the Board of Directors shall fix and determine, and is hereby expressly empowered to fix and determine, in the manner provided by law, the particulars of

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO
QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA
13 SET 2007
PABLO MENDEZ BARAONA

the shares of such series (so far as not inconsistent with the provisions of this Article 4 applicable to all series of Preferred Stock), including, but not limited to, the following:

(i) the distinctive designation of such series and the number of shares which shall constitute such series, which number may be increased (except where otherwise provided by the Board of Directors in creating such series) or decreased (but not below the number of shares thereof then outstanding) from time to time by like action of the Board of Directors;

(ii) the annual rate of dividends payable on shares of such series, the conditions upon which such dividends shall be payable and the date from which dividends shall be cumulative in the event the Board of Directors determines that dividends shall be cumulative;

(iii) whether such series shall have voting rights, in addition to the voting rights provided by law and, if so, the terms of such voting rights;

(iv) whether such series shall have conversion privileges and, if so, the terms and conditions of such conversion, including, but not limited to, provision for adjustment of the conversion rate upon such events and in such manner as the Board of Directors shall determine;

(v) whether or not the shares of such series shall be redeemable and, if so, the terms and conditions of such redemption, including the date or dates upon or after which they shall be redeemable, and the amount per share payable in case of redemption, which amount may vary under different conditions and at different redemption dates;

(vi) whether such series shall have a sinking fund for the redemption or purchase of shares of that series and, if so, the terms and amount of such sinking fund;

(vii) the rights of the shares of such series in the event of voluntary or involuntary liquidation, dissolution or winding up of the Corporation, and the relative rights of priority, if any, of payment of shares of that series; and

(viii) any other relative rights, preferences and limitations of such series.

(E) DEL CIRCULO
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA
17 OCT 2007
PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

ARTICLE 5

SECTION 5.01. *Amendment of Bylaws by Directors.* (a) In furtherance and not in limitation of the powers conferred by statute, the Board of Directors is expressly authorized to make, alter, amend, repeal and rescind the bylaws of the Corporation, subject to Sections 5.01(b) and 5.01(c) hereof.

(b) Sections 2.02, 3.02, 3.03(a), 3.03(b), 3.04, 3.05, 3.14, and 5.06 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 60% of the shares entitled to be voted thereon.

(c) Sections 3.03(c) and 3.15 of the bylaws may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 90% of the shares entitled to be voted thereon.

SECTION 5.02. *Amendment of Certificate of Incorporation.* Section 5.01(b) of this Certificate of Incorporation may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 60% of the shares entitled to be voted thereon. Section 5.01(c) and Articles 8 and 9 of this Certificate of Incorporation may only be altered, amended, repealed, or rescinded by the affirmative vote of holders of capital stock entitled to vote thereon representing more than 90% of the shares entitled to be voted thereon.

ARTICLE 6

SECTION 6.01. *Election of Directors by Holders of Preferred Stock.* During any period when the holders of any Preferred Stock or any one or more series thereof, voting as a class, shall be entitled to elect a specified number of directors, by reason of dividend arrearages or other provisions giving them the right to do so, then and during such time as such right continues (i) the then otherwise authorized number of directors shall be increased by such specified number of directors, and the holders of such Preferred Stock or such series thereof, voting as a class, shall be entitled to elect the additional directors so provided for, pursuant to the provisions of such Preferred Stock or series, (ii) each such additional director shall serve for such term, and have such voting powers, as shall be stated in the provisions pertaining to such Preferred Stock or series; and (iii) whenever the holders of any such Preferred Stock or series thereof are

COMO NOTARIO SUPLENTE (E) DEL CIRCULO
HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA
15 SET 2007

divested of such rights to elect a specified number of directors, voting as a class, pursuant to the provisions of such Preferred Stock or series, the terms of office of all directors elected by the holders of such Preferred Stock or series, voting as a class pursuant to such provisions or elected to fill any vacancies resulting from the death, resignation or removal of directors so elected by the holders of such Preferred Stock or series, shall forthwith terminate and the authorized number of directors shall be reduced accordingly.

SECTION 6.02. *Ballots*. Elections of directors at an annual or special meeting of stockholders need not be by written ballot unless the bylaws of the Corporation shall provide otherwise.

SECTION 6.03. *Elimination of Certain Personal Liability of Directors*. (a) A director of the Corporation shall not be liable to the Corporation or its stockholders for monetary damages for breach of fiduciary duty as a director to the fullest extent permitted by Delaware Law.

(b) Each person (and the heirs, executors or administrators of such person) who was or is a party or is threatened to be made a party to, or is involved in any threatened, pending or completed action, suit or proceeding, whether civil, criminal, administrative or investigative, by reason of the fact that such person is or was a director of the Corporation or is or was serving at the request of the Corporation as a director of another corporation, partnership, joint venture, trust or other enterprise, shall be indemnified and held harmless by the Corporation to the fullest extent permitted by Delaware Law. The right to indemnification conferred in this Section 6.03 shall also include the right to be paid by the Corporation the expenses incurred in connection with any such proceeding in advance of its final disposition to the fullest extent authorized by Delaware Law. The right to indemnification conferred in this Section 6.03 shall be a contract right.

(c) The Corporation may, by action of its Board of Directors, provide indemnification to such of the officers, employees and agents of the Corporation to such extent and to such effect as the Board of Directors shall determine to be appropriate and authorized by Delaware Law.

(d) The Corporation shall have power to purchase and maintain insurance on behalf of any person who is or was a director, officer, employee or agent of the Corporation, or is or was serving at the request of the Corporation as a director, officer, employee or agent of another corporation, partnership, joint venture, trust or other enterprise against any expense, liability or loss incurred by such person in any such capacity or arising out of his status as such, whether or

NOTARIO QUINCUAGESIMO OCTAVO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
13 SET 2007
PEDRO LOPEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

not the Corporation would have the power to indemnify him against such liability under Delaware Law.

(e) The rights and authority conferred in this Section 6.03 shall not be exclusive of any other right which any person may otherwise have or hereafter acquire.

(f) Neither the alteration, amendment, repeal or recission of this Section 6.03, nor the adoption of any provision of this Certificate of Incorporation or the bylaws of the Corporation, nor, to the fullest extent permitted by Delaware Law, any modification of law, shall eliminate or reduce the effect of this Section 6.03 in respect of any acts or omissions occurring prior to such alteration, amendment, repeal, recission, adoption or modification.

ARTICLE 7

SECTION 7.01. *Section 203 of Delaware Law.* The Corporation hereby elects not to be governed by Section 203 of Delaware Law.

ARTICLE 8

SECTION 8.01. *Relationship With Roche.* In anticipation that the Corporation will cease to be a wholly owned subsidiary of Roche Holdings, Inc., but that Roche (as defined in Section 8.05) will remain a stockholder of the Corporation, and in anticipation that the Corporation (as defined in Section 8.05) and Roche may engage in the same or similar activities or lines of business and have an interest in the same areas of corporate opportunities, and in recognition of (i) the benefits to be derived by the Corporation through its continued contractual, corporate and business relations with Roche (including service of officers and directors of Roche as directors of the Corporation) and (ii) the difficulties attendant to any director, who desires and endeavors fully to satisfy such director's fiduciary duties, in determining the full scope of such duties in any particular situation, the provisions of this Article 8 are set forth to regulate, define and guide the conduct of certain affairs of the Corporation as they may involve Roche and its officers and directors, and the powers, rights, duties and liabilities

DESPACHO (5) DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA COPIA QUE SE TENIDO A LA VISTA COINCIDE CON EL ORIGINAL
13 SET 2007
NOTARIA (E)

of the Corporation and its officers, directors and stockholders in connection therewith.

SECTION 8.02. *Similar Business Activities.* Except as Roche Holdings, Inc. may otherwise agree in writing,

(a) Roche shall not have a duty to refrain from engaging directly or indirectly in the same or similar business activities or lines of business as the Corporation, and

(b) neither Roche nor any officer or director thereof shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty by reason of any such activities of Roche or of such person's participation therein.

In the event that Roche acquires knowledge of a potential transaction or matter that may be a corporate opportunity for both Roche and the Corporation, Roche shall have no duty to communicate or offer such corporate opportunity to the Corporation and shall not be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty as a stockholder of the Corporation or controlling person of a stockholder by reason of the fact that Roche pursues or acquires such corporate opportunity for itself, directs such corporate opportunity to another person or entity, or does not communicate information regarding, or offer, such corporate opportunity to the Corporation.

SECTION 8.03. *Corporate Opportunities.* In the event that a director, officer or employee of the Corporation who is also a director, officer or employee of Roche acquires knowledge of a potential transaction or matter that may be a corporate opportunity for the Corporation and Roche (whether such potential transaction or matter is proposed by a third-party or is conceived of by such director, officer or employee of the Corporation), such director, officer or employee shall be entitled to offer such corporate opportunity to the Corporation or Roche as such director, officer or employee deems appropriate under the circumstances in his sole discretion, and no such director, officer or employee shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty or duty of loyalty or failure to act in (or not opposed to) the best interests of the Corporation or the derivation of any improper personal benefit by reason of the fact that (i) such director, officer or employee offered such corporate opportunity to Roche (rather than the Corporation) or did not communicate information regarding such corporate opportunity to the Corporation or (ii) Roche pursues or acquires such corporate opportunity for itself or directs such corporate opportunity to another person or does not communicate information regarding such corporate opportunity to the Corporation.

SEXTO (E) DEL CIRCULO
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
PRESENTE COPIA ES IGUAL A EL ORIGINAL
QUE SE TENIDO A LA VISTA
AUGUST 2007
PABLO MENDEZ BARRIOS
NOTARIO (E)

50

SECTION 8.04. *Deemed Consent of Stockholders.* Any person or entity purchasing or otherwise acquiring any interest in any shares of capital stock of the Corporation shall be deemed to have notice of and to have consented to the provisions of this Article 8.

SECTION 8.05. *Definitions.* For purposes of this Article 8 and Article 9 only, (i) the term **"Corporation"** shall mean the Corporation and all corporations, partnerships, joint ventures, associations and other entities in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or more of the outstanding voting stock, voting power or similar voting interests, and (ii) the term **"Roche"** shall mean Roche Holdings, Inc. and all corporations, partnerships, joint ventures, associations and other entities (other than the Corporation, defined in accordance with clause (i) of this Section 8.05) that are **"affiliates"** (as defined in Rule 12b-2 under the Securities Exchange Act of 1934, as amended) of Roche Holdings, Inc.

SECTION 8.06. *Termination; Binding Effect.* Notwithstanding anything in this Certificate of Incorporation to the contrary, the foregoing provisions of this Article 8 shall expire on the date that Roche ceases to own beneficially Common Stock representing at least 5% of the number of outstanding shares of Common Stock of the Corporation and no person who is a director or officer of the Corporation is also a director or officer of Roche. Neither such expiration, nor the alteration, amendment, change or repeal of any provision of this Article 8 nor the adoption of any provision of this Amended and Restated Certificate of Incorporation inconsistent with any provision of this Article 8 shall eliminate or reduce the effect of this Article 8 in respect of any matter occurring, or any cause of action, suit or claim that, but for this Article 8, would accrue or arise, prior to such expiration, alteration, amendment, repeal or adoption.

SECTION 8.07. *Article 9.* The provisions of this Article 8 are in addition to the provisions of Article 9.

ARTICLE 9

SECTION 9.01. *Contracts Not Void.* No contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment, modification or termination thereof) between the Corporation and Roche shall be void or voidable solely for the reason that Roche is a party thereto, or solely because any directors or officers of the Corporation who are affiliated with Roche are present at or participate in the

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE SE TUVO A LA VISTA
15 SET 2007
MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

S1

meeting of the Board of Directors or committee thereof which authorizes the contract, agreement, arrangement, transaction, amendment, modification or termination or solely because his or their votes are counted for such purpose, but any such contract, agreement, arrangement or transaction (or any amendment, modification or termination thereof) shall be governed by the provisions of this Amended and Restated Certificate of Incorporation, the Corporation's Bylaws, Delaware Law and other applicable law. For purposes of this Article 9, the terms the "**Corporation**" and "**Roche**" have the meanings set forth in Section 8.05.

SECTION 9.02. *Quorum*. Directors of the Corporation who are also directors or officers of Roche may be counted in determining the presence of a quorum at a meeting of the Board of Directors or of a committee that authorizes or approves any such contract, agreement, arrangement or transaction (or amendment, modification or termination thereof). Outstanding shares of Common Stock owned by Roche may be counted in determining the presence of a quorum at a meeting of stockholders that authorizes or approves any such contract, agreement, arrangement or transaction (or amendment, modification or termination thereof).

SECTION 9.03. *No Liability For Good Faith Actions*. Neither Roche nor any officer or director thereof shall be liable to the Corporation or its stockholders for breach of any fiduciary duty or duty of loyalty or failure to act in (or not opposed to) the best interests of the Corporation or the derivation of any improper personal benefit by reason of the fact that Roche or an officer of director thereof in good faith takes any action or exercises any rights or gives or withholds any consent in connection with any agreement or contract between Roche and the Corporation. No vote cast or other action taken by any person who is an officer, director or other representative of Roche, which vote is cast or action is taken by such person in his capacity as a director of this Corporation, shall constitute an action of or the exercise of a right by or a consent of Roche for the purpose of any such agreement or contract.

SECTION 9.04. *Deemed Consent by Stockholders*. Any person or entity purchasing or otherwise acquiring any interest in any shares of capital stock of the Corporation shall be deemed to have notice of and to have consented to the provisions of this Article 9.

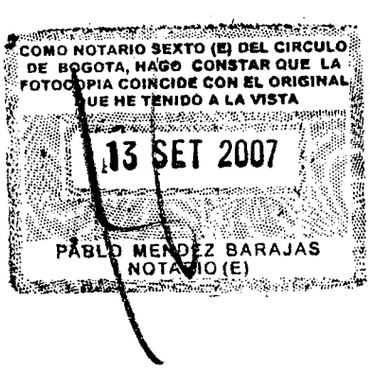
SECTION 9.05. *Contracts Covered*. For purposes of this Article 9, any contract, agreement, arrangement or transaction with the Corporation shall any corporation, partnership, joint venture, association or other entity in which the Corporation beneficially owns (directly or indirectly) fifty percent or more of the outstanding voting stock, voting power or similar voting interests shall be deemed to be a contract, agreement, arrangement or transaction with the Corporation.

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
06 SET 2007
BARAJAS
NOTARIO (E)

S2

SECTION 9.06. *Binding Effect.* Neither the alteration, amendment, change or repeal of any provision of this Article 9 nor the adoption of any provision inconsistent with any provision of this Article 9 shall eliminate or reduce the effect of this Article 9 in respect of any matter occurring, or any cause of action, suit or claim that, but for this Article 9, would accrue or arise, prior to such alteration, amendment, change, repeal or adoption.

SECTION 9.07. *Article 8.* The provisions of this Article 9 are in addition to the provisions of Article 8.

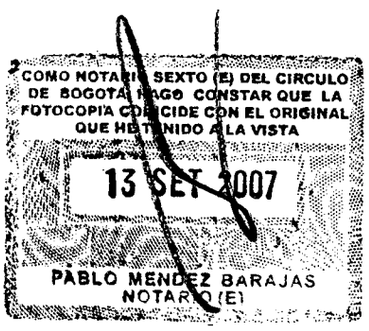


53

IN WITNESS WHEREOF, this Amended and Restated Certificate of Incorporation, having been duly adopted in accordance with Sections 242 and 245 of the General Corporation Law of the State of Delaware and by the written consent of the sole stockholder of the Corporation in accordance with Section 228 of the General Corporation Law of the State of Delaware, has been executed this 22nd day of July, 1999.

GENENTECH, INC.

By: /s/ Stephen G. Juelsgaard
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Senior Vice President,
General Counsel and Secretary



(4)

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. *Country: United States of America*

This public document:

2. *has been signed by Harriet Smith Windsor*

3. *acting in the capacity of Secretary of State of Delaware*

4. *bears the seal/stamp of Office of Secretary of State*

Certified

5. *at Dover, Delaware*

6. *the seventh day of October, A.D. 2005*

7. *by Secretary of State, Delaware Department of State*

8. *No. 0265284*

9. *Seal/Stamp:*



10. *Signature:*

Harriet Smith Windsor

Secretary of State

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA

03 SET 2007

PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

Delaware

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE FIFTEENTH DAY OF MAY, A.D. 2000, AT 5 O'CLOCK P.M.

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA

13 SET 2007

PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

2112549

050823723

AUTHENTICATION: 4212781

DATE: 10-07-05

56

STATE OF DELAWARE
SECRETARY OF STATE
DIVISION OF CORPORATIONS
FILED 05:00 PM 05/15/2000
001245251 – 2112549

CERTIFICATE OF AMENDMENT OF AMENDED AND RESTATED CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc. a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware.

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

> "Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is seven hundred million (700,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value $0.02 per share ("Preferred Stock"). Six hundred million (600,000,000) shares shall be designated common stock, par value $0.02 per share ("Common Stock"). The Common Stock of the Corporation shall be all of one class."

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 15th day of May, 2000.

GENENTECH, INC.

By: _____
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Senior Vice President, General Counsel and Secretary

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCUITO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE ESTA COPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
13 SET 2007
PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

75841

(5)

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. *Country: United States of America*

This public document:

2. *has been signed by Harriet Smith Windsor*

3. *acting in the capacity of Secretary of State of Delaware*

4. *bears the seal/stamp of Office of Secretary of State*

Certified

5. *at Dover, Delaware*

6. *the seventh day of October, A.D. 2005*

7. *by Secretary of State, Delaware Department of State*

8. *No. 0265285*

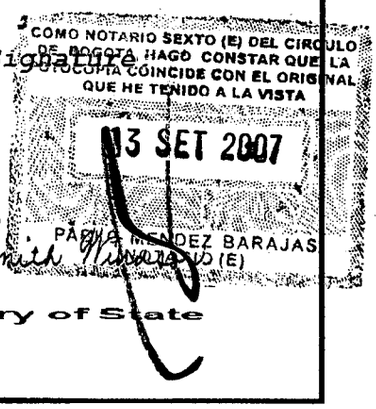
9. *Seal/Stamp:*



10. *Signature*

Harriet Smith Windsor

Secretary of State



Delaware

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE TENTH DAY OF MAY, A.D. 2001, AT 2:05 O'CLOCK P.M.

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE SE TENIDO A LA VISTA

13 SET 2007

PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

SECRETARY'S OFFICE
THE DELAWARE 1776

2112549

050823723

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

AUTHENTICATION: 4212782

DATE: 10-07-05

59

STATE OF DELAWARE
SECRETARY OF STATE
DIVISION OF CORPORATIONS
FILED 02:05 PM 05/10/2001
010226224 - 2112549

S ////STATE/OF/DELAWARE///// V
T ///SECRETARY/OF/STATE///// O
A DIVISION/OF/CORPORATIONS// I
M FILED/09/00/AM/05/10/2001/ D
P ///010226224/2112549////
BY Sandy Miller

CERTIFICATE OF AMENDMENT OF AMENDED AND RESTATED CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc. a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware.

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

> "Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is one billion three hundred million (1,300,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value $0.02 per share ("Preferred Stock"). One billion two hundred million (1,200,000,000) shares shall be designated common stock, par value $0.02 per share ("Common Stock"). The Common Stock of the Corporation shall be all of one class."

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 10th day of May, 2001.

GENENTECH, INC.

By: _____
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Senior Vice President, General Counsel and Secretary

COMO NOTARIO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA PRESENTE ES COPIA FIEL CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
13 SET 2007
PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

86747

(6)

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. *Country: United States of America*

This public document:

2. *has been signed by Harriet Smith Windsor*

3. *acting in the capacity of Secretary of State of Delaware*

4. *bears the seal/stamp of Office of Secretary of State*

Certified

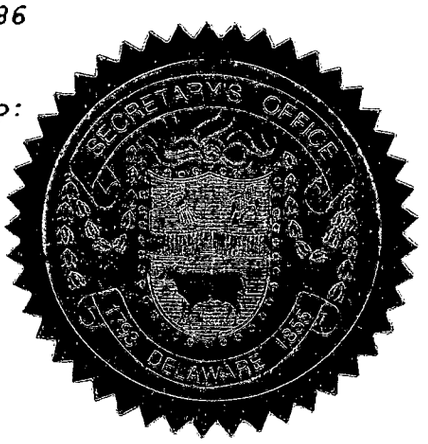
5. *at Dover, Delaware*

6. *the seventh day of October, A.D. 2005*

7. *by Secretary of State, Delaware Department of State*

8. *No. 0265286*

9. *Seal/Stamp:*



10. *Signature*

Harriet Smith Windsor

Secretary of State

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA

13 SET 2005

PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

Delaware

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY THE ATTACHED IS A TRUE AND CORRECT COPY OF THE CERTIFICATE OF AMENDMENT OF "GENENTECH, INC.", FILED IN THIS OFFICE ON THE SIXTEENTH DAY OF APRIL, A.D. 2004, AT 7:39 O'CLOCK P.M.

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA

13 SET 2007

PABL[illegible] MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

2112549

050823723

Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

AUTHENTICATION: 4212783

DATE: 10-07-05

State of Delaware
Secretary of State
Division of Corporations
Delivered 07:44 PM 04/16/2004
FILED 07:39 PM 04/16/2004
SRV 040281669 - 2112549 FILE

CERTIFICATE OF THIRD AMENDMENT OF AMENDED AND RESTATED CERTIFICATE OF INCORPORATION

Genentech, Inc., a corporation organized and existing under and by virtue of the General Corporation Law of the State of Delaware,

DOES HEREBY CERTIFY:

FIRST: That at a meeting of the Board of Directors of Genentech, Inc. resolutions were duly adopted setting forth a proposed amendment of the Amended and Restated Certificate of Incorporation of said corporation, declaring said amendment to be advisable and calling a meeting of the stockholders of said corporation for consideration thereof. The resolution setting forth the proposed amendment is as follows:

RESOLVED, that the Amended and Restated Certificate of Incorporation of this corporation be amended by changing "Section 4.01(a)" of the Article thereof numbered "4" so that, as amended, said Section of said Article shall be and read as follows:

> Section 4.01. *Capital Stock.* (a) The Corporation is authorized to issue two classes of stock to be designated, respectively, preferred stock and common stock. The total number of shares which the Corporation is authorized to issue is three billion one hundred million (3,100,000,000) shares. One hundred million (100,000,000) shares shall be designated preferred stock, par value $0.02 per share ("Preferred Stock"). Three billion (3,000,000,000) shares shall be designated common stock, par value $0.02 per share ("Common Stock"). The common stock of the Corporation shall be all of one class.

SECOND: That thereafter, pursuant to resolution of its Board of Directors, the regular meeting of the stockholders of said corporation was duly called and held upon notice in accordance with Section 222 of the General Corporation Law of the State of Delaware at which meeting the necessary number of shares as required by statute were voted in favor of the amendment.

THIRD: That said amendment was duly adopted in accordance with the provisions of Section 242 of the General Corporation Law of the State of Delaware.

FOURTH: That the capital of said corporation shall not be reduced under or by reason of said amendment.

IN WITNESS WHEREOF, said Genentech, Inc. has caused this Third Certificate of Amendment to be signed by Stephen G. Juelsgaard, an Authorized Officer, this 16th day of April, 2004.

GENENTECH, INC.

By: _____
Name: Stephen G. Juelsgaard
Title: Executive Vice President, General Counsel and Secretary

CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
13 SET 2007
PABLO MENDEZ BARAJAS
NOTARIA

#153087

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN PCT

(21) N° de solicitud:	(51) Int Cl: C12N 15/52
(22) Fecha de solicitud: 04-10-07	(71)Solicitante(s) **GENENTECH, INC.**
(30) Prioridad (31) ***No. Prioridad*** 11/102,501 (32) ***Fecha*** 08-04-05 (33) ***País*** US	(72) Inventor(es) DOWD, Patrick; FRANTZ, Gretchen; POLAKIS, Paul; SMITH, Victoria; SPENCER, Susan; WU, Thomas y ZHANG, Zemin.
	(74) Apoderado: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**
(85) Fecha limite inicio fase nacional: 08-11-07 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: **05/04/06** No. de solicitud ***PCT/US2006/013501***	(87) Publicación internacional Fecha: **19/10/06** N° publicación: ***WO 2006/110760 A3***
(54) Titulo: **"COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DEL TUMOR"**	

Resumen - Reivindicación(es):

Reivindicación número 1:

Ácido nucleico aislado que comprende:

(a) una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO:2;

(b) una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO:2, careciendo de su péptido de señal asociado;

(c) una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2;

(d) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1;

(e) la región codificadora de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1; o

(f) el complemento de (a), (b), (c), (d) o (e).

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES
PCT
REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

(PCT Artículo 18 y Reglas 43 y 44)

Registro de referencia del solicitante o agente P5001R1P2	**PARA FUTURAS ACCIONES** ver (Forma PCT/ISA/220) así como, donde aplique, el ítem 5 a continuación.	
Solicitud internacional No. PCT/US2006/013501	Fecha de registro internacional *(día/mes/año)* 05/04/2006	Fecha de Prioridad (Primera) *(día/mes/año)* 08/04/2005
Solicitante GENENTECH, INC.		

Este Reporte de Búsqueda Internacional ha sido preparado por esta Autoridad de Búsqueda Internacional y es transmitido al solicitante Según el Artículo 18. Una copia será transmitida a la Oficina Internacional.

Este Reporte de Búsqueda Internacional consta de un total de 5 hojas.

☒ También está acompañado de una copia de cada documento técnico anterior citado en este reporte.

1. **Bases del reporte**

a. Respecto al **lenguaje**, la búsqueda internacional se llevó a cabo según:

☒ la solicitud internacional en el lenguaje en el cual se presentó.

☐ una traducción de la solicitud internacional en ---------- el cual es el lenguaje de la traducción proporcionada para los propósitos de la Búsqueda Internacional (Reglas 12.3 (a) y 23.1(b)).

b. ☒ Respecto a una secuencia de **ácido nucleótido y/o amino revelado** en la solicitud internacional, ver Casilla No. 1.

2. ☐ **Ciertas reivindicaciones no pudieron localizarse** (Ver Casilla II).

3. ☐ **Falta unidad de invención** (ver Casilla III).

4. Respecto al **título,**

☒ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☐ Esta Autoridad ha establecido que el texto se lea así:

5. Respecto al **resumen,**

☒ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☐ Esta Autoridad ha establecido el texto de acuerdo con la Norma 38.2(b), según aparece en el Recuadro IV. El solicitante puede, un mes después de la fecha de haber enviado por correo este reporte de búsqueda internacional, presentar comentarios a esta Autoridad.

6. Respecto a los **dibujos,**

a. La figura de los **dibujos** que se publicará con el resumen es la Figura No. 2

☒ como lo sugirió el solicitante.

☐ como lo sugirió la Autoridad, porque el solicitante no sugirió una figura.

☐ como lo sugirió la Autoridad, porque esta figura caracteriza mejor a la invención.

b. ☐ Ninguna de las figuras se publicará con el resumen.

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/US2006/013501

Casilla No. I. Nucleótido y/o secuencia(s) aminoácida(s) (Continuación del ítem 1.b de la primera hoja)

1. Respecto a cualquier **nucleótido y/o secuencia aminoácida** revelada en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada, esta opinión se ha establecido según:

   a. tipo de material:

   ☒ un listado de secuencia
   ☐ tabla(s) relacionada con el listado de secuencia

   b. formato de material:

   ☒ en formato escrito
   ☒ en formato legible por computador

   c. tiempo de presentación/suministro:

   ☐ contenido en la solicitud internacional según se registró
   ☐ registrada junto con la solicitud internacional en formato legible por computador
   ☒ proporcionada subsiguientemente a esta Autoridad para la búsqueda.

2. ☒ Además, en el caso en que más de una versión o copia de un listado de secuencia y/o tabla relacionada con ello se haya registrado o proporcionado, las declaraciones requeridas de que la información en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a aquella en la solicitud según se presentó o no va más allá de la solicitud según se registró, según lo apropiado, fueron suministradas.

3. Comentarios adicionales:

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/US2006/013501

A. CLASIFICACION DE MATERIA
INV.. C12N15/52 C12N15/63 C12N5/10 C12N9/48

Según la Clasificación de Patentes Internacional (CPI) o según la clasificación nacional y la CPI

B. CAMPOS BUSCADOS

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de símbolos de clasificación)

C12N

Documentación buscada fuera de documentación mínima hasta donde dichos documentos se incluyan en los campos buscados

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, donde sea práctico, buscar términos usados)

EPO-Interno, Búsqueda de Secuencias, WPI Dato, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría °	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	DATABASE EMBL [Online] 14 de Noviembre de 2001 (2001-11-14), "mRNA de dipeptidada 1 (renal) de Homosapiens (clon Cdna MGC:8990 IMAGE: 3846046), cds completos" XP002406227 Extraído del acceso EBI no. EMBL: BC017023 Acceso a la base de datos no. BC017023 El documento complete --- -/---	1-6

☒ En el recuadro C se enumeran más documentos.

☒ En el anexo se enumeran miembros de la familia de patentes.

° Categorías especiales de documentos citados:

'A' documento que define el estado general de la técnica el cual no se considera de relevancia particular

'E' documento anterior pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional

'L' documento que puede arrojar dudas sobre reivindicaciones de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra citación u otra razón especial (según se especifica)

'O' documento que se refiere a una revelación oral, uso, exhibición u otros medios

'P' documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada

'T' documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoría que sustenta la invención

'X' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se toma solo

'Y' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se combina con uno o más documentos, siendo dicha combinación obvia para una persona experta en la técnica

'&' documento miembro de la misma familia de patentes

Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional	Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional
9 de Noviembre de 2006	12/12/2006
Nombre y dirección de correo de ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040 Tx 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Funcionario autorizado Brenz Verca, Stefano

Forma PCT ISA 210 (segunda hoja) (Abril 2005)

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/US2006/013501

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría °	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	DATABASE EMBL [Online] 15 de Mayo de 2003 (2003-05-15), "mRNA de dipeptidada 1 (renal) de Homosapiens, cds completos" XP002406228 Recuperado del acceso EBI no. EMBL: BT006664 Acceso a la base de datos no. BT006664 El documento completo	1-6

P, X	DATABASE EMBL [Online] 25 de Noviembre de 2005 (2005-11-25), "Composiciones y Métodos para el Diagnóstico y Tratamiento de Tumores." XP002406229 Recuperado del acceso EBI no. EM_PAT: DD106754 Acceso a la base de datos no. DD106754 El documento completo	1-6
X	-& WO 03/000113 A2 (GENENTECH INC [US]) 3 de Enero de 2003 (2003-01-03) página 137, líneas 17-19; figura 30; secuencia 30	1-6

X	WO 02/064798 A (BIONOMICS LTD [AU]; KREMMIDIOTIS GABRIEL [AU]; BAIS ANTHONY JOHN [AU];) 22 de Agosto de 2002 (2002-08-22) Reivindicaciones 1, 35 ; secuencias 8, 9	1-6

X	WO 01/94629 A2 (AVALON PHARMACEUTICALS [US]) 13 de Diciembre de 2001 (2001-12-13) página 17, líneas 8-11; secuencia 434	1-6

X	DATABASE EMBL [Online] 9 de Julio de 2003 (2003-07-09), "Secuencia 6 de la Patente WO03043631." XP002406413 Recuperado del acceso EBI no. EM_PAT: AX775590 Acceso a la base de datos no. AX775590 El documento completo	1-6
X	-& WO 03/043631 A2 (HOFFMANN LA ROCHE [CH] CHUGAI PHARMACEUTICAL CO LTD [JP]) 30 de Mayo de 2003 (2003-05-30) ejemplo 2, 50	1-6

P, X	WO 2006/010496 A (BAYER HEALTHCARE AG [DE]; GOLZ STEFAN [DE]; BRUEGGEMEIER ULF [DE]; GEE) 2 de Febrero de 2006 (2006-02-02) párrafo [0283]; secuencia 1	1-6

P, X	US 2005/107595 A1 (CAIRNS BELINDA [US] ET AL) 19 de Mayo de 2005 (2005-05-19) Párrafos [1098], [1099]; reivindicación 1; Figuras 30, 108; secuencias 30, 108	1-6

70

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Informe sobre miembros de familia de patentes

Solicitud Internacional No.
PCT/US2006/013501

Documento de patente citado en el reporte de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 03000113 A2	03-01-2003	CA 2451239 A1	03-01-2003
		EP 1409549 A2	21-04-2004
		JP 2004537534 T	16-12-2004
		KR 20060015699 A	17-02-2006
		KR 20060077919 A	05-07-2006
		KR 20060074927 A	03-07-2006
		MX PA03011985 A	26-03-2004
WO 02064798 A	22-08-2002	WO 02064775 A1	22-08-2002
		WO 02064780 A1	22-08-2002
		US 2004170994 A1	02-09-2004
WO 0194629 A2	13-12-2001	AU 6455901 A	17-12-2001
		CA 2411601 A1	13-12-2001
		EP 1358349 A2	05-11-2003
		JP 2004509612 T	02-04-2004
WO 03043631 A2	30-05-2003	AU 2002352048 A1	10-06-2003
		BR 0214386 A	30-11-2004
		CA 2468170 A1	30-05-2003
		CN 1615131 A	11-05-2005
		HU 0500054 A2	28-04-2005
		JP 2005514359 T	19-05-2005
		KR 20050044570 A	12-05-2005
		MX PA04004882 A	11-04-2005
		US 2003138864 A1	24-07-2003
WO 2006010496 A	02-02-2006	NONE	
US 2005107595 A1	19-05-2005	US 2005106644 A1	19-05-2005

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference	FOR FURTHER ACTION	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
P5001R1P2		
International application No.	International filing date *(day/month/year)*	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)*
PCT/US2006/013501	05/04/2006	08/04/2005
Applicant		
GENENTECH, INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 5 sheets.

[X] It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**
   a. With regard to the **language,** the international search was carried out on the basis of:
      [X] the international application in the language in which it was filed
      [ ] a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))
   b. [X] With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. [ ] **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. [ ] **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title,**
   [X] the text is approved as submitted by the applicant
   [ ] the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract,**
   [X] the text is approved as submitted by the applicant
   [ ] the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings,**
   a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 2
      [X] as suggested by the applicant
      [ ] as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
      [ ] as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
   b. [ ] none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2006/013501

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

   a. type of material

   [X] a sequence listing

   [ ] table(s) related to the sequence listing

   b. format of material

   [X] on paper

   [X] in electronic form

   c. time of filing/furnishing

   [ ] contained in the international application as filed

   [ ] filed together with the international application in electronic form

   [X] furnished subsequently to this Authority for the purpose of search

2. [X] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT M. ..R
INV. C12N15/52 C12N15/63 C12N5/10 C12N9/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, Sequence Search, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL [Online] 14 November 2001 (2001-11-14), "Homo sapiens dipeptidase 1 (renal), mRNA (cDNA clone MGC:8990 IMAGE:3846046), complete cds." XP002406227 retrieved from EBI accession no. EMBL:BC017023 Database accession no. BC017023 the whole document ------ -/--	1-6

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
9 November 2006	12/12/2006

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Brenz Verca, Stefano

6

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL [Online] 15 May 2003 (2003-05-15), "Homo sapiens dipeptidase 1 (renal) mRNA, complete cds." XP002406228 retrieved from EBI accession no. EMBL:BT006664 Database accession no. BT006664 the whole document	1-6
P,X	DATABASE EMBL [Online] 25 November 2005 (2005-11-25), "Compositions and Methods for the Diagnosis and Treatment of Tumor." XP002406229 retrieved from EBI accession no. EM_PAT:DD106754 Database accession no. DD106754 the whole document	1-6
X	-& WO 03/000113 A2 (GENENTECH INC [US]) 3 January 2003 (2003-01-03) page 137, lines 17-19; figure 30; sequence 30	1-6
X	WO 02/064798 A (BIONOMICS LTD [AU]; KREMMIDIOTIS GABRIEL [AU]; BAIS ANTHONY JOHN [AU];) 22 August 2002 (2002-08-22) claims 1,35; sequences 8,9	1-6
X	WO 01/94629 A2 (AVALON PHARMACEUTICALS [US]) 13 December 2001 (2001-12-13) page 17, lines 8-11; sequence 434	1-6
X	DATABASE EMBL [Online] 9 July 2003 (2003-07-09), "Sequence 6 from Patent WO03043631." XP002406413 retrieved from EBI accession no. EM_PAT:AX775590 Database accession no. AX775590 the whole document	1-6
X	-& WO 03/043631 A2 (HOFFMANN LA ROCHE [CH] CHUGAI PHARMACEUTICAL CO LTD [JP]) 30 May 2003 (2003-05-30) examples 2,50	1-6
P,X	WO 2006/010496 A (BAYER HEALTHCARE AG [DE]; GOLZ STEFAN [DE]; BRUEGGEMEIER ULF [DE]; GEE) 2 February 2006 (2006-02-02) paragraph [0283]; sequence 1	1-6
P,X	US 2005/107595 A1 (CAIRNS BELINDA [US] ET AL) 19 May 2005 (2005-05-19) paragraphs [1098], [1099]; claim 1; figures 30,108; sequences 30,108	1-6

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03000113 A2	03-01-2003	CA 2451239 A1	03-01-2003
		EP 1409549 A2	21-04-2004
		JP 2004537534 T	16-12-2004
		KR 20060015699 A	17-02-2006
		KR 20060077919 A	05-07-2006
		KR 20060074927 A	03-07-2006
		MX PA03011985 A	26-03-2004
WO 02064798 A	22-08-2002	WO 02064775 A1	22-08-2002
		WO 02064780 A1	22-08-2002
		US 2004170994 A1	02-09-2004
WO 0194629 A2	13-12-2001	AU 6455901 A	17-12-2001
		CA 2411601 A1	13-12-2001
		EP 1358349 A2	05-11-2003
		JP 2004509612 T	02-04-2004
WO 03043631 A2	30-05-2003	AU 2002352048 A1	10-06-2003
		BR 0214386 A	30-11-2004
		CA 2468170 A1	30-05-2003
		CN 1615131 A	11-05-2005
		HU 0500054 A2	28-04-2005
		JP 2005514359 T	19-05-2005
		KR 20050044570 A	12-05-2005
		MX PA04004882 A	11-04-2005
		US 2003138864 A1	24-07-2003
WO 2006010496 A	02-02-2006	NONE	
US 2005107595 A1	19-05-2005	US 2005106644 A1	19-05-2005

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES (PCT)

(19) **Organización Mundial de Propiedad Intelectual**
Oficina Internacional

(43) **Fecha de Publicación**
19 de Octubre de 2006 (19.10.2006)

PCT

(10) **Número de Publicación Internacional**
WO 2006/110760 A3

(51) **Clasificación Internacional de Patentes[7]:,**
C12N 15/52 (2006.01) **C12N 5/10** (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) **C12N 9/48** (2006.01)

(21) **Número de Solicitud Internacional:**
PCT/US2006/013501

(22) **Fecha de Registro Internacional:** 5 de Abril de 2006 (05.04.2006)

(25) **Idioma de registro:** Inglés

(26) **Idioma de Publicación:** Inglés

(30) **Información de Prioridad:**

11/102,501 8 de Abril de 2005 (08.04.2005) US

(71) **Solicitante:** (Para todos los Estados designados excepto Estados Unidos de América): **GENENTECH, INC.** [US/US]; MS 49, 1 Dna Way, South San Francisco, California 94080-4990 (US).

(72) **Inventores; e**
(75) **Inventores/Solicitantes**:(para Estados Unidos de América sólamente): **DOWD, Patrick** [US/US]; 18 Ord Street, San Francisco, California 94114 (US). **FRANTZ, Gretchen** [US/US]; 2819 Buchanan Street, San Francisco, California 94123 (US). **POLAKIS, Paul** [US/US]; 265 West Blithedale Avenue, Mill Valley, California 94941 (US). **SMITH, Victoria** [AU/US]; 19 Dwight Road, Burlingame, California 94010 (US).**SPENCER, Susan** [US/US]; 2395 Paradise Drive, Tiburon, California 94920 (US). **WU, Thomas** [US/US]; 41 Nevada Street, San Francisco, California 94110 (US). **ZHANG, Zemin** [US/US]; 876 Taurus Drive, Foster City, California 94404 (US).

(74) **Agentes: KRESNAK, Mark** et al.; c/o Genentech, Inc., MS 49, 1 Dna Way, South San Francisco, California 94080-4990 (US).

(81) **Estados Designados** (A menos que se indique lo contrario para cada tipo de protección Nacional disponible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **Estados Designados (regionales):** (A menos que se indique lo contrario para cada tipo de protección Regional disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiatica (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:
- con reporte de búsqueda internacional

(88) Fecha de publicación del reporte de búsqueda Internacional:
8 de Marzo de 2007

Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, refiérase a "Las Notas Guías sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al comienzo de cada emisión regular de la Gaceta PCT.

(54) Título: "COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DEL TUMOR"

MWSGWWLWPLVAVCTADFFRDEAERIMRDSPVIDGHNDLPWQLLDMFNNRLQDERANLTTLAGTHTNI
PKLRAGFVGGQFWSVYTPCDTQNKDAVRRTLEQMDVVHRMCRMYPETFLYVTSSAGIRQAFREGKVASL
IGVEGGHSIDSSLGVLRALYQLGMRYLTLTHSCNTPWADNWLVDTGDSEPQSQGLSPFGQRVVKELNRLG
VLIDLAHVSVATMKATLQLSRAPVIFSHSSAYSVCASRRNVPDDVLRLVKQTDSLVMVNFYNNYISCTNK
ANLSQVADHLDHIKEVAGARAVGFGGDFDGVPRVPEGLEDVSKYPDLIAELLRRNWTEAEVKGALADNL
LRVFQAVEQASNLTQAPEEEPIPLDQLGGSCRTHYGYSSGASSLHRHWGLLLASLAPLVLCLSLL

Secuencia de señal.
aminoácidos 1-16

Dominio transmembrana.
aminoácidos 392-410

Sitios de N-glicosilación.
aminoácidos 57-60, 279-282, 332-335, 358-361

Sitio de fosforilación de la tirosina quinasa.
aminoácidos 110-118

Sitios de N-miristoilación.
aminoácidos 63-68, 78-83, 124-129, 139-144, 151-156, 375-380, 395-400

Patrón de cremallera de leucina.
aminoácidos 390-411

Sitio activo de la dipeptidasa renal.
aminoácidos 140-162

Homología de la dipeptidasa renal.
aminoácidos 1-411

(57) **Resumen**: La presente invención está dirigida a composiciones de sustancias útiles para el diagnóstico y tratamiento del tumor en mamíferos, así como los métodos para usar dichas composiciones de sustancias con el mismo objetivo.

77

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
19 October 2006 (19.10.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/110760 A3

(51) International Patent Classification:
C12N 15/52 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) *C12N 9/48* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2006/013501

(22) International Filing Date: 5 April 2006 (05.04.2006)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
11/102,501 8 April 2005 (08.04.2005) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **GENENTECH, INC.** [US/US]; MS 49, 1 Dna Way, South San Francisco, California 94080-4990 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **DOWD, Patrick** [US/US]; 18 Ord Street, San Francisco, California 94114 (US). **FRANTZ, Gretchen** [US/US]; 2819 Buchanan Street, San Francisco, California 94123 (US). **POLAKIS, Paul** [US/US]; 265 West Blithedale Avenue, Mill Valley, California 94941 (US). **SMITH, Victoria** [AU/US]; 19 Dwight Road, Burlingame, California 94010 (US). **SPENCER, Susan** [US/US]; 2395 Paradise Drive, Tiburon, California 94920 (US). **WU, Thomas** [US/US]; 41 Nevada Street, San Francisco, California 94110 (US). **ZHANG, Zemin** [US/US]; 876 Taurus Drive, Foster City, California 94404 (US).

(74) Agents: **KRESNAK, Mark** et al.; c/o Genentech, Inc., Ms49 1 Dna Way, South San Francisco, California 94080-4990 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *with international search report*

(88) Date of publication of the international search report:
8 March 2007

[Continued on next page]

(54) Title: COMPOSITIONS AND METHODS FOR THE DIAGNOSIS AND TREATMENT OF TUMOR

MWSGWWLWPLVAVCTADFFRDEAERIMRDSPVIDGHNDLPWQLLDMFNNRLQDERANLTTLAGTHTNIPKLRAGFVG
GQFWSVYTPCDTQNKDAVRRTLEQMDVVHRMCRMYPETFLYVTSSAGIRQAFRSGKVASLIGVEGGHSIDSSLGVLR
ALYQLGMRYLTLTHSCNTPWADNWLVDTGDSEPQSQGLSPFGQRVVKELNRLGVLIDLAHVSVATMKATLQLSRAPV
IFSHSSAYSVCASRRNVPDDVLRLVKQTDSLVMVNFYNNYISCTNKANLSQVADHLDHIKEVAGARAVGFGGDFDGV
PRVPEGLEDVSKYPDLIAELLRRNWTEAEVKGALADNLLRVFQAVEQASNLTQAPEEEPIPLDQLGGSCRTHYGYSS
GASSLHRHWGLLLASLAPLVLCLSLL

Signal sequence.
amino acids 1-16

Transmembrane domain.
amino acids 392-410

N-glycosylation sites.
amino acids 57-60, 279-282, 332-335, 358-361

Tyrosine kinase phosphorylation site.
amino acids 110-118

N-myristoylation sites.
amino acids 63-68, 78-83, 124-129, 139-144, 151-156, 375-380, 395-400

Leucine zipper pattern.
amino acids 390-411

Renal dipeptidase active site.
amino acids 140-162

Renal dipeptidase homology.
amino acids 1-411

(57) Abstract: The present invention is directed to compositions of matter useful for the diagnosis and treatment of tumor in mammals and to methods of using those compositions of matter for the same.

WO 2006/110760 A3

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES

De la
AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Para: Ver forma PCT/ISA/220	**PCT** **OPINION ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL** (PCT Regla 43*bis*.1)

	Fecha de envío por correo (día/mes/año) ver forma PCT/ISA/210 (segunda hoja)	
Registro de referencia del solicitante o agente ver forma PCT/ISA/220	**PARA FUTURAS ACCIONES** Ver párrafo 2 a continuación	
Solicitud Internacional No. PCT/US2006/013501	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 05.04.2006	Fecha de prioridad (día/mes/año) 08.04.2005

Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC
INV.. C12N15/52 C12N15/63 C12N5/10 C12N9/48

Solicitante
GENENTECH, INC.

1. Esta opinión contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems:

☒	Casilla No. I	Bases de la opinión
☒	Casilla No. II	Prioridad
☐	Casilla No. III	No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial
☐	Casilla No. IV	Falta de unidad de invención
☒	Casilla No. V	Afirmación razonada de conformidad con la Regla 43*bis*.1(a)(i) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación
☒	Casilla No. VI	Ciertos documentos citados
☐	Casilla No. VII	Ciertos defectos en la solicitud internacional
☐	Casilla No. VIII	Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional

2. **ACCIONES FUTURAS**
Si se hace una demanda para examen preliminar internacional, esta opinión generalmente será considerada como una opinión escrita de la Autoridad Examinadora Preliminar ("IPEA"). Sin embargo, esto no aplica cuando el solicitante escoge una Autoridad diferente a ésta para que sea la IPEA y la IPEA escogida le ha notificado a la Oficina Internacional de conformidad con la Regla 66.1*bis*(b) que no se considerarán las opiniones escritas de esta Autoridad de Búsqueda Internacional.

Si esta opinión es, según se estipula anteriormente, considerada una opinión escrita de la IPEA, se invita al solicitante a presentar ante la IPEA una respuesta escrita junto, cuando sea apropiado, con modificaciones, antes de la fecha de expiración de tres meses desde la fecha de envío por correo de la Forma PCT/ISA/220 o antes de la fecha de expiración de 22 meses desde la fecha de prioridad, la que expire más tarde.

Para opciones futuras, ver la Forma PCT/ISA/220.

3. Para detalles adicionales, ver las notas a la Forma PCT/ISA/220.

Nombre y dirección de correo de la ISA European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 -0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399-4465	Fecha de Terminación de esta opinión Ver forma PCT/ISA/210	Funcionario Autorizado Brenz Verca, Stefano Teléfono +49 89 2399-7702

Forma (PCT/ISA/237) (Carátula) (Abril 2005)

Casilla No. I. Bases de la opinión

1. Respecto al **lenguaje**, la búsqueda internacional se llevó a cabo según:

   ☒ la solicitud internacional en el lenguaje en el cual se presentó.

   ☐ una traducción de la solicitud internacional en ---------- el cual es el lenguaje de la traducción proporcionada para los propósitos de la Búsqueda Internacional (Reglas 12.3 (a) y 23.1(b)).

2. Respecto a cualquier **nucleótido y/o secuencia aminoácida** revelada en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada, esta opinión se ha establecido según:

   a. tipo de material:

   ☒ un listado de secuencia
   ☐ tabla(s) relacionada con el listado de secuencia

   b. formato de material:

   ☒ en formato escrito
   ☒ en formato legible por computador

   c. tiempo de presentación/suministro:

   ☐ contenido en la solicitud internacional según se registró.
   ☐ registrada junto con la solicitud internacional en formato legible por computador.
   ☒ proporcionada subsiguientemente a esta Autoridad para la búsqueda..

3. ☒ Además, en el caso en que más de una versión o copia de un listado de secuencia y/o tabla relacionada con ello se haya registrado o proporcionado, las declaraciones requeridas de que la información en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a aquella en la solicitud según se presentó o no va más allá de la solicitud según se registró, según lo apropiado, fueron suministradas.

4. Comentarios adicionales:

Casilla No. II Prioridad

1. ☒ La validez de la reivindicación de prioridad no se ha considerado porque la Autoridad de búsqueda Internacional no tiene en su posesión una copia de la solicitud anterior cuya prioridad ha sido reivindicada, ó cuando se requiera , una traducción de la solicitud anterior. Sin embargo, esta opinión se ha establecido en el supuesto que la fecha relevante (Reglas 43bis 1 y 64.1) es la fecha de prioridad reivindicada.

2. ☐ Se ha establecido esta opinión como si no se hubiese reivindicado ninguna prioridad debido al hecho de que se ha encontrado que la reivindicación de prioridad es inválida (Reglas 43*bis*.1 y 64.1). Por consiguiente, para los fines de esta opinión, se considera que la fecha de registro internacional indicada anteriormente es la fecha
   relevante.

3. Observaciones adicionales, si es necesario:

OPINION ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No. PCT/US2006/013501

Casilla No. V. Afirmación razonada bajo la Regla 66.2(a)(ii) respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación

1. Declaración

Novedad (N)	Si:	Reivindicaciones 1-6
	No:	Reivindicaciones
Nivel Inventivo (IS)	Si:	Reivindicaciones
	No:	Reivindicaciones 1-6
Aplicabilidad Industrial (IA)	Si:	Reivindicaciones 1-6
	No:	Reivindicaciones

2. Citaciones y explicaciones

ver hoja separada

Casilla No. VI Ciertos documentos citados

1. Ciertos documentos publicados (Reglas *43bis*.1 y 70.10)

y/o

2. Revelaciones no escritas (Reglas *43bis*.1 y 70.9)

ver forma 210

Re Item V

1. Se hace referencia a los siguientes documentos:

D1: DATABASE EMBL [Online] 14 de Noviembre de 2001 (2001-11-14), "mRNA de dipeptidada 1 (renal) de Homosapiens (clon Cdna MGC:8990 IMAGE: 3846046), cds completos" XP002406227; Database accesión no. BC017023

D2: DATABASE EMBL [Online] 15 de Mayo de 2003 (2003-05-15), "mRNA de dipeptidada 1 (renal) de Homosapiens, cds completos" XP002406228; Database accesión no. BT006664

D3: WO 02/064798 A (BIONOMICS LTD [AU]; KREMMINDIOTIS GABRIEL [AU]; BAIS ANTHONY JOHN [AU];) 22 de Agosto de 2002 (2002-08-22)

D4: WO 01/94629 A2 (AVALON PHARMACEUTICALS [US]; 13 de Diciembre de 2001 (2001-12-13)

D5: DATABASE EMBL [Online] 9 de Julio de 2003 (2003-07-09), "Secuencia 6 de la Patente WO03043631" XP002406413; Database accesión no. AX775590

D6: DATABASE EMBL [Online] 25 de Noviembre de 2005 (2005-11-25), "Composiciones y Métodos para el Diagnóstico y Tratamiento de Tumores" XP002406229; Database accesión no. DD106754

2. Novedad (Artículo 33(2) PCT) y Paso Inventivo (Artículo 33(3) PCT)

Los documentos de la técnica anterior D1-D5 todos revelan una dipeptidasa microsomal (DPEP1) que tiene una diferencia aminoácida del polipéptido de la SEQ ID No: 2 de la solicitud (Glu vs. Gln en la posición 351, respectivamente), así como polinucleótidos que codifican dicha enzima y vectores y células huésped que comprende polinucleótidos (por favor refiérase a los textos correspondientes citados en el Reporte de Búsqueda Internacional).

La SEQ ID No: 1 de la solicitud tiene 100.00% de identidad (100.00% (sin separación) sobre toda su longitud con EMBL:DD106754 derivada de la patente JP2004537534T publicada el 16 de diciembre de 2004, que es un miembro de la familia de la solicitud de patente WO03000113 citada en el Reporte de Búsqueda Internacional. Aunque WO03000113 menciona los ácidos nucleicos Tat113 (figura 30, SEQ ID No: 30) aparentemente correspondientes a los ácidos nucleicos de la presente solicitud y su asociación con el cáncer de colon, ninguna de dichas figuras, ni un listado de las secuencias está presente en WO03000113, por lo tanto este documento es ignorado actualmente. EMBL:DD106754 fue publicado entre las fechas de prioridad y de radicación de la presente solicitud y también es ignorado, puesto que se asume que la reivindicación de prioridad es válida.

La materia objeto reivindicada es por lo tanto novedosa sobre D1-D5.

Respecto al paso inventivo, cualquiera entre D1-D5 puede considerarse como la técnica anterior más cercana.

Como se mencionó, la diferencia entre la técnica anterior y la solicitud es un solo aminoácido en la secuencia polipéptida de DPEP1 y a primera vista, no hay un efecto técnico adicional con esta diferencia.

Además, D4 y la solicitud de patente WO0304631, de la cual EMBL registro AX775590 (D5) se deriva, ya anticipa que los ácidos nucleicos DPEP1 están sobre-expresados en tejidos cancerosos, más particularmente adenocarcinoma de colon (D4: p. 17, líneas 8-11) y tumores colorectales (WO03043631: ver el ejemplo 2) y por lo tanto revelan su uso como marcadores de cáncer.

El problema que había que resolver fue por lo tanto la provisión de ácidos nucleicos que codifican variantes de DPEP1 que podrían usarse como marcadores de cáncer.

La solución son secuencias nucleótidas que codifican al polipéptido de la SEQ ID No: 2.

En ausencia de un efecto técnico particular asociado con la variante específica DPEP1 de SEQ ID No: 2 sobre la técnica anterior, se cree que la materia objeto reivindicada sería derivable por una persona versada de la técnica anterior existente sin la aplicación de habilidades inventivas, por lo tanto debe rechazarse el paso inventivo (Artículo 33(3) PCT).

3. Aplicabilidad industrial

Parece que los requerimientos del Artículo 33(4) PCT) se han cumplido.

Re Item VI
Ciertos documentos citados

Ciertos documentos publicados

Solicitud No. Patente No.	Fecha de publicación *(día/mes/año)*	Fecha de radicación *(día/mes/año)*	Fecha de prioridad *(reivindicación válida) (día/mes/año)*

WO2006/010496	2.2.2006	15.7.2005	28.7.2004
US2005/0107595	19.5.2005	10.9.2004	

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43*bis*.1)

Date of mailing *(day/month/year)* see form PCT/ISA/210 (second sheet)	
Applicant's or agent's file reference see form PCT/ISA/220	**FOR FURTHER ACTION** See paragraph 2 below

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/US2006/013501	05.04.2006	08.04.2005

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C12N15/52 C12N15/63 C12N5/10 C12N9/48

Applicant
GENENTECH, INC.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☒ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☒ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notifed the International Bureau under Rule 66.1*bis*(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:	Date of completion of this opinion	Authorized Officer
European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	see form PCT/ISA/210	Brenz Verca, Stefano Telephone No. +49 89 2399-7702

WRITTEN OPINION O' 'HE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2006/013501

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:

   ☒ the international application in the language in which it was filed

   ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).

2. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:

   a. type of material:

      ☒ a sequence listing

      ☐ table(s) related to the sequence listing

   b. format of material:

      ☒ on paper

      ☒ in electronic form

   c. time of filing/furnishing:

      ☐ contained in the international application as filed.

      ☐ filed together with the international application in electronic form.

      ☒ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.

3. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

4. Additional comments:

Box No. II Priority

1. ☒ The validity of the priority claim has not been considered because the International Searching Authority does not have in its possession a copy of the earlier application whose priority has been claimed or, where required, a translation of that earlier application. This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date (Rules 43*bis*.1 and 64.1) is the claimed priority date.

2. ☐ This opinion has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43*bis*.1 and 64.1). Thus for the purposes of this opinion, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.

3. Additional observations, if necessary:

87

Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes:	Claims	1-6
	No:	Claims	
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	
	No:	Claims	1-6
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	1-6
	No:	Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VI Certain documents cited

1. Certain published documents (Rules 43*bis*.1 and 70.10)

and / or

2. Non-written disclosures (Rules 43*bis*.1 and 70.9)

see form 210

Re Item V.

1. Reference is made to the following documents:

D1 : DATABASE EMBL [Online] 14 November 2001 (2001-11-14), "Homo sapiens dipeptidase 1 (renal), mRNA (cDNA clone MGC:8990 IMAGE:3846046), complete CDs." XP002406227; Database accession no. BC017023

D2 : DATABASE EMBL [Online] 15 May 2003 (2003-05-15), "Homo sapiens dipeptidase 1 (renal) mRNA, complete CDs." XP002406228; Database accession no. BT006664

D3 : WO 02/064798 A (BIONOMICS LTD [AU]; KREMMIDIOTIS GABRIEL [AU]; BAIS ANTHONY JOHN [AU];) 22 August 2002 (2002-08-22)

D4 : WO 01/94629 A2 (AVALON PHARMACEUTICALS [US]) 13 December 2001 (2001-12-13)

D5 : DATABASE EMBL [Online] 9 July 2003 (2003-07-09), "Sequence 6 from Patent WO03043631." XP002406413; Database accession no. AX775590

D6: DATABASE EMBL [Online] 25 November 2005 (2005-11-25), "Compositions and Methods for the Diagnosis and Treatment of Tumor." XP002406229; Database accession no. DD106754

2. Novelty (Article 33(2) PCT) and inventive step (Article 33(3) PCT)

Prior art documents **D1-D5** all disclose a microsomal dipeptidase (DPEP1) having one amino acid difference from the polypeptide of SEQ ID No: 2 of the application (Glu vs. Gln at position 351, respectively), as well as polynucleotides encoding said enzyme and vectors and host cells comprising said polynucleotides (please refer to the corresponding passages cited in the International Search Report).

SEQ ID No: 1 of the application has 100.00 % identity (100.00 % ungapped) over its entire length with EMBL:DD106754 derived from patent JP2004537534T published on 16 December 2004, which is a family member of the patent application WO03000113 cited in the International Search Report. Although WO03000113 mentions the Tat113 nucleic acids (figure 30, SEQ ID No: 30) apparently corresponding to the nucleic acids of the present application and their association with colon cancer, neither such figures, nor a sequence listing are present in WO03000113, therefore this document is currently disregarded. EMBL:DD106754 was published between the priority and filing dates of the present application and is also disregarded, as the priority claim is assumed to be valid.

The claimed subject-matter is thus formally novel over D1-D5.

Bq

With regard to inventive step, anyone of D1-D5 can be considered the closest prior art.

As mentioned, the difference between the prior art and the application is one single amino acid in the polypeptide sequence of DPEP1 and prima facie, there is no additional technical effect associated with this difference.

Furthermore, **D4** and the patent application **WO03043631**, from which EMBL entry AX775590 (D5) is derived, already anticipate that DPEP1 nucleic acids are overexpressed in cancerous tissue, more particularly colon adenocarcinoma (D4: p. 17, lines 8-11) and colorectal tumours (**WO03043631**: see example 2) and thus disclose their use as cancer markers.

The problem to be solved was thus the provision of nucleic acids encoding variants of DPEP1 which could be used as cancer markers.

The solution are nucleotide sequences encoding the polypeptide of SEQ ID No: 2.

In absence of any particular technical effect associated with the specific DPEP1 variant of SEQ ID No: 2 over the prior art, it is believed that the claimed subject-matter would be derivable by a skilled person from the existing prior art without application of inventive skills, therefore inventive step must be denied (Article 33(3) PCT).

3. Industrial applicability

The requirements of Article 33(4) PCT appear to be fulfilled.

Re Item VI
Certain documents cited

Certain published documents

Application No Patent No	Publication date *(day/month/year)*	Filing date *(day/month/year)*	Priority date *(valid claim)* *(day/month/year)*

WO2006/010496	2.2.2006	15.7.2005	28.7.2004
US2005/0107595	19.5.2005	10.9.2004	

PATENTE
Expediente de Genentech nº: P5001R1P2

COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DEL TUMOR

Resumen-Objeto y Finalidad del descubrimiento

La presente invención está dirigida a composiciones de sustancias útiles para el diagnóstico y tratamiento del tumor en mamíferos, así como los métodos para usar dichas composiciones de sustancias con el mismo objetivo.

92

COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DEL TUMOR

ÁMBITO DE LA INVENCIÓN

La presente invención está dirigida a composiciones de sustancias útiles para el diagnóstico y tratamiento del tumor en mamíferos, así como los métodos para usar dichas composiciones de sustancias con el mismo objetivo.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Los tumores malignos (cánceres) son la segunda causa principal de muerte en Estados Unidos, después de la enfermedad cardíaca (Boring y col., *CA Cancel J. Clin.* 43:7 (1993)). El cáncer se caracteriza por el aumento de la cantidad de células anormales, o neoplásicas, derivadas de un tejido normal que proliferan para formar una masa tumoral, la invasión por parte de estas células tumorales neoplásicas de los tejidos adyacentes y la producción de células malignas que finalmente se distribuyen a través de la sangre o el sistema linfático hasta llegar a ganglios linfáticos regionales y sitios distantes mediante un proceso denominado metástasis. En un estado canceroso, una célula prolifera en condiciones en las que las células normales no crecerían. El cáncer se manifiesta de diversas maneras y se caracteriza por diferentes grados de capacidad de invasión y agresividad.

En intentos de descubrir objetivos celulares eficaces para el diagnóstico y la terapia del cáncer, los investigadores han tratado de identificar polipéptidos transmembrana, o que por otros motivos estén asociados a la membrana, que se expresen específicamente en la superficie de una o más clases particulares de células cancerosas en comparación con los expresados en una o más células normales no cancerosas. A menudo, estos polipéptidos asociados a la membrana se expresan con mayor abundancia en la superficie de las células cancerosas en comparación con los expresados en la superficie de las células no cancerosas. La identificación de estos polipéptidos antígenos asociados al tumor que se expresan en la superficie celular ha dado pie a la capacidad de atacar de forma específica células cancerosas para destruirlas a través de terapias basadas en anticuerpos. A este respecto, cabe destacar que la terapia basada en anticuerpos ha resultado muy eficaz en el tratamiento de ciertos cánceres. Por ejemplo, HERCEPTIN® y RITUXAN® (ambos de Genentech Inc., South San Francisco, California) son anticuerpos que se han utilizado con éxito para el tratamiento del cáncer de mama y el linfoma no Hodgkin, respectivamente. Más concretamente, HERCEPTIN® es un anticuerpo monoclonal humanizado derivado de ADN recombinante que se une selectivamente al dominio extracelular del protooncogén del receptor 2 del factor de crecimiento

epidérmico humano (HER2). En el 25-30% de los cánceres primarios de mama se observa una sobreexpresión de la proteína del HER2. RITUXAN® es un anticuerpo monoclonal quimérico humano/murino creado mediante ingeniería genética y dirigido contra el antígeno CD20 que se encuentra en la superficie de linfocitos B malignos y normales. Estos dos anticuerpos se producen de forma recombinante en células CHO.

En otros intentos de descubrir objetivos celulares eficaces para el diagnóstico y la terapia del cáncer, los investigadores han tratado de identificar (1) polipéptidos no asociados a la membrana que produzcan una o más clases en particular de células cancerosas en comparación con los producidos por una o más clases en particular de células normales no cancerosas, (2) polipéptidos que produzcan células cancerosas a un nivel de expresión significativamente mayor que el observado en una o más células normales no cancerosas, o (3) polipéptidos cuya expresión se limite específicamente a una única clase de tejido (o una cantidad muy limitada de éstas) en estado tanto canceroso como no canceroso (por ejemplo, tejido prostático normal y tumoral). Dichos polipéptidos pueden permanecer ubicados en zona intracelular, o la célula cancerosa puede segregarlos. Además, puede que la célula cancerosa en sí no exprese estos polipéptidos sino que lo hagan células que produzcan y/o segreguen polipéptidos que potencien o mejoren el crecimiento de las células cancerosas. Estos polipéptidos segregados son a menudo proteínas que ofrecen a las células cancerosas una ventaja en términos de crecimiento con respecto a las células normales, e incluyen elementos como, por ejemplo, factores angiogénicos, de adhesión celular, crecimiento, y similares. Se esperaría que la identificación de antagonistas de tales polipéptidos no asociados a la membrana sirviese como agente terapéutico eficaz para el tratamiento de estas clases de cáncer. Además, la identificación del modelo de expresión de dichos polipéptidos sería útil para el diagnóstico de cánceres particulares en mamíferos.

A pesar de los adelantos anteriormente identificados en la terapia del cáncer en mamíferos, existe una gran necesidad de disponer de más agentes de diagnóstico y terapéuticos capaces de, respectivamente, detectar la presencia de un tumor en un mamífero e inhibir con eficacia el crecimiento de las células neoplásicas. Por consiguiente, un objetivo de la presente invención es identificar: (1) polipéptidos asociados a la membrana celular que se expresen con mayor abundancia en una o más clases de células cancerosas en comparación con los expresados en células normales u otras clases distintas de células cancerosas, (2) polipéptidos no asociados a la membrana que produzcan específicamente una o más clases en particular de células cancerosas (u otras células que produzcan polipéptidos que potencien el crecimiento de las células cancerosas) en comparación con los producidos por una o más clases en particular de células normales no cancerosas, (3)

polipéptidos no asociados a la membrana que produzcan células cancerosas a un nivel de expresión significativamente mayor que el observado en una o más células normales no cancerosas, o (4) polipéptidos cuya expresión se limite específicamente a una única clase de tejido (o una cantidad muy limitada de éstas) en estado tanto canceroso como no canceroso (por ejemplo, tejido prostático normal y tumoral), y usar esos polipéptidos, así como sus ácidos nucleicos codificadores, para producir composiciones de sustancias útiles para el tratamiento terapéutico y la detección diagnóstica del cáncer en mamíferos. También es un objetivo de la presente invención identificar polipéptidos segregados o intracelulares, asociados a la membrana celular, cuya expresión se limite a una única clase de tejido, o una cantidad muy limitada de éstas, así como sus ácidos nucleicos codificadores, para producir composiciones de sustancias útiles para el tratamiento terapéutico y la detección diagnóstica del cáncer en mamíferos.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

A. Realizaciones

En la presente especificación, los candidatos describen por primera vez la identificación de varios polipéptidos celulares (y sus ácidos nucleicos codificadores o fragmentos de los mismos) que se expresan en mayor grado en la superficie de una o más clases de células cancerosas, o éstas mismas expresan, en comparación con los expresados en la superficie de una o más clases de células normales no cancerosas, o que éstas mismas expresan. De forma alternativa, la expresión de estos polipéptidos corre a cargo de células que producen y/o segregan polipéptidos que potencian o mejoran el crecimiento de las células cancerosas. De nuevo, de forma alternativa, las células tumorales, en comparación con las células normales de la misma clase de tejido, no pueden sobreexpresar dichos polipéptidos, pero, en su lugar, éstos pueden verse expresados específicamente por las células tanto tumorales como normales de sólo una única clase de tejido, o una cantidad muy limitada de éstas (preferentemente, tejidos que no sean esenciales para la vida, por ejemplo, el prostático, etc.). En la presente memoria descriptiva, a todos los polipéptidos indicados anteriormente se hace referencia como polipéptidos "Objetivo antigénicos asociados al tumor" (polipéptidos "TAT", por sus siglas en inglés), y se espera que sirvan como objetivos eficaces para la terapia y el diagnóstico del cáncer en mamíferos.

Por consiguiente, en una realización de la presente invención, ésta ofrece una molécula aislada de ácidos nucleicos con una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido objetivo antigénico asociado al tumor o un fragmento del mismo (un polipéptido "TAT").

En ciertos aspectos, la molécula aislada de ácidos nucleicos comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80% de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos, y alternativamente al menos un 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos, de (a) una molécula de ADN que codifica un polipéptido TAT de longitud completa que tiene una secuencia de aminoácidos, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, una secuencia de aminoácidos de un polipéptido TAT carente del péptido de señal, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, un dominio extracelular de un polipéptido TAT transmembrana, con o sin el péptido de señal, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, o cualquier otro fragmento definido específicamente de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido TAT de longitud completa, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, o (b) el complemento de la molécula de ADN de (a).

En otros aspectos, la molécula aislada de ácidos nucleicos comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80% de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos, y alternativamente al menos un 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos, de (a) una molécula de ADN que contiene la secuencia codificadora de un ADNc polipéptido TAT de longitud completa, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, la secuencia codificadora de un polipéptido TAT carente del péptido de señal, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, la secuencia codificadora de un dominio extracelular de un polipéptido TAT transmembrana, con o sin el péptido de señal, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, o la secuencia codificadora de cualquier otro fragmento definido específicamente de la secuencia de aminoácidos del polipéptido TAT de longitud completa, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, o (b) el complemento de la molécula de ADN de (a).

En otros aspectos adicionales, la invención trata con una molécula aislada de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80% de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos, y alternativamente al menos un 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos, de (a) una molécula de ADN que codifica el mismo polipéptido maduro codificado por la región codificadora de longitud completa de cualquiera de los ADNc de proteína humana depositados en la ATCC, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, o (b) el complemento de la molécula de ADN de (a).

Otro aspecto de la invención ofrece una molécula aislada de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido TAT que se elimina o inactiva en el dominio transmembrana, o es complementario de dicha secuencia de nucleótidos codificadora, y cuyo(s) dominio(s) transmembrana se detalla(n) en la presente memoria descriptiva. Por tanto, se contemplan los dominios extracelulares solubles de los polipéptidos TAT descritos en la presente memoria descriptiva.

En otros aspectos, la presente invención se centra en moléculas aisladas de ácidos nucleicos que hibridan en (a) una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido TAT que tiene una secuencia de aminoácidos de longitud completa, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, una secuencia de aminoácidos de un polipéptido TAT carente del péptido de señal, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, un dominio extracelular de un polipéptido TAT transmembrana, con o sin el péptido de señal, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, o cualquier otro fragmento definido específicamente de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido TAT de longitud completa, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, o (b) el complemento de la secuencia de nucleótidos de (a). En este aspecto, una realización de la presente invención se centra en fragmentos de la secuencia codificadora de un polipéptido TAT de longitud completa, o el complemento del mismo, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, que se puede utilizar como, por ejemplo, sonda de hibridación útil como, por ejemplo, sonda de diagnóstico, cebador de PCR o sonda antisentido de oligonucleótidos, o para codificar fragmentos de un polipéptido TAT de longitud completa que, opcionalmente, puede codificar un polipéptido que comprenda un sitio de unión para un anticuerpo anti-polipéptido TAT, un oligopéptido que se una a un TAT u otra molécula orgánica pequeña que se una a un polipéptido TAT. La longitud de estos fragmentos de ácidos nucleicos es por lo general de alrededor de 5 nucleótidos, y alternativamente de al menos alrededor de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, o 1.000 nucleótidos, donde, en este contexto, el término "alrededor de" significa la longitud de referencia de la secuencia de nucleótidos ±10%. Además, dichos fragmentos de ácidos nucleicos normalmente comprenden nucleótidos consecutivos derivados de la secuencia codificadora de

97

longitud completa de un polipéptido TAT o el complemento del mismo. Cabe destacar que los fragmentos nuevos de una secuencia de nucleótidos que codifique un polipéptido TAT, o el complemento del mismo, pueden determinarse de forma rutinaria alineando dicha secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido TAT con otras secuencias de nucleótidos conocidas utilizando cualquiera de una serie de programas bien conocidos de alineación de secuencias y determinando qué fragmento(s) de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido TAT, o el complemento del mismo, es(son) nuevo(s). Todos estos fragmentos nuevos de las secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos TAT, o los complementos de los mismos, se contemplan en la presente memoria descriptiva. También se contemplan los fragmentos de polipéptidos TAT codificados por estos fragmentos de moléculas de nucleótidos, preferentemente aquéllos que comprendan un sitio de unión para un anticuerpo anti-polipéptido TAT, un oligopéptido que se una a un TAT u otra molécula orgánica pequeña que se una a un polipéptido TAT.

En otra realización, la invención ofrece polipéptidos TAT aislados codificados por cualquiera de las secuencias aisladas de ácidos nucleicos anteriormente identificadas.

En cierto aspecto, la invención trata con un polipéptido TAT aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos, y alternativamente al menos un 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de la secuencia de aminoácidos, de un polipéptido TAT que tiene una secuencia de aminoácidos de longitud completa, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, una secuencia de aminoácidos de un polipéptido TAT carente del péptido de señal, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, un dominio extracelular de una proteína de un polipéptido TAT transmembrana, con o sin el péptido de señal, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, una secuencia de aminoácidos codificada por cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos detalladas en la presente memoria descriptiva o cualquier otro fragmento definido específicamente de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido TAT de longitud completa, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva.

En otro aspecto adicional, la invención trata con un polipéptido TAT aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos, y alternativamente al menos un 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de la secuencia de aminoácidos, de una secuencia de aminoácidos codificada por cualquiera de los ADNc de proteína humana depositados en la ATCC tal como se detalla en la presente memoria descriptiva.

En un aspecto aún más adicional, la invención trata con un polipéptido TAT aislado que comprende una secuencia de aminoácidos y es codificado por una secuencia de nucleótidos que hibrida con el complemento de una molécula de ADN que codifica (a) un polipéptido TAT que tiene una secuencia de aminoácidos de longitud completa, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, (b) una secuencia de aminoácidos de un polipéptido TAT carente del péptido de señal, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, (c) un dominio extracelular de una proteína de un polipéptido TAT transmembrana, con o sin el péptido de señal, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, (d) una secuencia de aminoácidos codificada por cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva o (e) cualquier otro fragmento específicamente definido de una secuencia de aminoácidos de un polipéptido TAT de longitud completa, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva.

En un aspecto específico, la invención ofrece un polipéptido TAT aislado sin la secuencia de señal del terminal N y/o sin la metionina iniciadora, que está codificado por una secuencia de nucleótidos que codifica tal secuencia de aminoácidos, tal como se ha descrito anteriormente en la presente memoria descriptiva. Los procesos para producir dicho polipéptido también se describen en la presente memoria descriptiva. Estos procesos comprenden el cultivo de una célula huésped con un vector que contiene la molécula de ácidos nucleicos codificadora apropiada bajo las condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido TAT y su recuperación del cultivo celular.

Otro aspecto de la invención proporciona un polipéptido TAT aislado que se elimina o inactiva en el dominio transmembrana. Los procesos para producir dicho polipéptido también se describen en la presente memoria descriptiva. Estos procesos comprenden el cultivo de una célula huésped con un vector que contiene la molécula de ácidos nucleicos codificadora apropiada bajo las condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido TAT y su recuperación del cultivo celular.

En otras realizaciones de la presente invención, ésta ofrece vectores que contienen ADN que codifica cualquiera de los polipéptidos descritos en la presente memoria descriptiva. También se proporcionan las células huésped que comprenden cualquiera de estos vectores. A modo de ejemplo, las células huésped pueden ser de CHO, *E. coli* o levadura. También se proporciona un proceso para producir cualquiera de los polipéptidos descritos en la presente memoria descriptiva que comprende el cultivo de células huésped bajo las condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido deseado y su recuperación del cultivo celular.

En otras realizaciones, la invención proporciona polipéptidos quiméricos aislados que contienen cualquiera de los polipéptidos TAT descritos en la presente memoria descriptiva fusionado con un polipéptido heterólogo (no TAT). Un ejemplo de dichas moléculas quiméricas

comprende cualquiera de los polipéptidos TAT descritos en la presente memoria descriptiva fusionado con un polipéptido heterólogo como, por ejemplo, una secuencia de señales de epítopos o una región Fc de una inmunoglobulina.

En otra realización, la invención ofrece un anticuerpo que se une, preferentemente de forma específica, a cualquiera de los polipéptidos descritos anteriormente o más adelante. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo de cadena única o un anticuerpo que inhiba competitivamente la unión de un anticuerpo anti-polipéptido TAT a su correspondiente epítopo antigénico. Los anticuerpos de la presente invención pueden conjugarse opcionalmente con un agente inhibidor del crecimiento o un agente citotóxico como una toxina, incluyendo, por ejemplo, un maitansinoide o una caliqueamicina, un antibiótico, un isótopo radioactivo, una enzima nucleolítica o similares. Los anticuerpos de la presente invención pueden producirse opcionalmente en células CHO o bacterianas y, preferentemente, inhiben el crecimiento o la proliferación, o bien inducen la muerte, de una célula a la que se unen. Con fines de diagnóstico, los anticuerpos de la presente invención pueden marcarse de forma detectable, unirse a un soporte sólido, etc.

En otras realizaciones de la presente invención, ésta ofrece vectores que contienen ADN que codifica cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente memoria descriptiva. También se proporciona la célula huésped que comprende cualquiera de estos vectores. A modo de ejemplo, las células huésped pueden ser de CHO, *E. coli* o levadura. También se proporciona un proceso para producir cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente memoria descriptiva que comprende el cultivo de células huésped bajo las condiciones adecuadas para la expresión del anticuerpo deseado y su recuperación del cultivo celular.

En otra realización, la invención ofrece oligopéptidos ("oligopéptidos que se unen a un TAT") que se unen, preferentemente de forma específica, a cualquiera de los polipéptidos TAT descritos anteriormente o más adelante. Los oligopéptidos que se unen a un TAT de la presente invención pueden conjugarse opcionalmente con un agente inhibidor del crecimiento o un agente citotóxico como una toxina, incluyendo, por ejemplo, un maitansinoide o una caliqueamicina, un antibiótico, un isótopo radioactivo, una enzima nucleolítica o similares. Los oligopéptidos que se unen a un TAT de la presente invención pueden producirse opcionalmente en células CHO o bacterianas y, preferentemente, inhiben el crecimiento o la proliferación, o bien inducen la muerte, de una célula a la que se unen. Con fines de diagnóstico, los oligopéptidos que se unen a un TAT de la presente invención pueden marcarse de forma detectable, unirse a un soporte sólido, etc.

En otras realizaciones de la presente invención, ésta ofrece vectores que contienen ADN que codifica cualquiera de los oligopéptidos que se unen a un TAT descritos en la presente memoria descriptiva. También se proporciona la célula huésped que comprende cualquiera de estos vectores. A modo de ejemplo, las células huésped pueden ser de CHO, *E. coli* o levadura. También se proporciona un proceso para producir cualquiera de los oligopéptidos que se unen a un TAT descritos en la presente memoria descriptiva que comprende el cultivo de células huésped bajo las condiciones adecuadas para la expresión del oligopéptido deseado y su recuperación del cultivo celular.

En otra realización, la invención ofrece moléculas orgánicas pequeñas ("moléculas orgánicas que se unen a un TAT") que se unen, preferentemente de forma específica, a cualquiera de los polipéptidos TAT descritos anteriormente o más adelante. Las moléculas orgánicas que se unen a un TAT de la presente invención pueden conjugarse opcionalmente con un agente inhibidor del crecimiento o un agente citotóxico como una toxina, incluyendo, por ejemplo, un maitansinoide o una caliqueamicina, un antibiótico, un isótopo radioactivo, una enzima nucleolítica o similares. Las moléculas orgánicas que se unen a un TAT de la presente invención preferentemente inhiben el crecimiento o la proliferación, o bien inducen la muerte, de una célula a la que se unen. Con fines de diagnóstico, las moléculas orgánicas que se unen a un TAT de la presente invención pueden marcarse de forma detectable, unirse a un soporte sólido, etc.

En una realización aún más adicional, la invención trata con una composición de sustancias que contiene un polipéptido TAT, tal como se describe en la presente memoria descriptiva, un polipéptido TAT quimérico, tal como se describe en la presente memoria descriptiva, un anticuerpo anti-TAT, tal como se describe en la presente memoria descriptiva, un oligopéptido que se une a un TAT, tal como se describe en la presente memoria descriptiva, o una molécula orgánica que se une a un TAT, tal como se describe en la presente memoria descriptiva, en combinación con un vehículo. Opcionalmente, el vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otra realización, la invención trata con un artículo fabricado formado por un envase contenedor lleno de una composición de sustancias que puede contener un polipéptido TAT, tal como se describe en la presente memoria descriptiva, un polipéptido TAT quimérico, tal como se describe en la presente memoria descriptiva, un anticuerpo anti-TAT, tal como se describe en la presente memoria descriptiva, un oligopéptido que se une a un TAT, tal como se describe en la presente memoria descriptiva, o una molécula orgánica que se une a un TAT, tal como se describe en la presente memoria descriptiva. El artículo también puede contener opcionalmente una etiqueta

101

adjunta al envase contenedor, o un prospecto incluido en éste, que haga referencia al uso de la composición de sustancias para el tratamiento terapéutico o la detección diagnóstica de un tumor.

Otra realización de la presente invención se centra en el uso de un polipéptido TAT, tal como se describe en la presente memoria descriptiva, un polipéptido TAT quimérico, tal como se describe en la presente memoria descriptiva, un anticuerpo anti-polipéptidos TAT, tal como se describe en la presente memoria descriptiva, un oligopéptido que se une a un TAT, tal como se describe en la presente memoria descriptiva, o una molécula orgánica que se une a un TAT, tal como se describe en la presente memoria descriptiva, para preparar un medicamento útil en el tratamiento de una afección susceptible al polipéptido TAT, el polipéptido TAT quimérico, el anticuerpo anti-polipéptidos TAT, el oligopéptido que se une a un TAT o la molécula orgánica que se une a un TAT.

B. Realizaciones adicionales

Otra realización de la presente invención se centra en un método para inhibir el crecimiento de una célula que exprese un polipéptido TAT que consiste en poner en contacto la célula con un anticuerpo, un oligopéptido o una molécula orgánica pequeña que se une al polipéptido TAT, causando dicha unión la inhibición del crecimiento de la célula que expresa el polipéptido TAT. En realizaciones preferentes, la célula es cancerosa, y la unión del anticuerpo, el oligopéptido o la molécula orgánica al polipéptido TAT causa la muerte de la célula que expresa el polipéptido TAT. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo de cadena única. Los anticuerpos, los oligopéptidos que se unen a un TAT y las moléculas orgánicas que se unen a un TAT empleados en los métodos de la presente invención pueden conjugarse opcionalmente con un agente inhibidor del crecimiento o un agente citotóxico como una toxina, incluyendo, por ejemplo, un maitansinoide o una caliqueamicina, un antibiótico, un isótopo radioactivo, una enzima nucleolítica o similares. Los anticuerpos y los oligopéptidos que se unen a un TAT empleados en los métodos de la presente invención pueden producirse opcionalmente en células CHO o bacterianas.

Otra realización de la presente invención se centra en un método para tratar terapéuticamente a un mamífero que tenga un tumor canceroso con células que expresen un polipéptido TAT y que consiste en administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo, un oligopéptido o una molécula orgánica pequeña que se une al polipéptido TAT, lo cual resulta por tanto en el tratamiento terapéutico eficaz del tumor. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un

anticuerpo de cadena única. Los anticuerpos, los oligopéptidos que se unen a un TAT y las moléculas orgánicas que se unen a un TAT empleados en los métodos de la presente invención pueden conjugarse opcionalmente con un agente inhibidor del crecimiento o un agente citotóxico como una toxina, incluyendo, por ejemplo, un maitansinoide o una caliqueamicina, un antibiótico, un isótopo radioactivo, una enzima nucleolítica o similares. Los anticuerpos y oligopéptidos empleados en los métodos de la presente invención pueden producirse opcionalmente en células CHO o bacterianas.

Otra realización de la presente invención se centra en un método para determinar la presencia de un polipéptido TAT en una muestra de la cual se sospeche que lo contenga y que consiste en exponer la muestra a un anticuerpo, un oligopéptido o una molécula orgánica pequeña que se une al polipéptido TAT y determinar la unión en la muestra de cualquiera de estos tres agentes al polipéptido TAT, considerando que la evidencia de esta unión indicaría la presencia del polipéptido TAT en la muestra. Opcionalmente, la muestra puede contener células (que podrían ser cancerosas) de las cuales se sospeche que expresen el polipéptido TAT. El anticuerpo, el oligopéptido que se une a un TAT o la molécula orgánica que se une a un TAT empleado en el método puede opcionalmente marcarse de forma detectable, unirse a un soporte sólido, etc.

Otra realización de la presente invención se centra en un método para diagnosticar la presencia de un tumor en un mamífero que consiste en detectar el nivel de expresión de un gen que codifica un polipéptido TAT en (a) una muestra de prueba de células tisulares obtenida de dicho mamífero, y (b) una muestra de control de células no cancerosas normales conocidas del mismo origen o clase tisular, considerando que un nivel superior de la expresión del polipéptido TAT en la prueba de muestra, en comparación con el observado en la prueba de control, indicaría la presencia del tumor en el mamífero del cual se obtuvo la muestra de prueba.

Otra realización de la presente invención se centra en un método para diagnosticar la presencia de un tumor en un mamífero que consiste en (a) poner en contacto una muestra de prueba que contiene células tisulares obtenidas de dicho mamífero con un anticuerpo, un oligopéptido o una molécula orgánica pequeña que se une a un polipéptido TAT y (b) detectar la formación de un complejo entre el anticuerpo, el oligopéptido o la molécula orgánica pequeña y el polipéptido TAT en la muestra de prueba, considerando que la formación de dicho complejo indicaría la presencia de un tumor en el mamífero. Opcionalmente, el anticuerpo, el oligopéptido que se une a un TAT o la molécula orgánica que se une a un TAT empleado se marcar de forma detectable, se une a un soporte sólido, etc., y/o la muestra de prueba de células tisulares se obtiene de un individuo del cual se sospeche que tenga un tumor canceroso.

Otra realización de la presente invención se centra en un método para tratar o prevenir un trastorno celular proliferativo asociado a una expresión o actividad alterada, preferentemente creciente, de un polipéptido TAT que consiste en administrar a un sujeto necesitado de tal tratamiento una cantidad efectiva de un antagonista de un polipéptido TAT. Preferentemente, el trastorno celular proliferativo es un cáncer y el antagonista del polipéptido TAT es un anticuerpo anti-polipéptido TAT, un oligopéptido que se une a un TAT, una molécula orgánica que se une a un TAT o un oligonucleótido antisentido. El tratamiento o la prevención eficaz del trastorno celular proliferativo puede ser el resultado de la eliminación directa o la inhibición del crecimiento de las células que expresen un polipéptido TAT, pero también se puede conseguir antagonizando la actividad de potenciación del crecimiento celular de un polipéptido TAT.

Otra realización de la presente invención se centra en un método para unir un anticuerpo, un oligopéptido o una molécula orgánica pequeña a una célula que exprese un polipéptido TAT que consiste en poner en contacto una de estas células con cualquiera de los tres agentes mencionados bajo las condiciones adecuadas para unir cualquiera de ellos a dicho polipéptido TAT y permitir la unión entre ambos elementos. En realizaciones preferentes, el anticuerpo se marca con una molécula o un compuesto útil para determinar cualitativa o cuantitativamente la ubicación y/o el grado de unión el anticuerpo, el oligopéptido o la molécula orgánica pequeña a la célula.

Otras realizaciones de la presente invención se centran en el uso de (a) un polipéptido TAT, (b) un ácido nucleico que codifique un polipéptido TAT o un vector o una célula huésped que contenga ese ácido nucleico, (c) un anticuerpo anti-polipéptido TAT, (d) un oligopéptido que se une a un TAT, o (e) una molécula orgánica pequeña que se une a un TAT, para preparar un medicamento útil para (i) el tratamiento terapéutico o la detección diagnóstica de un cáncer o tumor, o (ii) el tratamiento terapéutico o la prevención de un trastorno celular proliferativo.

Otra realización de la presente invención se centra en un método para inhibir el crecimiento de una célula cancerosa, dependiendo este crecimiento, al menos en parte, del (de los) efecto(s) de potenciación del crecimiento de un polipéptido TAT (pudiendo este polipéptido TAT verse expresado por la propia célula cancerosa en sí o una célula que produzca polipéptidos que tengan un efecto de potenciación del crecimiento en células cancerosas). Este método consiste en poner en contacto el polipéptido TAT con un anticuerpo, un oligopéptido o una molécula orgánica pequeña que se una a él, antagonizando por tanto su actividad de potenciación del crecimiento y, además, inhibiendo el crecimiento de la célula cancerosa. Preferentemente, el crecimiento de la célula cancerosa se inhibe por completo. Aún más preferentemente, la unión del anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica pequeña al polipéptido TAT induce la muerte de la célula cancerosa.

Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo de cadena única. Los anticuerpos, los oligopéptidos que se unen a un TAT y las moléculas orgánicas que se unen a un TAT empleados en los métodos de la presente invención pueden conjugarse opcionalmente con un agente inhibidor del crecimiento o un agente citotóxico como una toxina, incluyendo, por ejemplo, un maitansinoide o una caliqueamicina, un antibiótico, un isótopo radioactivo, una enzima nucleolítica o similares. Los anticuerpos y los oligopéptidos que se unen a un TAT empleados en los métodos de la presente invención pueden producirse opcionalmente en células CHO o bacterianas.

Otra realización de la presente invención se centra en un método para tratar terapéuticamente un tumor en un mamífero, dependiendo el crecimiento de dicho tumor, al menos en parte, del (de los) efecto(s) de potenciación del crecimiento de un polipéptido TAT. Este método consiste en administrar a un mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo, un oligopéptido o una molécula orgánica pequeña que se una al polipéptido TAT, antagonizando por tanto la actividad de potenciación del crecimiento de dicho polipéptido TAT y resultando en el tratamiento terapéutico eficaz del tumor. Opcionalmente, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo de cadena única. Los anticuerpos, los oligopéptidos que se unen a un TAT y las moléculas orgánicas que se unen a un TAT empleados en los métodos de la presente invención pueden conjugarse opcionalmente con un agente inhibidor del crecimiento o un agente citotóxico como una toxina, incluyendo, por ejemplo, un maitansinoide o una caliqueamicina, un antibiótico, un isótopo radioactivo, una enzima nucleolítica o similares. Los anticuerpos y oligopéptidos empleados en los métodos de la presente invención pueden producirse opcionalmente en células CHO o bacterianas.

C. Otras realizaciones adicionales

En otras realizaciones adicionales, la invención se centra en el siguiente grupo de reivindicaciones potenciales para esta solicitud:

1. Ácido nucleico aislado que tiene una secuencia de nucleótidos con al menos un 80% de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos de:

(a) una molécula de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO:2 (Identificador de secuencia nº 2);

(b) una molécula de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO:2, careciendo de su péptido de señal asociado;

(c) una molécula de ADN que codifica un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, con su péptido de señal asociado;

(d) una molécula de ADN que codifica un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, careciendo de su péptido de señal asociado;

(e) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1 (Identificador de secuencia nº 1);

(f) la secuencia codificadora de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1; o

(g) el complemento de (a), (b), (c), (d), (e) o (f).

2. Ácido nucleico aislado que tiene:

(a) una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO:2;

(b) una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO:2, careciendo de su péptido de señal asociado;

(c) una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, con su péptido de señal asociado;

(d) una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, careciendo de su péptido de señal asociado;

(e) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1;

(f) la región codificadora de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1; o

(g) el complemento de (a), (b), (c), (d), (e) o (f).

3. Ácido nucleico aislado que hibrida con:

(a) un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO:2;

(b) un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO:2, careciendo de su péptido de señal asociado;

(c) un ácido nucleico que codifica un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, con su péptido de señal asociado;

(d) un ácido nucleico que codifica un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, careciendo de su péptido de señal asociado;

(e) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1;

(f) la región codificadora de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1; o

(g) el complemento de (a), (b), (c), (d), (e) o (f).

4. El ácido nucleico de la Reivindicación 3, produciéndose la hibridación bajo condiciones rigurosas.

5. El ácido nucleico de la Reivindicación 3, cuya longitud es al menos de 5 nucleótidos.

6. Un vector de expresión que contiene el ácido nucleico de la Reivindicación 1, 2 ó 3.

7. El vector de expresión de la Reivindicación 6, donde dicho ácido nucleico se enlaza de forma operable para controlar secuencias reconocidas por una célula huésped transformada con el vector.

8. Una célula huésped que contiene el vector de expresión de la Reivindicación 7.

9. La célula huésped de la Reivindicación 8, que es de CHO, *E. coli* o levadura.

10. Un proceso para producir un polipéptido que consiste en cultivar la célula huésped de la Reivindicación 8 bajo condiciones adecuadas para la expresión de dicho polipéptido y recuperar a éste del cultivo celular.

11. Un polipéptido aislado que tiene al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos de:

(a) el polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2;

(b) el polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, careciendo de su péptido de señal asociado;

(c) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, con su péptido de señal asociado;

(d) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, careciendo de su péptido de señal asociado;

(e) un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1; o

(f) un polipéptido codificado por la región codificadora de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1.

12. Un polipéptido aislado que tiene:

(a) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO:2;

(b) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO:2, careciendo de su secuencia de péptidos de señal asociados;

(c) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, con su secuencia de péptidos de señal asociados;

(d) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, careciendo de su secuencia de péptidos de señal asociados;

(e) una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1; o

(f) una secuencia de aminoácidos codificada por la región codificadora de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1.

13. Un polipéptido quimérico que contiene el polipéptido de la Reivindicación 11 ó 12 fusionado con un polipéptido heterólogo.

14. El polipéptido quimérico de la Reivindicación 13, donde dicho polipéptido heterólogo en una secuencia de señales de epítopos o una región Fc de una inmunoglobulina.

15. Un anticuerpo aislado que se une a un polipéptido que tiene al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos de:

(a) el polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2;

(b) el polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, careciendo de su péptido de señal asociado;

(c) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, con su péptido de señal asociado;

(d) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, careciendo de su péptido de señal asociado;

(e) un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1; o

(f) un polipéptido codificado por la región codificadora de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1.

16. Un anticuerpo aislado que se une a un polipéptido que tiene:

(a) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO:2;

(b) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO:2, careciendo de su secuencia de péptidos de señal asociados;

(c) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, con su secuencia de péptidos de señal asociados;

(d) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, careciendo de su secuencia de péptidos de señal asociados;

(e) una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1; o

(f) una secuencia de aminoácidos codificada por la región codificadora de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1.

17. El anticuerpo de la Reivindicación 15 ó 16, que es un anticuerpo monoclonal.

18. El anticuerpo de la Reivindicación 15 ó 16, que es un fragmento de anticuerpo.

19. El anticuerpo de la Reivindicación 15 ó 16, que es un anticuerpo quimérico o humanizado.

20. El anticuerpo de la Reivindicación 15 ó 16, que se conjuga con un agente inhibidor del crecimiento.

21. El anticuerpo de la Reivindicación 15 ó 16, que se conjuga con un agente citotóxico.

22. El anticuerpo de la Reivindicación 21, donde el agente citotóxico se selecciona del grupo compuesto por toxinas, antibióticos, isótopos radioactivos y enzimas nucleolíticas.

23. El anticuerpo de la Reivindicación 21, donde el agente citotóxico es una toxina.

24. El anticuerpo de la Reivindicación 23, donde la toxina se selecciona del grupo compuesto por maitansinoide y caliqueamicina.

25. El anticuerpo de la Reivindicación 23, donde la toxina es un maitansinoide.

26. El anticuerpo de la Reivindicación 15 ó 16, que se produce en bacterias.

27. El anticuerpo de la Reivindicación 15 ó 16, que se produce en células CHO.

28. El anticuerpo de la Reivindicación 15 ó 16, que induce la muerte de una célula a la cual se une.

29. El anticuerpo de la Reivindicación 15 ó 16, que se marca de forma detectable.

30. Un ácido nucleico aislado que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo de la Reivindicación 15 ó 16.

31. Un vector de expresión que contiene el ácido nucleico de la Reivindicación 30 enlazado de forma operable para controlar secuencias reconocidas por una célula huésped transformada con el vector.

32. Una célula huésped que contiene el vector de expresión de la Reivindicación 31.

33. La célula huésped de la Reivindicación 32, que es de CHO, *E. coli* o levadura.

34. Un proceso para producir un anticuerpo que consiste en cultivar la célula huésped de la Reivindicación 32 bajo condiciones adecuadas para la expresión de dicho anticuerpo y recuperar a éste del cultivo celular.

35. Un oligopéptido aislado que se une a un polipéptido que tiene al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos de:

(a) el polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2;

(b) el polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, careciendo de su péptido de señal asociado;

(c) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, con su péptido de señal asociado;

(d) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, careciendo de su péptido de señal asociado;

(e) un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1; o

(f) un polipéptido codificado por la región codificadora de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1.

36. Un oligopéptido aislado que se une a un polipéptido que tiene:

(a) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO:2;

(b) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO:2, careciendo de su secuencia de péptidos de señal asociados;

(c) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, con su secuencia de péptidos de señal asociados;

(d) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, careciendo de su secuencia de péptidos de señal asociados;

(e) una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1; o

(f) una secuencia de aminoácidos codificada por la región codificadora de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1.

37. El oligopéptido de la Reivindicación 35 ó 36, que se conjuga con un agente inhibidor del crecimiento.

38. El oligopéptido de la Reivindicación 35 ó 36, que se conjuga con un agente citotóxico.

39. El oligopéptido de la Reivindicación 38, donde el agente citotóxico se selecciona del grupo compuesto por toxinas, antibióticos, isótopos radioactivos y enzimas nucleolíticas.

40. El oligopéptido de la Reivindicación 38, donde el agente citotóxico es una toxina.

41. El oligopéptido de la Reivindicación 40, donde la toxina se selecciona del grupo compuesto por maitansinoide y caliqueamicina.

42. El oligopéptido de la Reivindicación 40, donde la toxina es un maitansinoide.

43. El oligopéptido de la Reivindicación 35 ó 36, que induce la muerte de una célula a la cual se une.

MO

44. El oligopéptido de la Reivindicación 35 ó 36, que se marca de forma detectable.

45. Una molécula orgánica que se une a un polipéptido TAT que tiene al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos de:

(a) el polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2;

(b) el polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, careciendo de su péptido de señal asociado;

(c) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, con su péptido de señal asociado;

(d) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, careciendo de su péptido de señal asociado;

(e) un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1; o

(f) un polipéptido codificado por la región codificadora de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1.

46. La molécula orgánica de la Reivindicación 45 que se une a un polipéptido que tiene:

(a) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO:2;

(b) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO:2, careciendo de su secuencia de péptidos de señal asociados;

(c) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, con su secuencia de péptidos de señal asociados;

(d) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, careciendo de su secuencia de péptidos de señal asociados;

(e) una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1; o

(f) una secuencia de aminoácidos codificada por la región codificadora de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1.

47. La molécula orgánica de la Reivindicación 45 ó 46, que se conjuga con un agente inhibidor del crecimiento.

48. La molécula orgánica de la Reivindicación 45 ó 46, que se conjuga con un agente citotóxico.

49. La molécula orgánica de la Reivindicación 48, donde el agente citotóxico se selecciona del grupo compuesto por toxinas, antibióticos, isótopos radioactivos y enzimas nucleolíticas.

50. La molécula orgánica de la Reivindicación 48, donde el agente citotóxico es una toxina.

51. La molécula orgánica de la Reivindicación 50, donde la toxina se selecciona del grupo compuesto por maitansinoide y caliqueamicina.

52. La molécula orgánica de la Reivindicación 50, donde la toxina es un maitansinoide.

53. La molécula orgánica de la Reivindicación 45 ó 46, que induce la muerte de una célula a la cual se une.

54. La molécula orgánica de la Reivindicación 45 ó 46, que se marca de forma detectable.

55. Una composición de sustancias que contiene:

(a) el polipéptido de la Reivindicación 11;

(b) el polipéptido de la Reivindicación 12;

(c) el polipéptido quimérico de la Reivindicación 13;

(d) el anticuerpo de la Reivindicación 15;

(e) el anticuerpo de la Reivindicación 16;

(f) el oligopéptido de la Reivindicación 35;

(g) el oligopéptido de la Reivindicación 36;

(h) la molécula orgánica que se une a un TAT de la Reivindicación 45; o

(i) la molécula orgánica que se une a un TAT de la Reivindicación 46; en combinación con un vehículo.

56. La composición de sustancias de la Reivindicación 55, donde dicho vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable.

57. Un artículo fabricado que contiene:

(a) un envase contenedor; y

(b) la composición de sustancias de la Reivindicación 55 dentro de dicho envase contenedor.

58. El artículo fabricado de la Reivindicación 57 también contiene una etiqueta adjunta a dicho envase contenedor, o un prospecto incluido en éste, que haga referencia al uso de la composición de sustancias para el tratamiento terapéutico o la detección diagnóstica de un cáncer.

59. Un método para inhibir el crecimiento de una célula que expresa una proteína que tenga al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos de:

(a) el polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2;

(b) el polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, careciendo de su péptido de señal asociado;

(c) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, con su péptido de señal asociado;

(d) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, careciendo de su péptido de señal asociado;

(e) un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1; o

(f) un polipéptido codificado por la región codificadora de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1, donde dicho método consiste en poner en contacto esa célula con un anticuerpo, un oligopéptido o una molécula orgánica que se une a dicha proteína, causando por tanto esa unión una inhibición del crecimiento de esa célula.

60. El método de la Reivindicación 59, donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

61. El método de la Reivindicación 59, donde dicho anticuerpo es un fragmento de anticuerpo.

62. El método de la Reivindicación 59, donde dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado.

63. El método de la Reivindicación 59, donde dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica se conjuga con un agente inhibidor del crecimiento.

64. El método de la Reivindicación 59, donde dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica se conjuga con un agente citotóxico.

65. El método de la Reivindicación 64, donde el agente citotóxico se selecciona del grupo compuesto por toxinas, antibióticos, isótopos radioactivos y enzimas nucleolíticas.

66. El método de la Reivindicación 64, donde el agente citotóxico es una toxina.

67. El método de la Reivindicación 66, donde la toxina se selecciona del grupo compuesto por maitansinoide y caliqueamicina.

68. El método de la Reivindicación 66, donde la toxina es un maitansinoide.

69. El método de la Reivindicación 59, donde dicho anticuerpo se produce en bacterias.

70. El método de la Reivindicación 59, donde dicho anticuerpo se produce en células CHO.

71. El método de la Reivindicación 59, donde dicha célula es cancerosa.

72. El método de la Reivindicación 71, donde dicha célula cancerosa se expone aún más a un tratamiento de radiación o un agente quimioterapéutico.

73. El método de la Reivindicación 71, donde dicha célula cancerosa se selecciona del grupo compuesto por células cancerosas del seno, el colorrecto, el pulmón, el ovario, el sistema nervioso central, el hígado, la vejiga, el páncreas, la cerviz, una célula de melanoma y una célula de leucemia.

74. El método de la Reivindicación 71, donde dicha célula cancerosa expresa con mayor abundancia tal proteína, en comparación con una célula normal del mismo origen tisular.

75. El método de la Reivindicación 59, que causa la muerte de dicha célula.

76. El método de la Reivindicación 59, donde dicha proteína tiene:

(a) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO:2;

(b) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO:2, careciendo de su secuencia de péptidos de señal asociados;

(c) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, con su secuencia de péptidos de señal asociados;

(d) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, careciendo de su secuencia de péptidos de señal asociados;

(e) una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1; o

(f) una secuencia de aminoácidos codificada por la región codificadora de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1.

77. Un método para tratar terapéuticamente a un mamífero que tenga un tumor canceroso que contenga células que expresen una proteína con al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos de:

(a) el polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2;

(b) el polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, careciendo de su péptido de señal asociado;

(c) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, con su péptido de señal asociado;

(d) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, careciendo de su péptido de señal asociado;

(e) un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1; o

(f) un polipéptido codificado por la región codificadora de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1, donde dicho método consiste en administrar a ese

mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo, un oligopéptido o una molécula orgánica que se une a dicha proteína, con lo cual se consigue el tratamiento eficaz de ese mamífero.

78. El método de la Reivindicación 77, donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

79. El método de la Reivindicación 77, donde dicho anticuerpo es un fragmento de anticuerpo.

80. El método de la Reivindicación 77, donde dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado.

81. El método de la Reivindicación 77, donde dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica se conjuga con un agente inhibidor del crecimiento.

82. El método de la Reivindicación 77, donde dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica se conjuga con un agente citotóxico.

83. El método de la Reivindicación 82, donde el agente citotóxico se selecciona del grupo compuesto por toxinas, antibióticos, isótopos radioactivos y enzimas nucleolíticas.

84. El método de la Reivindicación 82, donde el agente citotóxico es una toxina.

85. El método de la Reivindicación 84, donde la toxina se selecciona del grupo compuesto por maitansinoide y caliqueamicina.

86. El método de la Reivindicación 84, donde la toxina es un maitansinoide.

87. El método de la Reivindicación 77, donde dicho anticuerpo se produce en bacterias.

88. El método de la Reivindicación 77, donde dicho anticuerpo se produce en células CHO.

89. El método de la Reivindicación 77, donde dicho tumor se expone aún más a un tratamiento de radiación o un agente quimioterapéutico.

90. El método de la Reivindicación 77, donde dicho tumor es de mama, colorrecto, pulmón, ovario, sistema nervioso central, hígado, vejiga, páncreas o cerviz.

91. El método de la Reivindicación 77, donde las células cancerosas de dicho tumor expresan con mayor abundancia tal proteína, en comparación con una célula normal del mismo origen tisular.

92. El método de la Reivindicación 77, donde dicha proteína tiene:

(a) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO:2;

(b) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO:2, careciendo de su secuencia de péptidos de señal asociados;

110

(c) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, con su secuencia de péptidos de señal asociados;

(d) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, careciendo de su secuencia de péptidos de señal asociados;

(e) una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1; o

(f) una secuencia de aminoácidos codificada por la región codificadora de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1.

93. Un método para determinar la presencia de una proteína en una muestra de la cual se sospeche que la contenga, teniendo dicha proteína al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos de:

(a) el polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2;

(b) el polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, careciendo de su péptido de señal asociado;

(c) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, con su péptido de señal asociado;

(d) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, careciendo de su péptido de señal asociado;

(e) un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1; o

(f) un polipéptido codificado por la región codificadora de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1, donde dicho método consiste en exponer la muestra a un anticuerpo, un oligopéptido o una molécula orgánica que se une a dicha proteína y determinar la unión en la muestra de cualquiera de estos tres agentes a la proteína, considerando que la evidencia de esta unión indicaría la presencia de dicha proteína en la muestra.

94. El método de la Reivindicación 93, donde dicha muestra contiene una célula de la cual se sospecha que exprese tal proteína.

95. El método de la Reivindicación 94, donde dicha célula es cancerosa.

96. El método de la Reivindicación 93, donde dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica se marca de forma detectable.

97. El método de la Reivindicación 93, donde dicha proteína tiene:

(a) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO:2;

(b) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO:2, careciendo de su secuencia de péptidos de señal asociados;

116

(c) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, con su secuencia de péptidos de señal asociados;

(d) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, careciendo de su secuencia de péptidos de señal asociados;

(e) una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1; o

(f) una secuencia de aminoácidos codificada por la región codificadora de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1.

98. Un método para diagnosticar la presencia de un tumor en un mamífero que consiste en determinar el nivel de expresión de un gen que codifica una proteína que tiene al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos de:

(a) el polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2;

(b) el polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, careciendo de su péptido de señal asociado;

(c) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, con su péptido de señal asociado;

(d) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, careciendo de su péptido de señal asociado;

(e) un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1; o

(f) un polipéptido codificado por la región codificadora de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1, en una muestra de prueba de células tisulares obtenida de dicho mamífero y una muestra de control de células normales conocidas del mismo origen tisular, considerando que un nivel superior de la expresión de dicha proteína en la prueba de muestra, en comparación con el observado en la prueba de control, indicaría la presencia del tumor en el mamífero del cual se obtuvo la muestra de prueba.

99. El método de la Reivindicación 98, donde el paso de determinar el nivel de expresión de un gen que codifica dicha proteína consiste en emplear un oligonucleótido en una hibridación o un análisis RT-PCR *in situ*.

100. El método de la Reivindicación 98, donde el paso de determinar el nivel de expresión de un gen que codifica dicha proteína consiste en emplear un anticuerpo en un análisis "Western blot" o de inmunohistoquímica.

101. El método de la Reivindicación 98, donde dicha proteína tiene:

(a) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO:2;

117

(b) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO:2, careciendo de su secuencia de péptidos de señal asociados;

(c) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, con su secuencia de péptidos de señal asociados;

(d) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, careciendo de su secuencia de péptidos de señal asociados;

(e) una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1; o

(f) una secuencia de aminoácidos codificada por la región codificadora de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1.

102. Un método para diagnosticar la presencia de un tumor en un mamífero que consiste en poner en contacto una muestra de prueba de células tisulares obtenida de dicho mamífero con un anticuerpo, un oligopéptido o una molécula orgánica que se una a una proteína que tenga al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos de:

(a) el polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2;

(b) el polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, careciendo de su péptido de señal asociado;

(c) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, con su péptido de señal asociado;

(d) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, careciendo de su péptido de señal asociado;

(e) un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1; o

(f) un polipéptido codificado por la región codificadora de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1, y detectar la formación de un complejo entre dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica y dicha proteína en la muestra de prueba, considerando que la formación de dicho complejo indicaría la presencia de un tumor en tal mamífero.

103. El método de la Reivindicación 102, donde dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica se marca de forma detectable.

104. El método de la Reivindicación 102, donde dicha muestra de prueba de células tisulares se obtiene de un individuo del cual se sospecha que tenga un tumor canceroso.

105. El método de la Reivindicación 102, donde dicha proteína tiene:

(a) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO:2;

112

(b) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO:2, careciendo de su secuencia de péptidos de señal asociados;

(c) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, con su secuencia de péptidos de señal asociados;

(d) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, careciendo de su secuencia de péptidos de señal asociados;

(e) una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1; o

(f) una secuencia de aminoácidos codificada por la región codificadora de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1.

106. Un método para tratar o prevenir un trastorno celular proliferativo asociado al aumento de la expresión o actividad de una proteína que tenga al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos de:

(a) el polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2;

(b) el polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, careciendo de su péptido de señal asociado;

(c) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, con su péptido de señal asociado;

(d) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, careciendo de su péptido de señal asociado;

(e) un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1; o

(f) un polipéptido codificado por la región codificadora de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1, donde dicho método consiste en administrar a un sujeto necesitado de tal tratamiento una cantidad efectiva de un antagonista de dicha proteína, con lo cual se consigue tratar o prevenir de forma eficaz ese trastorno celular proliferativo.

107. El método de la Reivindicación 106, donde dicho trastorno celular proliferativo es un cáncer.

108. El método de la Reivindicación 106, donde dicho antagonista es un anticuerpo anti-polipéptido TAT, un oligopéptido que se une a un TAT, una molécula orgánica que se une a un TAT o un oligonucleótido antisentido.

109. Un método para unir un anticuerpo, un oligopéptido o una molécula orgánica a una célula que exprese una proteína que tenga al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos de:

119

(a) el polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2;

(b) el polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, careciendo de su péptido de señal asociado;

(c) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, con su péptido de señal asociado;

(d) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, careciendo de su péptido de señal asociado;

(e) un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1; o

(f) un polipéptido codificado por la región codificadora de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1, donde dicho método consiste en poner en contacto esa célula con un anticuerpo, un oligopéptido o una molécula orgánica que se una a dicha proteína, permitiendo que se produzca la unión de cualquiera de esos tres elementos a dicha proteína y, por tanto, a esa célula.

110. El método de la Reivindicación 109, donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

111. El método de la Reivindicación 109, donde dicho anticuerpo es un fragmento de anticuerpo.

112. El método de la Reivindicación 109, donde dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado.

113. El método de la Reivindicación 109, donde dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica se conjuga con un agente inhibidor del crecimiento.

114. El método de la Reivindicación 109, donde dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica se conjuga con un agente citotóxico.

115. El método de la Reivindicación 114, donde el agente citotóxico se selecciona del grupo compuesto por toxinas, antibióticos, isótopos radioactivos y enzimas nucleolíticas.

116. El método de la Reivindicación 114, donde el agente citotóxico es una toxina.

117. El método de la Reivindicación 116, donde la toxina se selecciona del grupo compuesto por maitansinoide y caliqueamicina.

118. El método de la Reivindicación 116, donde la toxina es un maitansinoide.

119. El método de la Reivindicación 109, donde dicho anticuerpo se produce en bacterias.

120. El método de la Reivindicación 109, donde dicho anticuerpo se produce en células CHO.

121. El método de la Reivindicación 109, donde dicha célula es cancerosa.

120

122. El método de la Reivindicación 121, donde dicha célula cancerosa se expone aún más a un tratamiento de radiación o un agente quimioterapéutico.

123. El método de la Reivindicación 121, donde dicha célula cancerosa se selecciona del grupo compuesto por células cancerosas del seno, el colorrecto, el pulmón, el ovario, el sistema nervioso central, el hígado, la vejiga, el páncreas, la cerviz, una célula de melanoma y una célula de leucemia.

124. El método de la Reivindicación 123, donde dicha célula cancerosa expresa con mayor abundancia tal proteína, en comparación con una célula normal del mismo origen tisular.

125. El método de la Reivindicación 109, que causa la muerte de dicha célula.

126. Uso de un ácido nucleico, tal como se reivindica en cualquiera de las Reivindicaciones de la 1 a la 5 o la 30, en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico o la detección diagnóstica de un cáncer.

127. Uso de un ácido nucleico, tal como se reivindica en cualquiera de las Reivindicaciones de la 1 a la 5 o la 30, en la preparación de un medicamento para tratar un tumor.

128. Uso de un ácido nucleico, tal como se reivindica en cualquiera de las Reivindicaciones de la 1 a la 5 o la 30, en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un trastorno celular proliferativo.

129. Uso de un vector de expresión, tal como se reivindica en cualquiera de las Reivindicaciones 6, 7 ó 31, en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico o la detección diagnóstica de un cáncer.

130. Uso de un vector de expresión, tal como se reivindica en cualquiera de las Reivindicaciones 6, 7 ó 31, en la preparación de un medicamento para tratar un tumor.

131. Uso de un vector de expresión, tal como se reivindica en cualquiera de las Reivindicaciones 6, 7 ó 31, en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un trastorno celular proliferativo.

132. Uso de una célula huésped, tal como se reivindica en cualquiera de las Reivindicaciones 8, 9, 32 ó 33, en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico o la detección diagnóstica de un cáncer.

133. Uso de una célula huésped, tal como se reivindica en cualquiera de las Reivindicaciones 8, 9, 32 ó 33, en la preparación de un medicamento para tratar un tumor.

134. Uso de una célula huésped, tal como se reivindica en cualquiera de las Reivindicaciones 8, 9, 32 ó 33, en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un trastorno celular proliferativo.

121

135. Uso de un polipéptido, tal como se reivindica en cualquiera de las Reivindicaciones de la 11 a la 14, en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico o la detección diagnóstica de un cáncer.

136. Uso de un polipéptido, tal como se reivindica en cualquiera de las Reivindicaciones de la 11 a la 14, en la preparación de un medicamento para tratar un tumor.

137. Uso de un polipéptido, tal como se reivindica en cualquiera de las Reivindicaciones de la 11 a la 14, en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un trastorno celular proliferativo.

138. Uso de un anticuerpo, tal como se reivindica en cualquiera de las Reivindicaciones de la 15 a la 29, en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico o la detección diagnóstica de un cáncer.

139. Uso de un anticuerpo, tal como se reivindica en cualquiera de las Reivindicaciones de la 15 a la 29, en la preparación de un medicamento para tratar un tumor.

140. Uso de un anticuerpo, tal como se reivindica en cualquiera de las Reivindicaciones de la 15 a la 29, en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un trastorno celular proliferativo.

141. Uso de un oligopéptido, tal como se reivindica en cualquiera de las Reivindicaciones de la 35 a la 44, en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico o la detección diagnóstica de un cáncer.

142. Uso de un oligopéptido, tal como se reivindica en cualquiera de las Reivindicaciones de la 35 a la 44, en la preparación de un medicamento para tratar un tumor.

143. Uso de un oligopéptido, tal como se reivindica en cualquiera de las Reivindicaciones de la 35 a la 44, en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un trastorno celular proliferativo.

144. Uso de una molécula orgánica que se une a un TAT, tal como se reivindica en cualquiera de las Reivindicaciones de la 45 a la 54, en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico o la detección diagnóstica de un cáncer.

145. Uso de una molécula orgánica que se une a un TAT, tal como se reivindica en cualquiera de las Reivindicaciones de la 45 a la 54, en la preparación de un medicamento para tratar un tumor.

146. Uso de una molécula orgánica que se une a un TAT, tal como se reivindica en cualquiera de las Reivindicaciones de la 45 a la 54, en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un trastorno celular proliferativo.

147. Uso de una composición de sustancias, tal como se reivindica en cualquiera de las Reivindicaciones 55 ó 56, en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico o la detección diagnóstica de un cáncer.

148. Uso de una composición de sustancias, tal como se reivindica en cualquiera de las Reivindicaciones 55 ó 56, en la preparación de un medicamento para tratar un tumor.

149. Uso de una composición de sustancias, tal como se reivindica en cualquiera de las Reivindicaciones 55 ó 56, en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un trastorno celular proliferativo.

150. Uso de un artículo fabricado, tal como se reivindica en cualquiera de las Reivindicaciones 57 ó 58, en la preparación de un medicamento para el tratamiento terapéutico o la detección diagnóstica de un cáncer.

151. Uso de un artículo fabricado, tal como se reivindica en cualquiera de las Reivindicaciones 57 ó 58, en la preparación de un medicamento para tratar un tumor.

152. Uso de un artículo fabricado, tal como se reivindica en cualquiera de las Reivindicaciones 57 ó 58, en la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de un trastorno celular proliferativo.

153. Un método para inhibir el crecimiento de una célula, dependiendo dicho crecimiento, al menos en parte, del efecto de potenciación del crecimiento de una proteína que tenga al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos de:

(a) el polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2;

(b) el polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, careciendo de su péptido de señal asociado;

(c) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, con su péptido de señal asociado;

(d) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, careciendo de su péptido de señal asociado;

(e) un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1; o

(f) un polipéptido codificado por la región codificadora de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1, donde dicho método consiste en poner en contacto tal proteína con un anticuerpo, un oligopéptido o una molécula orgánica que se une a ésta, inhibiendo por tanto el crecimiento de dicha célula.

154. El método de la Reivindicación 153, donde dicha célula es cancerosa.

155. El método de la Reivindicación 153, donde dicha célula expresa esa proteína.

156. El método de la Reivindicación 153, donde la unión de dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica a tal proteína antagoniza la actividad de potenciación del crecimiento celular de ésta.

157. El método de la Reivindicación 153, donde la unión de dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica a tal proteína induce la muerte de esa célula.

158. El método de la Reivindicación 153, donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

159. El método de la Reivindicación 153, donde dicho anticuerpo es un fragmento de anticuerpo.

160. El método de la Reivindicación 153, donde dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado.

161. El método de la Reivindicación 153, donde dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica se conjuga con un agente inhibidor del crecimiento.

162. El método de la Reivindicación 153, donde dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica se conjuga con un agente citotóxico.

163. El método de la Reivindicación 162, donde el agente citotóxico se selecciona del grupo compuesto por toxinas, antibióticos, isótopos radioactivos y enzimas nucleolíticas.

164. El método de la Reivindicación 162, donde el agente citotóxico es una toxina.

165. El método de la Reivindicación 164, donde la toxina se selecciona del grupo compuesto por maitansinoide y caliqueamicina.

166. El método de la Reivindicación 164, donde la toxina es un maitansinoide.

167. El método de la Reivindicación 153, donde dicho anticuerpo se produce en bacterias.

168. El método de la Reivindicación 153, donde dicho anticuerpo se produce en células CHO.

169. El método de la Reivindicación 153, donde dicha proteína tiene:

(a) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO:2;

(b) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO:2, careciendo de su secuencia de péptidos de señal asociados;

(c) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, con su secuencia de péptidos de señal asociados;

(d) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, careciendo de su secuencia de péptidos de señal asociados;

(e) una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1; o

(f) una secuencia de aminoácidos codificada por la región codificadora de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1.

170. Un método para tratar terapéuticamente un tumor en un mamífero, dependiendo el crecimiento de dicho tumor, al menos en parte, del efecto de potenciación del crecimiento de una proteína que tenga al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos de:

(a) el polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2;

(b) el polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, careciendo de su péptido de señal asociado;

(c) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, con su péptido de señal asociado;

(d) un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, careciendo de su péptido de señal asociado;

(e) un polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1; o

(f) un polipéptido codificado por la región codificadora de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1, donde dicho método consiste en poner en contacto tal proteína con un anticuerpo, un oligopéptido o una molécula orgánica que se une a ésta, con lo cual se consigue tratar con eficacia dicho tumor.

171. El método de la Reivindicación 170, donde las células de dicho tumor expresan esa proteína.

172. El método de la Reivindicación 170, donde la unión de dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica a tal proteína antagoniza la actividad de potenciación del crecimiento celular de ésta.

173. El método de la Reivindicación 170, donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

174. El método de la Reivindicación 170, donde dicho anticuerpo es un fragmento de anticuerpo.

175. El método de la Reivindicación 170, donde dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico o humanizado.

176. El método de la Reivindicación 170, donde dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica se conjuga con un agente inhibidor del crecimiento.

177. El método de la Reivindicación 170, donde dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica se conjuga con un agente citotóxico.

178. El método de la Reivindicación 177, donde el agente citotóxico se selecciona del grupo compuesto por toxinas, antibióticos, isótopos radioactivos y enzimas nucleolíticas.

179. El método de la Reivindicación 177, donde el agente citotóxico es una toxina.

180. El método de la Reivindicación 179, donde la toxina se selecciona del grupo compuesto por maitansinoide y caliqueamicina.

181. El método de la Reivindicación 179, donde la toxina es un maitansinoide.

182. El método de la Reivindicación 170, donde dicho anticuerpo se produce en bacterias.

183. El método de la Reivindicación 170, donde dicho anticuerpo se produce en células CHO.

184. El método de la Reivindicación 170, donde dicha proteína tiene:

(a) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO:2;

(b) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO:2, careciendo de su secuencia de péptidos de señal asociados;

(c) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, con su secuencia de péptidos de señal asociados;

(d) una secuencia de aminoácidos de un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2, careciendo de su secuencia de péptidos de señal asociados;

(e) una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1; o

(f) una secuencia de aminoácidos codificada por la región codificadora de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1.

186. Un anticuerpo aislado que se une al epítopo ligado por un anticuerpo producido por cualquiera de las líneas celulares de hibridoma mostradas en la Tabla 7.

187. El anticuerpo de la Reivindicación 186, que es un anticuerpo monoclonal.

188. El anticuerpo de la Reivindicación 186, que es un fragmento de anticuerpo.

189. El anticuerpo de la Reivindicación 186, que es un anticuerpo quimérico o humanizado.

190. El anticuerpo de la Reivindicación 186, que se conjuga con un agente inhibidor del crecimiento.

191. El anticuerpo de la Reivindicación 186, que se conjuga con un agente citotóxico.

192. El anticuerpo de la Reivindicación 191, donde el agente citotóxico se selecciona del grupo compuesto por toxinas, antibióticos, isótopos radioactivos y enzimas nucleolíticas.

193. El anticuerpo de la Reivindicación 191, donde el agente citotóxico es una toxina.

194. El anticuerpo de la Reivindicación 193, donde la toxina se selecciona del grupo compuesto por maitansinoide y caliqueamicina.

195. El anticuerpo de la Reivindicación 193, donde la toxina es un maitansinoide.

196. El anticuerpo de la Reivindicación 186, que se produce en bacterias.

197. El anticuerpo de la Reivindicación 186, que se produce en células CHO.

198. El anticuerpo de la Reivindicación 186, que induce la muerte de una célula a la cual se une.

199. El anticuerpo de la Reivindicación 186, que se marca de forma detectable.

200. El anticuerpo de la Reivindicación 186, que contiene al menos una de las regiones de determinación de la complementariedad de cualquier anticuerpo producido por cualquiera de las líneas celulares de hibridoma mostradas en la Tabla 7.

201. Un anticuerpo monoclonal producido por cualquiera de las células de hibridoma mostradas en la Tabla 7.

202. Una célula de hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que se une a un polipéptido TAT113.

203. Un método para identificar un anticuerpo que se une a un epítopo ligado por un anticuerpo producido por cualquiera de las líneas celulares de hibridoma mostradas en la Tabla 7, y que consiste en determinar la capacidad de un primer anticuerpo para bloquear la unión de un segundo anticuerpo producido por cualquiera de las líneas celulares de hibridoma mostradas en la Tabla 7 a un polipéptido TAT113, siendo dicha capacidad del primer anticuerpo de al menos un 40% y, a concentraciones iguales de anticuerpos, indicando que dicho primer anticuerpo es capaz de unirse a un epítopo ligado por ese segundo anticuerpo.

Tras leer la presente especificación, cualquier experto en este campo será capaz de proyectar otras realizaciones adicionales de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:1) de un ADNc TAT113, donde el SEQ ID NO:1 es un clon designado en la presente memoria descriptiva como "ADN215609".

La Figura 2 muestra una secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:2) derivada de la secuencia codificadora de longitud completa del SEQ ID NO:1 mostrado en la Figura 1.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERENTES

I. Definiciones

Los términos "polipéptido TAT" y "TAT", tal como se emplean en la presente memoria descriptiva, y cuando sigan inmediatamente a una designación numérica, se refieren a varios polipéptidos, mientras que la designación completa (es decir, TAT/número) se refiere a secuencias de polipéptidos específicos, tal como se describe en la presente memoria descriptiva. Los términos "polipéptido TAT/número" y "TAT/número", donde el término "número" se ofrece como una designación numérica real, tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, engloban polipéptidos con secuencia nativa, variantes de polipéptidos y fragmentos de polipéptidos con secuencia nativa y variantes de polipéptidos (que en la presente memoria descriptiva se definen con mayor detalle). Los polipéptidos TAT descritos en la presente memoria descriptiva pueden aislarse a partir de diversas fuentes, como distintas clases de tejido humano u otras, o prepararse mediante métodos recombinantes o sintéticos. El término "polipéptido TAT" se refiere a cada polipéptido TAT/número individual detallado en la presente memoria descriptiva. Todas las divulgaciones de esta especificación que hagan referencia al "polipéptido TAT" se refieren a cada uno de los polipéptidos tanto individual como colectivamente. Por ejemplo, las descripciones de la preparación de, purificación de, derivación de, formación de anticuerpos para o contra, formación de oligopéptidos que se unen a un TAT para o contra, formación de moléculas orgánicas que se unen a un TAT para o contra, administración de, composiciones que contengan, tratamiento de una enfermedad con, etc., pertenecen a cada polipéptido de la invención individualmente. El término "polipéptido TAT" también incluye variantes de los polipéptidos TAT/número detallados en la presente memoria descriptiva.

Un "polipéptido TAT con secuencia nativa" contiene un polipéptido con la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido TAT correspondiente obtenido de la naturaleza. Dichos polipéptidos TAT con secuencia nativa pueden aislarse de la naturaleza o producirse por medios sintéticos o de recombinación. El término "polipéptido TAT con secuencia nativa" engloba específicamente formas truncadas o secretadas del polipéptido TAT específico (*por ejemplo*, una secuencia de un dominio extracelular), formas variantes (*por ejemplo*, formas con empalme alternativo) y variantes alélicas del polipéptido, todas ellas producidas naturalmente. En ciertas realizaciones de la invención, los polipéptidos TAT con secuencia nativa detallados en la presente

ARB

memoria descriptiva son maduros o tienen longitud completa, conteniendo las secuencias de aminoácidos de longitud completa mostradas en las figuras que acompañan al texto. En las figuras, los codones de inicio y detención (si se indican) se muestran en estilo negrita y subrayado. Los residuos de ácidos nucleicos indicados como "N" o "X" en las figuras que acompañan al texto son cualquier residuo de ácido nucleico. No obstante, si bien se muestra en las figuras que acompañan al texto que los polipéptidos TAT detallados en ellas comienzan con residuos de metionina designados en la presente memoria descriptiva como posición 1 de aminoácidos en las figuras, es concebible y posible que otros residuos de metionina ubicados bien por arriba o por abajo de esa posición 1 de aminoácidos en las figuras puedan emplearse como el residuo del aminoácido de inicio para los polipéptidos TAT.

El "dominio extracelular" o "ECD" de un polipéptido TAT se refiere a una forma de éste que esencialmente está libre de los dominios transmembrana y citoplásmico. Por lo general, el ECD de un polipéptido TAT tendrá menos de un 1%, preferentemente menos de un 0,5%, de tales dominios transmembrana y/o citoplásmico. Se comprenderá que la identificación de cualquier dominio transmembrana para los polipéptidos TAT de la presente invención se realiza de acuerdo con los criterios empleados rutinariamente en la materia para identificar esa clase de dominio hidrófobo. Los límites exactos de un dominio transmembrana pueden variar aunque, lo más probable, en no más de 5 aminoácidos en cualquiera de los extremos del dominio, tal como se ha identificado inicialmente en la presente memoria descriptiva. Opcionalmente, por tanto, un dominio extracelular de un polipéptido TAT puede contener 5 aminoácidos, o menos, en cualquier extremo del límite del dominio transmembrana/extracelular tal como se identifica en los Ejemplos o la especificación, y tales polipéptidos, con o sin el péptido de señal asociado, así como el ácido nucleico que los codifica, se contemplan en la presente invención.

La ubicación aproximada de los "péptidos de señal" de los diversos polipéptidos TAT detallados en la presente memoria descriptiva puede mostrarse en la presente especificación y/o las figuras que acompañan al texto. No obstante, debe tenerse en cuenta que el límite del terminal C de un péptido de señal puede variar aunque, lo más probable, en no más de 5 aminoácidos en cualquiera de los extremos del límite del terminal C del péptido de señal, tal como se ha identificado inicialmente en la presente memoria descriptiva, pudiendo identificarse el límite del terminal C del péptido de señal de acuerdo con los criterios empleados rutinariamente en la materia para identificar esa clase de elemento de secuencia de aminoácidos (por ejemplo, Nielsen y col., Prot. Eng. 10:1-6 (1997) y von Heinje y col., Nucl. Acids. Res. 14:4683-4690 (1986)). Además, también se reconoce que, en algunos casos, la segmentación de una secuencia de señal de un polipéptido secretado no es

totalmente uniforme, resultando en más de una especie secretada. Estos polipéptidos maduros, donde el péptido de señal se segmenta en un tramo no superior a 5 aminoácidos en cualquier extremo del límite del terminal C del péptido de señal, tal como se identifica en la presente memoria descriptiva, así como los polinucleótidos que los codifican, se contemplan en la presente invención.

La "variante de un polipéptido TAT" significa un polipéptido TAT, preferentemente activo, tal como se define en la presente memoria descriptiva, que tiene al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de un polipéptido TAT con secuencia nativa de longitud completa, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, la secuencia de un polipéptido TAT carente del péptido de señal, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, un dominio extracelular de un polipéptido TAT, con o sin el péptido de señal, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, o cualquier otro fragmento de la secuencia de un polipéptido TAT de longitud completa, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva (como los que codifica un ácido nucleico que representa sólo una parte de la secuencia codificadora completa de un polipéptido TAT de longitud completa). Estas variantes de polipéptidos TAT incluyen, por ejemplo, polipéptidos TAT en los que se agregan o eliminan uno o más residuos de aminoácidos, en los terminales N- o C- de la secuencia de aminoácidos nativa de longitud completa. Por lo general, la variante de un polipéptido TAT tendrá al menos un 80% de identidad de la secuencia de aminoácidos, y alternativamente al menos un 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de la secuencia de aminoácidos, de una secuencia de un polipéptido TAT con secuencia nativa de longitud completa, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, la secuencia de un polipéptido TAT carente del péptido de señal, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, un dominio extracelular de un polipéptido TAT, con o sin el péptido de señal, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, o cualquier otro fragmento específicamente definido de la secuencia de un polipéptido TAT de longitud completa, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva. Por lo general, los polipéptidos con variante TAT tienen una longitud de al menos 10 aminoácidos, y alternativamente de al menos 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600 o más. Opcionalmente, los polipéptidos con variante TAT no tendrán más de una sustitución conservadora de aminoácidos, y alternativamente no más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 sustituciones conservadoras de aminoácidos, en comparación con la secuencia nativa del polipéptido TAT.

ABO

El "porcentaje (%) de identidad de la secuencia de aminoácidos" de las secuencias de polipéptidos TAT identificadas en la presente memoria descriptiva se define como el porcentaje de los residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos en la secuencia del polipéptido TAT específico, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si fuera necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de la secuencia, sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de la secuencia. A efectos de determinar el porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos, la alineación se puede conseguir de varias formas que son conocidas en la materia; por ejemplo, usar software comercializado como BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Los expertos en este campo pueden determinar parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima en la longitud completa de las secuencias que se comparan. Sin embargo, a efectos de la presente memoria descriptiva, los valores del porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos se generan usando el programa informático para comparación de secuencias ALIGN-2; en la siguiente Tabla 1 se proporciona el código fuente completo para el programa ALIGN-2. El programa informático ALIGN-2 para comparación de secuencias fue creado por Genentech, Inc., y el código fuente que se incluye en la Tabla 1 se ha presentado con la documentación de usuario en la Oficina de Derechos de Autor de EE.UU. (U.S. Copyright Office), Washington D.C., 20559, donde ha quedado inscrito en el Registro de Derechos de Autor de EE. UU. con el número TXU510087. El programa ALIGN-2 está comercializado por Genentech, Inc., South San Francisco, California, o se puede compilar a partir del código fuente suministrado en la siguiente Tabla 1. Este programa debería compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, preferentemente UNIX V4.0D digital. El programa ALIGN-2 define todos los parámetros de comparación de secuencias, que no varían.

En situaciones en las que se emplea ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos de una determinada secuencia de aminoácidos A con respecto a una determinada secuencia de aminoácidos B (que alternativamente puede expresarse diciendo que una determinada secuencia de aminoácidos A tiene o contiene cierto porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos de una determinada secuencia de aminoácidos B) se calcula de la siguiente manera:

100 veces la fracción X/Y

donde X es la cantidad de residuos de aminoácidos marcada como coincidencias idénticas por el programa ALIGN-2 de alineación de secuencias en la alineación establecida por dicho programa de las secuencias A y B, e Y es la cantidad total de residuos de aminoácidos en B. Se apreciará que en los casos que la longitud de la secuencia de aminoácidos A no sea igual a la de la B, el porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no será igual al de B con respecto a A. Como ejemplos de cálculos del porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos realizados con este método, las Tablas 2 y 3 demuestran cómo calcular el porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos designada como "Proteína comparada" con respecto a la secuencia de aminoácidos designada como "TAT", donde "TAT" representa la secuencia de aminoácidos de un polipéptido TAT hipotético de interés, "Proteína comparada" representa la secuencia de aminoácidos de un polipéptido con que se compara el polipéptido "TAT" de interés, y los valores "X", "Y" y "Z" representan cada uno distintos residuos de aminoácidos hipotéticos. A menos que se indique lo contrario, todos los valores de porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos usados en la presente memoria descriptiva se obtienen como se ha descrito en el párrafo anterior, utilizando el programa informático ALIGN-2.

Un "polinucleótido con variante TAT" o una "secuencia de ácidos nucleicos con variante TAT" significa una molécula de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido TAT, preferentemente activo, tal como se define en la presente memoria descriptiva, y tiene al menos un 80% de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos de una secuencia de ácidos nucleótidos que codifica la secuencia de un polipéptido TAT con secuencia nativa de longitud completa, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, la secuencia de un polipéptido TAT con secuencia nativa de longitud completa carente del péptido de señal, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, un dominio extracelular de un polipéptido TAT, con o sin el péptido de señal, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, o cualquier otro fragmento de la secuencia de un polipéptido TAT de longitud completa, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva (como los que codifica un ácido nucleico que representa sólo una parte de la secuencia codificadora completa de un polipéptido TAT de longitud completa). Por lo general, un polinucleótido con variante TAT tendrá al menos un 80% de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos, y alternativamente al menos un 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos, de una secuencia de ácidos nucleicos que codifique una secuencia de un polipéptido TAT con secuencia nativa de longitud completa, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, la secuencia de un polipéptido TAT con secuencia nativa de longitud completa carente del péptido de señal, tal como se detalla en la presente memoria

descriptiva, un dominio extracelular de un polipéptido TAT, con o sin el péptido de señal, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, o cualquier otro fragmento de la secuencia de un polipéptido TAT de longitud completa, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva. Las variantes no engloban la secuencia nativa de nucleótidos.

La longitud de los polinucleótidos con variante TAT es por lo general de alrededor de 5 nucleótidos, y alternativamente de al menos alrededor de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990 ó 1.000 nucleótidos, donde, en este contexto, el término "alrededor de" significa la longitud de referencia de la secuencia de nucleótidos ±10%.

El "porcentaje (%) de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos" de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican TAT identificadas en la presente memoria descriptiva se define como el porcentaje de nucleótidos en una secuencia candidata que son idénticos a los nucleótidos en la secuencia de ácidos nucleicos TAT de interés, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si fuera necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de la secuencia. A efectos de determinar el porcentaje de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos, la alineación se puede conseguir de varias formas que son conocidas en la materia; por ejemplo, usar software comercializado como BLAST, BLAST-2, ALIGN o Megalign (DNASTAR). Sin embargo, a efectos de la presente memoria descriptiva, los valores del porcentaje de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos se generan usando el programa informático para comparación de secuencias ALIGN-2; en la siguiente Tabla 1 se proporciona el código fuente completo para el programa ALIGN-2. El programa informático ALIGN-2 para comparación de secuencias fue creado por Genentech, Inc., y el código fuente que se incluye en la Tabla 1 se ha presentado con la documentación de usuario en la Oficina de Derechos de Autor de EE.UU. (U.S. Copyright Office), Washington D.C., 20559, donde ha quedado inscrito en el Registro de Derechos de Autor de EE. UU. con el número TXU510087. El programa ALIGN-2 está comercializado por Genentech, Inc., South San Francisco, California, o se puede compilar a partir del código fuente suministrado en la siguiente Tabla 1. Este programa debería compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, preferentemente UNIX V4.0D

digital. El programa ALIGN-2 define todos los parámetros de comparación de secuencias, que no varían.

En situaciones en las que se emplea ALIGN-2 para comparaciones de secuencias de ácidos nucleicos, el porcentaje de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos de una determinada secuencia de ácidos nucleicos C con respecto a una determinada secuencia de ácidos nucleicos D (que alternativamente puede expresarse diciendo que una determinada secuencia de ácidos nucleicos C tiene o contiene cierto porcentaje de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos de una determinada secuencia de ácidos nucleicos D) se calcula de la siguiente manera:

100 veces la fracción W/Z

donde W es la cantidad de nucleótidos marcada como coincidencias idénticas por el programa ALIGN-2 de alineación de secuencias en la alineación establecida por dicho programa de las secuencias C y D, y Z es la cantidad total de nucleótidos en B. Se apreciará que en los casos que la longitud de la secuencia de ácidos nucleicos C no sea igual a la de la D, el porcentaje de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos de C con respecto a D no será igual al de D con respecto a C. Como ejemplos de cálculos del porcentaje de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos realizados con este método, las Tablas 4 y 5 demuestran cómo calcular el porcentaje de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos de la secuencia de ácidos nucleicos designada como "ADN comparado" con respecto a la secuencia de ácidos nucleicos designada como "TAT-ADN", donde "TAT-ADN" representa una secuencia hipotética de interés de ácidos nucleicos que codifica un TAT, "ADN comparado" representa la secuencia de nucleótidos de una molécula de ácidos nucleicos con que se compara la molécula de ácidos nucleicos "TAT-ADN" de interés, y los valores "N", "L" y "V" representan cada uno distintos nucleótidos hipotéticos. A menos que se indique lo contrario, todos los valores de porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos usados en la presente memoria descriptiva se obtienen como se ha descrito en el párrafo anterior, utilizando el programa informático ALIGN-2. A menos que se indique lo contrario, todos los valores de porcentaje de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos usados en la presente memoria descriptiva se obtienen como se ha descrito en el párrafo anterior, utilizando el programa informático ALIGN-2.

En otras realizaciones, los polinucleótidos con variante TAT son moléculas de ácidos nucleicos que codifican un polipéptido TAT y son capaces de hibridar, preferentemente bajo condiciones rigurosas de hibridación y lavado, en secuencias de nucleótidos que codifican un

polipéptido TAT de longitud completa, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva. Los polipéptidos con variante TAT pueden ser los que codifica un polinucleótido con variante TAT.

El término "región codificadora de longitud completa", cuando se emplea en referencia a un ácido nucleico que codifique un polipéptido TAT, se refiere a la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido TAT de longitud completa de la invención (que a menudo se muestra entre codones de inicio y detención, incluso en las figuras que acompañan al texto). El término "región codificadora de longitud completa", cuando se emplea en referencia a un ácido nucleico depositado en la ATCC, se refiere a la porción que codifica el polipéptido TAT del ADNc insertado en el vector depositado en la ATCC (que a menudo se muestra entre codones de inicio y detención, incluso en las figuras que acompañan al texto).

El término "aislado", cuando se usa para describir los distintos polipéptidos TAT detallados en la presente memoria descriptiva, significa que se trata de un polipéptido que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que normalmente interferirían en los usos de diagnóstico o terapéuticos del polipéptido, y podrían incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En realizaciones preferentes, el polipéptido se purificará (1) a un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de una secuencia de aminoácidos N-terminal o internos mediante el uso de un secuenciador de taza giratoria, o (2) hasta alcanzar la homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras empleando una tinción de azul de Coomassie o, preferentemente, plata. Los polipéptidos aislados incluyen el polipéptido *in situ* dentro de células recombinantes, ya que al menos un componente del entorno natural del polipéptido TAT no estará presente. De todas formas, normalmente, el polipéptido aislado se preparará mediante al menos un paso de purificación.

Un ácido nucleico que codifique un polipéptido TAT "aislado" u otra clase de polipéptido es una molécula de ácidos nucleicos que se identifica y separa a partir de al menos una molécula contaminante de ácidos nucleicos que normalmente está asociada a la fuente natural del ácido nucleico que codifica el polipéptido. Una molécula de ácidos nucleicos que codifique un polipéptido aislado es distinta de la que se encuentra en la naturaleza, tanto por su forma como entorno. Por tanto, las moléculas de ácidos nucleicos que codifiquen polipéptidos aislados se distinguen de la molécula de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido específico tal como existe en las células naturales. Sin embargo, una molécula de ácidos nucleicos que codifique un polipéptido aislado incluye moléculas de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos contenidos en células que

ABS

habitualmente expresan el polipéptido en casos que, por ejemplo, la molécula de ácidos nucleicos esté en una posición cromosómica distinta de la que tiene en las células naturales.

El término "secuencias de control" se refiere a las secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificadora enlazada de forma operable en un organismo huésped en particular. Las secuencias de control que son aptas para procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia de operadores y un sitio de unión al ribosoma. Se sabe que las células eucarióticas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

El ácido nucleico está "enlazado de forma operable" al establecerlo en una relación funcional con otra secuencia de ácidos nucleicos. Por ejemplo, el ADN de una presecuencia o un líder secretor está enlazado de forma operable al ADN de un polipéptido si se expresa como una preproteína que participe en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está enlazado de forma operable a una secuencia codificadora si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está enlazado de forma operable a una secuencia codificadora si está colocado para facilitar la traducción. Por lo general, por "enlazado de forma operable" se entiende que las secuencias de ADN que se enlazan son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que estar contiguos. La unión se consigue mediante ligaduras en sitios de restricción apropiados. Si esos sitios no existen, los adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos se utilizan de acuerdo con la práctica habitual.

Cualquier experto en la materia puede determinar rápidamente la "rigurosidad" de las reacciones de hibridación, tratándose por lo general de un cálculo empírico que depende de la longitud de la sonda, la temperatura de lavado y la concentración de sal. En general, para realizar correctamente una hibridación, las sondas más largas requieren temperaturas superiores, mientras que las más cortas las requieren inferiores. La hibridación depende habitualmente de la capacidad de rehibridación del ADN desnaturalizado ante la presencia de hebras complementarias en un entorno con temperatura inferior a su punto de fusión. Cuanto más elevado sea el grado deseado de homología entre la sonda y la secuencia susceptible de hibridación, más alta será la temperatura relativa que podrá emplearse. Como resultado, las temperaturas relativas más altas tenderían a perfilar unas condiciones de reacción más rigurosas, mientras que las más bajas desarrollarán unas condiciones rigurosas menores. Para más detalles y una explicación sobre la rigurosidad de las reacciones de hibridación, véase Ausubel y col., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

Las "condiciones rigurosas" o "condiciones de alta rigurosidad", tal como se definen en la presente memoria descriptiva, pueden identificarse como aquéllas que: (1) emplean para el lavado

una fuerza iónica baja y temperaturas altas, por ejemplo, 0,015 M de cloruro sódico/0,0015 M de citrato sódico/sulfato de sodio dodecilo al 0,1% a 50 °C; (2) durante la hibridación emplean un agente desnaturalizante, como la formamida, por ejemplo, formamida al 50% (v/v) con albúmina de suero bovino al 0,1%/Ficoll al 0,1%/polivinilpirrolidona al 0,1%/tampón de fosfato sódico de 50 mM con un pH de 6,5 y 750 mM de cloruro sódico, 75 mM de citrato sódico a 42 °C; o (3) hibridación durante toda la noche en una solución que emplea formamida al 50%, 5 porciones de SSC (0,75 M de NaCl, 0,075 M de citrato sódico), 50 mM de fosfato sódico (pH de 6,8), pirofosfato sódico al 0,1%, 5 porciones de solución 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 un lavado de 10 minutos a 42 °C en 0,2 porciones de SSC (cloruro sódico/citrato sódico), seguido de un lavado de alta rigurosidad durante 10 minutos compuesto por 0,1 porciones de SSC con EDTA a 55 °C.

Las "condiciones moderadamente rigurosas" pueden identificarse tal como se describe en Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen el uso de una solución de lavado y unas condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, concentración iónica y porcentaje de SDS) menos rigurosas que las descritas anteriormente. Un ejemplo de condiciones moderadamente rigurosas sería la incubación durante toda la noche a 37 °C en una solución que contenga: 20% de formamida, 5 porciones de SSC (150 mM de NaCl, 15 mM de citrato trisódico), 50 mM de fosfato sódico (pH de 7,6), 5 porciones de solución de Denhardt, 10% de sulfato de dextrano y 20 mg/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado, seguido de un lavado de los filtros en 1 porción de SSC a una temperatura comprendida entre 37 y 50 °C. El experto en la materia sabrá cómo ajustar la temperatura, la concentración iónica, etc., como sea necesario para integrar factores como la longitud de la sonda y otros similares.

El término "señalizado con epítopo", cuando se utiliza en la presente memoria descriptiva, se refiere a un polipéptido quimérico que contiene un polipéptido TAT o un anticuerpo anti-TAT fusionado a un "polipéptido señalizado". El polipéptido señalizado tiene suficientes residuos para proporcionar un epítopo contra el cual se pueda elaborar un anticuerpo, pero es suficientemente corto para que no interfiera en la actividad del polipéptido al cual se fusiona. El polipéptido señalizado es, también, preferentemente, único, de forma que el anticuerpo no tenga una reacción cruzada sustancial con otros epítopos. Por lo general, los polipéptidos señalizados aptos tienen al menos 6 residuos de aminoácidos, siendo la cantidad habitual entre 8 y 50 (preferentemente, entre 10 y 20).

Para los fines de la presente memoria descriptiva, los términos "activa" o "actividad" se refieren a una forma, o formas, de un polipéptido TAT que retiene una actividad biológica y/o inmunológica de un TAT nativo u obtenido naturalmente, en que la actividad "biológica" se refiere a una función biológica (ya sea inhibitoria o promotora) provocada por un TAT nativo u obtenido naturalmente que no sea la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo con un epítopo antigénico que forme parte de un TAT nativo u obtenido naturalmente, y una actividad "inmunológica" se refiere a la capacidad de inducir la producción de un anticuerpo contra un epítopo antigénico que forme parte de un TAT nativo u obtenido naturalmente.

El término "antagonista" se utiliza en el sentido más amplio, e incluye cualquier molécula que parcial o completamente bloquee, inhiba o neutralice una actividad biológica de un polipéptido TAT nativo detallado en la presente memoria descriptiva. De forma similar, El término "agonista" se utiliza en el sentido más amplio, e incluye cualquier molécula que imite una actividad biológica de un polipéptido TAT nativo detallado en la presente memoria descriptiva. Las moléculas agonistas o antagonistas aptas incluyen específicamente anticuerpos agonistas o antagonistas o fragmentos de anticuerpos, fragmentos o variantes de secuencias de aminoácidos de polipéptidos TAT nativos, péptidos, oligonucleótidos antisentido, moléculas orgánicas pequeñas, etc. Uno de los métodos para identificar los agonistas o antagonistas de un polipéptido TAT puede consistir en poner en contacto a un polipéptido TAT con una molécula agonista o antagonista candidata y medir un cambio detectable en una o más actividades biológicas normalmente asociadas al polipéptido TAT.

El término "tratar", "tratamiento" o "alivio" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como las medidas profilácticas o preventivas, en que el objetivo es prevenir o lentificar (disminuir) la afección o trastorno patológico pertinente. Entre los sujetos que precisan tratamiento se incluyen aquéllos que ya padecen el trastorno, así como los que tienen propensión al mismo o en quienes deba prevenirse. Un sujeto o mamífero es satisfactoriamente "tratado" para un cáncer que exprese un polipéptido TAT si, tras recibir una cantidad terapéutica de un anticuerpo anti-TAT, un oligopéptido que se une a un TAT o una molécula orgánica que se une a un TAT de acuerdo con los métodos de la presente invención, el paciente muestra una reducción observable y/o medible, o la ausencia, de uno o más de los siguientes supuestos: reducción de la cantidad de células cancerosas o ausencia de éstas; reducción del tamaño del tumor; inhibición (es decir, lentificar en cierta medida y, preferentemente, detener) de la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos, incluyendo la propagación del cáncer en tejidos blandos y huesos; inhibición (es decir, lentificar en cierta medida y, preferentemente, detener) de la metástasis tumoral; inhibición, en cierta medida, del crecimiento tumoral; y/o alivio en cierta medida de uno o más de los síntomas asociados al cáncer

13B

específico en cuestión; reducción de la morbosidad y mortalidad; y mejora de la calidad de vida. Con relación a la capacidad del anticuerpo anti-TAT u oligopéptido que se une a un TAT para evitar el crecimiento de las células cancerosas, y/o eliminar las existentes, el agente puede ser citostático y/o citotóxico. El paciente también puede sentir la reducción de estos signos o síntomas.

Los parámetros anteriores para evaluar el éxito del tratamiento y la mejora de la enfermedad se pueden medir fácilmente mediante procedimientos habituales conocidos por un médico. En el caso del tratamiento del cáncer, la eficacia se puede medir, por ejemplo, evaluando el tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TTP) y/o determinando la tasa de respuesta (RR). La metástasis puede determinarse mediante estudios de diseminación, así como gammagrafías óseas y pruebas que midan el nivel de calcio y otras enzimas, para averiguar si se ha extendido al hueso. También se puede realizar una TAC para detectar la extensión por la pelvis y los nódulos linfáticos de la zona. Se realizan estudios radiológicos de tórax y mediciones, mediante métodos conocidos, de los niveles enzimáticos hepáticos para detectar metástasis en los pulmones y el hígado, respectivamente. Otros métodos habituales para realizar un seguimiento de la enfermedad incluyen ecografía transrectal (TRUS) y biopsia transrectal por punción con aguja gruesa (TRNB).

Para el cáncer de vejiga, que es un cáncer más localizado, los métodos para determinar el progreso de la enfermedad incluyen la evaluación citológica urinaria por citoscopia, la supervisión de la presencia de sangre en la orina, la visualización del tracto urotelial mediante monografía o un pielograma intravenoso, las tomografías asistidas por computadora (TAC) y las imágenes por resonancia magnética (IRM). La presencia de metástasis distantes puede evaluarse mediante TAC del abdomen, radiografías torácicas o imágenes radionúclidas del esqueleto.

La administración "crónica" se refiere a la administración del agente o agentes de un modo continuo, frente a un modo agudo, con el fin de mantener el efecto terapéutico inicial (actividad) durante un período prolongado de tiempo. La administración "intermitente" es el tratamiento que no se realiza de forma consecutiva sin interrupción, sino que tiene carácter cíclico.

Para los propósitos del tratamiento, alivio de los síntomas o diagnóstico de un cáncer, "mamífero" se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluidos los humanos, los animales domésticos y de granja y los animales utilizados en actividades deportivas, exhibidos en zoológicos y de compañía, como perros, gatos, ganado, caballos, ovejas, cerdos, cabras, conejos, etc. Preferentemente, el mamífero es un humano.

La administración "en combinación con" uno o más agentes terapéuticos adicionales incluye la administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden.

Los "vehículos", tal como se utiliza este término en la presente memoria descriptiva, incluyen vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables que no sean tóxicos para la célula o el mamífero expuesto a los mismos con las dosis y concentraciones empleadas. Con frecuencia, el vehículo fisiológicamente aceptable es una solución tamponada con pH acuoso. Entre los ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables se incluyen tampones como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes como ácido ascórbico; un polipéptido de bajo peso molecular (inferior a 10 residuos); proteínas, como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, como polivinilpirrolidona; aminoácidos como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos, como glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes como EDTA; alcoholes azucarados, como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales, como el sodio; y/o surfactantes no iónicos, como TWEEN®, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS®.

Por "fase sólida" o "soporte sólido" se entiende una matriz no acuosa a la cual un anticuerpo, un oligopéptido que se une a un TAT o una molécula orgánica que se une a un TAT de la presente invención puede adherirse o unirse. Entre los ejemplos de fases sólidas englobadas en la presente memoria descriptiva se incluyen aquéllas formadas parcial o completamente por cristal (por ejemplo, cristal poroso controlado), polisacáridos (por ejemplo, agarosa), poliacrilamidas, poliestireno, alcohol de polivinilo y siliconas. En ciertas realizaciones, según el contexto, la fase sólida puede comprender la parte hueca de un plato de ensayo; en otras es una columna de purificación (por ejemplo, una columna cromatográfica de afinidad). Este término también incluye una fase sólida discontinua de partículas discretas, como las descritas en la patente de EE.UU. nº 4.275.149.

Un "liposoma" es una pequeña vesícula compuesta por varias clases de lípidos, fosfolípidos y/o un surfactante que es útil para la administración de un fármaco (como un polipéptido TAT, un anticuerpo contra éste o un oligopéptido que se une a un TAT) a un mamífero. Por lo general, los componentes del liposoma se disponen en una formación de doble capa, de manera similar a la disposición de los lípidos en las membranas biológicas.

Por su definición en la presente memoria descriptiva, una molécula o molécula orgánica "pequeña" tiene un peso molecular inferior a 500 daltons.

Una "cantidad eficaz" de un polipéptido, un anticuerpo, un oligopéptido que se une a un TAT, una molécula orgánica que se une a un TAT o un agonista o antagonista de los mismos, tal como se describe en la presente memoria descriptiva, es una cantidad suficiente para llevar a cabo el

objetivo específicamente indicado. Una "cantidad eficaz" se puede determinar empíricamente y mediante métodos habituales, con respecto al fin expresado.

El término "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad efectiva de un anticuerpo, un polipéptido, un oligopéptido que se une a un TAT, una molécula orgánica que se une a un TAT u otro fármaco para "tratar" una enfermedad o un trastorno en un sujeto o mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente efectiva del fármaco puede reducir la cantidad de células cancerosas y el tamaño del tumor, inhibir (es decir, lentificar hasta cierto grado y preferentemente detener) la infiltración de células cancerosas en los órganos periféricos, la metástasis tumoral y, hasta cierto punto, el crecimiento tumoral y/o aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados al cáncer. Véase la definición de "tratamiento" en la presente memoria descriptiva. Con relación a la capacidad del fármaco para evitar el crecimiento de las células cancerosas, y/o eliminar las existentes, éste puede ser citostático y/o citotóxico.

Una "cantidad inhibidora del crecimiento" de un anticuerpo anti-TAT, un polipéptido TAT, un oligopéptido que se une a un TAT o una molécula orgánica que se une a un TAT es una cantidad capaz de inhibir el crecimiento de una célula, especialmente tumoral, por ejemplo, una célula cancerosa, *in vitro* o *in vivo*. Para los propósitos de inhibir el crecimiento celular neoplásico, una "cantidad inhibidora del crecimiento" de un anticuerpo anti-TAT, un polipéptido TAT, un oligopéptido que se une a un TAT o una molécula orgánica que se une a un TAT puede determinarse empíricamente y siguiendo los métodos habituales.

Una "cantidad inhibidora del crecimiento" de un anticuerpo anti-TAT, un polipéptido TAT, un oligopéptido que se une a un TAT o una molécula orgánica que se une a un TAT es una cantidad capaz de causar la destrucción de una célula, especialmente tumoral, por ejemplo, una célula cancerosa, *in vitro* o *in vivo*. Para los propósitos de inhibir el crecimiento celular neoplásico, una "cantidad citotóxica" de un anticuerpo anti-TAT, un polipéptido TAT, un oligopéptido que se une a un TAT o una molécula orgánica que se une a un TAT puede determinarse empíricamente y siguiendo los métodos habituales.

El término "anticuerpo" se emplea en el sentido más amplio y abarca específicamente, por ejemplo, anticuerpos anti-TAT monoclonales individuales (incluyendo anticuerpos agonistas, antagonistas y neutralizadores), composiciones de anticuerpos anti-TAT con especificidad poliepitópica, anticuerpos policlonales, anticuerpos anti-TAT de cadena única y fragmentos de anticuerpos anti-TAT (véase más adelante), siempre que exhiban la actividad biológica o inmunológica deseada. En la presente memoria descriptiva, el término "inmunoglobulina" (Ig) se utiliza de forma intercambiable con "anticuerpo".

Un "anticuerpo aislado" es aquél que se ha identificado y separado, y/o recuperado, a partir de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían en los usos de diagnóstico o terapéuticos del anticuerpo, y podrían incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteináceos y no proteináceos. En realizaciones preferentes, el anticuerpo se purificará (1) en más del 95% de su peso tal como se determina por el método de Lowry, y más preferentemente, en más del 99% de su peso, (2) en un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de una secuencia de aminoácidos N-terminal o internos mediante el uso de un secuenciador de taza giratoria, o (3) hasta alcanzar la homogeneidad mediante SDS-PAGE, en condiciones reductoras o no reductoras, empleando una tinción de azul de Coomassie o, preferentemente, plata. Los anticuerpos aislados incluyen el anticuerpo in situ dentro de células recombinantes, ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. En cualquier caso, normalmente, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos un paso de purificación.

La unidad básica de 4 cadenas de un anticuerpo es una glicoproteína heterotetramérica constituida por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas (un anticuerpo IgM consiste en 5 de las unidades básicas de heterotetrámeros junto con un polipéptido adicional llamado cadena J, y por tanto contiene 10 sitios de unión al antígeno, mientras que los anticuerpos IgA secretados pueden polimerizarse para formar conjuntos polivalentes que comprenden entre 2 y 5 de las unidades básicas de 4 cadenas junto con la cadena J). En el caso de IgG, la unidad de 4 cadenas pesa generalmente unos 150.000 daltons. Cada cadena L se enlaza a una cadena H mediante un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H se enlazan entre sí mediante uno o más enlaces disulfuro según el isotipo de la cadena H. Cada cadena H y L tiene también puentes disulfuro separados regularmente dentro de la cadena. Cada cadena H tiene en el extremo N-terminal un dominio variable (V_H) seguido de tres dominios constantes (C_H) para cada una de las cadenas α y γ y cuatro dominios C_H para los isotipos μ y ϵ. Cada cadena L tiene en el extremo N-terminal un dominio variable (V_L) seguido de un dominio constante (C_L) en su otro extremo. El V_L se alinea con el V_H, y el C_L se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada (C_H1). Se cree que ciertos residuos particulares de aminoácidos forman una interfaz entre los dominios variables de las cadenas ligera y pesada. El emparejamiento de un V_H y un V_L forma un único sitio de unión al antígeno. Para la estructura y las propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, véase, por ejemplo, Basic and Clinical Immunology, 8ª edición, Daniel P. Stites, Abba I. Terr y Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, página 71 y Capítulo 6.

La cadena ligera de cualquier especie de vertebrados puede asignarse a una de dos clases claramente distintas, denominadas kappa y lambda, sobre la base de las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Según la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (C_H), las inmunoglobulinas se pueden asignar a distintas clases o isotipos. Existen cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que tienen cadenas pesadas designadas como α, δ, ϵ, γ y μ, respectivamente. Las clases γ y α se dividen además en subclases sobre la base de diferencias relativamente menores en la secuencia y función del C_H; por ejemplo, los seres humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2.

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertos segmentos de los dominios variables difieren enormemente en cuanto a su secuencia entre los distintos anticuerpos. El dominio V media la unión al antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular para su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a través de la extensión de 110 aminoácidos de los dominios variables. Por contra, las regiones V están compuestas por tramos relativamente invariables de 15-30 aminoácidos llamados regiones estructurales (FR) y separados por regiones más cortas de extrema variabilidad llamadas "regiones hipervariables", cuya longitud es de entre 9 y 12 aminoácidos. Cada uno de los dominios variables de las cadenas nativas pesadas y ligeras comprende cuatro regiones estructurales (FR), que en su mayor parte adoptan una configuración en lámina β, conectada por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan la estructura en lámina β, de la cual en algunos casos forman parte. Las FR mantienen unidas y en estrecha proximidad a las regiones hipervariables de cada cadena, las cuales, junto con las de las otras, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (véase Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª edición, Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de la Salud, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no participan directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero desarrollan diversas funciones efectoras, como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad con mediación celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

El término "región hipervariable", en el contexto de la presente memoria descriptiva, se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable generalmente comprende residuos de aminoácidos de una "región de determinación de complementariedad" o "CDR" (por ejemplo, los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el V_L, y 1-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el V_H, Kabat y col., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª edición, Servicio de Salud Pública, Institutos Nacionales de la Salud, Bethesda, MD. (1991)) y/o aquellos residuos de un "bucle hipervariable" (*por ejemplo*, los

residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el V_L, y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el V_H, Chothia y Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987)).

En la presente memoria descriptiva, el término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que forman la población son idénticos excepto en posibles mutaciones de formación natural que podrían estar presentes en pequeñas cantidades. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos y se dirigen contra un único sitio antigénico. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpos policlonales que incluyen distintos anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un solo determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales tienen la ventaja de que pueden sintetizarse sin estar contaminados por otros anticuerpos. No debe interpretarse que el modificador "monoclonal" requiera la producción del anticuerpo mediante cualquier método en particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales útiles en la presente invención pueden prepararse mediante la metodología del hibridoma, descrita por primera vez en Kohler y col., Nature, 256:495 (1975), o empleando métodos de ADN recombinante en células bacterianas eucarióticas, ya sean animales o vegetales (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse a partir de bibliotecas de anticuerpos fágicos empleando las técnicas descritas en Clackson y col., Nature, 352:624-628 (1991) y Marks y col., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991), por ejemplo.

En la presente memoria descriptiva, los anticuerpos monoclonales incluyen anticuerpos "quiméricos" en los cuales una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes de anticuerpos obtenidos de una especie en particular o pertenecientes a una clase o subclase de anticuerpos en particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes de anticuerpos obtenidos de otras especies o pertenecientes a otras clases o subclases de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica deseada (véase la patente de EE.UU. nº 4.816.567 y Morrison y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en la presente memoria descriptiva incluyen los anticuerpos "primatizados", que comprenden secuencias de unión al antígeno con dominios variables obtenidas de un primate no humano (*por ejemplo*, el mono del Viejo Mundo, el simio, etc.) y secuencias humanas con regiones constantes.

Un anticuerpo "intacto" es aquél que comprende un sitio de unión al antígeno, así como un C_L y al menos los dominios constantes de las cadenas pesadas C_H1, C_H2 y C_H3. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia nativa (*por ejemplo*, dominios constantes de

secuencia nativa humana) o una variante de la secuencia de aminoácidos de los mismos. Preferentemente, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

Los "fragmentos de anticuerpos" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, preferentemente la región variable o de unión al antígeno del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen los fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (véase la patente de EE.UU. nº 5.641.870, Ejemplo 2; Zapata y col., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpos de cadena única; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos.

La digestión con papaína de anticuerpos produce dos fragmentos idénticos de unión al antígeno, llamados fragmentos "Fab", y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizarse fácilmente. El fragmento Fab está compuesto por una cadena L entera junto con el dominio de la región variable de la cadena H (V_H), y el primer dominio constante de una cadena pesada (C_H1). Cada fragmento Fab es monovalente en lo que respecta a la unión al antígeno, es decir, que tiene un único sitio de unión al antígeno. El tratamiento con pepsina de un anticuerpo produce un único fragmento $F(ab')_2$ de gran tamaño que corresponde aproximadamente a dos fragmentos Fab con enlace disulfuro que tienen una actividad de unión al antígeno divalente y siguen siendo capaces de establecer un enlace cruzado con el antígeno. Los fragmentos Fab' se diferencian de los Fab por tener algunos residuos adicionales en el extremo carboxi terminal del dominio C_H1, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación que se da en la presente memoria descriptiva al Fab' en el que el(los) residuo(s) de cisteína de los dominios constantes presenta(n) un grupo tiol libre. Los fragmentos $F(ab')_2$ de anticuerpos se producían originalmente como pares de fragmentos Fab' con cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpos.

El fragmento Fc comprende las porciones carboxi terminal de ambas cadenas pesadas mantenidas unidas por los disulfuros. Las secuencias en la región Fc, que también es la parte que reconocen los receptores Fc (FcR) que se encuentran en ciertas clases de células, determinan las funciones efectoras de los anticuerpos.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio completo de reconocimiento y unión al antígeno. Este fragmento está compuesto por un dímero del dominio de la región variable de una cadena pesada y otro de una cadena ligera en una estrecha asociación no covalente. A partir del plegamiento de estos dos dominios emanan seis bucles hipervariables (tres bucles de las cadenas H y L de cada uno de ellos) que aportan los residuos de aminoácidos para la unión al antígeno y confieren al anticuerpo la especificidad de unión al antígeno. No obstante,

incluso un dominio variable simple (o la mitad de un Fv que comprenda únicamente tres regiones CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer un antígeno y unirse a él, aunque con una afinidad inferior a la del sitio de unión completo.

Los "Fv de cadena única", abreviados también como "sFv" o "scFv", son fragmentos de anticuerpos que comprenden los dominios de anticuerpos V_H y V_L conectados a una única cadena de polipéptidos. Preferentemente, el polipéptido sFv comprende también un enlazador de polipéptidos entre los dominios V_H y V_L que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de los sFv, véase Pluckthun en The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, volumen 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, páginas 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, infra.

El término "diacuerpos" se refiere a pequeños fragmentos de anticuerpos preparados mediante la construcción de fragmentos sFv (véase el párrafo anterior) con enlazadores cortos (de entre 5 y 10 residuos) entre los dominios V_H and V_L de modo que se obtiene un emparejamiento intercadenas en lugar de intracadenas, dando lugar a un fragmento bivalente, es decir, un fragmento que tiene dos sitios de unión al antígeno. Los diacuerpos biespecíficos son heterodímeros de dos fragmentos sFv "cruzados" en los cuales los dominios V_H y V_L de los dos anticuerpos están presentes en diferentes cadenas de polipéptidos. Los diacuerpos se describen con más detalle en, por ejemplo, la patente europea 404.097, el documento WO 93/11161 y Hollinger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993).

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (*por ejemplo*, de roedores) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada del anticuerpo no humano. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable del receptor son sustituidos por los residuos de la región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), como el ratón, la rata, el conejo o los primates no humanos, que tenga la especificidad, afinidad y capacidad del anticuerpo deseadas. En algunos casos, los residuos de la región de estructura (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por sus correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentren en el anticuerpo receptor o donante. Estas modificaciones se llevan a cabo para refinar aún más el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos los dominios variables (o al menos uno, y típicamente dos) en los que todos, o sustancialmente todos, los bucles hipervariables correspondan a los de una inmunoglobulina no humana y todas, o sustancialmente todas, las FR sean las de una secuencia de inmunoglobulina humana. Opcionalmente, el anticuerpo humanizado

también comprenderá al menos una porción de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente humana. Para más detalles, véase Jones y col., Nature, 321:522-525 (1986), Riechmann y col., Nature, 332:323-329 (1988) y Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992).

Un "anticuerpo dependiente de la especie", por ejemplo, un anticuerpo IgE anti-humano de un mamífero, es un anticuerpo que tiene mayor afinidad de unión a un antígeno de una primera especie de mamíferos que un homólogo de ese antígeno procedente de una segunda especie de mamíferos. Normalmente, el anticuerpo dependiente de la especie "se une específicamente" a un antígeno humano (es decir, que tiene un valor de afinidad de unión (Kd) de no más de aproximadamente 1 x 10^{-7} M, preferentemente de no más de aproximadamente 1 x 10^{-8} y más preferentemente aún de no más de 1 x 10^{-9} M), pero tiene una afinidad de unión a un homólogo del antígeno procedente de una segunda especie de mamíferos no humanos que es al menos aproximadamente 50, 500 ó 1.000 veces inferior a su afinidad de unión al antígeno humano. El anticuerpo dependiente de la especie puede ser de cualquiera de las distintas clases de anticuerpos definidos anteriormente, pero preferentemente es un anticuerpo humano o humanizado.

Un "oligopéptido que se une a un TAT" es un oligopéptido que se une, preferentemente de forma específica, a un polipéptido TAT, tal como se describe en la presente memoria descriptiva. Los oligopéptidos que se unen a un TAT pueden sintetizarse químicamente a través de métodos conocidos de síntesis de oligopéptidos o prepararse y purificarse usando tecnología recombinante. La longitud de los oligopéptidos que se unen a un TAT es por lo general de al menos 5 aminoácidos, alternativamente de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ó 100 aminoácidos o más, siendo estos oligopéptidos capaces de unirse, preferentemente de forma específica, a un polipéptido TAT, tal como se describe en la presente memoria descriptiva. Los oligopéptidos que se unen a un TAT pueden identificarse sin excesiva experimentación a través de técnicas bien conocidas. A este respecto, cabe destacar que las técnicas para explorar bibliotecas de oligopéptidos a fin de encontrar oligopéptidos capaces de unirse específicamente a un polipéptido objetivo son bien conocidas en la materia (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n°s 5.556.762, 5.750.373, 4.708.871, 4.833.092, 5.223.409, 5.403.484, 5.571.689, 5.663.143; las publicaciones del PCT n^{os} WO 84/03506 y WO84/03564; Geysen y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3998-4002 (1984); Geysen y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:178-182 (1985); Geysen y col., en Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986); Geysen y col., J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987); Schoofs y col., J. Immunol.,

140:611-616 (1988), Cwirla, S. E. y col. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378; Lowman, H.B. y col. (1991) Biochemistry, 30:10832; Clackson, T. y col. (1991) Nature, 352: 624; Marks, J. D. y col. (1991), J. Mol. Biol., 222:581; Kang, A.S. y col. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363, y Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668).

Una "molécula orgánica que se une a un TAT" es una molécula orgánica distinta de un oligopéptido o anticuerpo, tal como se define en la presente memoria descriptiva, que se une, preferentemente de forma específica, a un polipéptido TAT, tal como se describe en la presente memoria descriptiva. Las moléculas orgánicas que se unen a un TAT pueden identificarse y sintetizarse químicamente a través de métodos conocidos (véase, por ejemplo, las publicaciones del PCT n^{os} WO00/00823 y WO00/39585). El tamaño de las moléculas orgánicas que se unen a un TAT es normalmente inferior a los 2.000 daltons, alternativamente inferior a unos 1.500, 750, 500, 250 ó 200 daltons, y dichas moléculas orgánicas capaces de unirse, preferentemente de forma específica, a un polipéptido TAT, tal como se describe en la presente memoria descriptiva, pueden identificarse sin excesiva experimentación a través de técnicas bien conocidas. A este respecto, cabe destacar que las técnicas para explorar bibliotecas de moléculas orgánicas a fin de encontrar moléculas capaces de unirse a un polipéptido objetivo son bien conocidas en la materia (véase, por ejemplo, las publicaciones del PCT n^{os} WO00/00823 y WO00/39585).

Un anticuerpo, un oligopéptido u otra molécula orgánica "que se une" a un antígeno de interés, por ejemplo, un objetivo antígeno polipéptido asociado al tumor, es aquél que se une al antígeno con suficiente afinidad para que el anticuerpo, el oligopéptido u otra molécula orgánica sea útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico al marcar como objetivo una célula o un tejido que exprese el antígeno, sin establecer una reacción cruzada significativa con otras proteínas. En tales realizaciones, el alcance de la unión del anticuerpo, el oligopéptido u otra molécula orgánica a una proteína "no objetivo" será aproximadamente inferior al 10% del grado de unión del anticuerpo, el oligopéptido u otra molécula orgánica a su proteína objetivo particular, tal como se ha determinado mediante los análisis de clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) o los sistemas de radioinmunoprecipitación (RIA). Con respecto a la unión de un anticuerpo, un oligopéptido u otra molécula orgánica a una molécula objetivo, el término "unión específica", "se une específicamente a" o es "específico para" un polipéptido particular, o un epítopo en un polipéptido objetivo determinado, significa que la unión es sensiblemente diferente a la de una interacción no específica. La unión específica puede medirse, por ejemplo, determinando la unión de una molécula en comparación con la unión de una molécula de control, que por lo general es una molécula de estructura similar que no tiene actividad de unión. Por ejemplo, la unión específica puede

determinarse mediante la competencia con una molécula de control que sea similar al objetivo, por ejemplo, el excedente de un objetivo no marcado. En este caso, la unión específica se indica si el excedente de un objetivo no marcado inhibe de forma competitiva la unión del objetivo marcado a una sonda. El término "unión específica", "se une específicamente a" o es "específico para" un polipéptido particular, o un epítopo en un polipéptido objetivo determinado, tal como se emplea en la presente memoria descriptiva, puede presentarse, por ejemplo, mediante una molécula que tiene un Kd para el objetivo de al menos aproximadamente 10^{-4} M, y alternativamente de al menos aproximadamente 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} M o más. En una realización, el término "unión específica" se refiere a la unión en la que una molécula se une a un polipéptido particular, o un epítopo en un polipéptido determinado, sin unirse sustancialmente a ningún otro polipéptido o epítopo de polipéptido.

Un anticuerpo, un oligopéptido u otra molécula orgánica que "inhiba el crecimiento de células tumorales que expresen un polipéptido TAT" o sea un "inhibidor del crecimiento" es aquél que resulta en una inhibición mensurable del crecimiento de células cancerosas que expresen o sobreexpresen el polipéptido TAT correspondiente. El polipéptido TAT puede ser un polipéptido transmembrana que se exprese en la superficie de una célula cancerosa o un polipéptido producido y secretado por una célula cancerosa. Los anticuerpos anti-TAT, los oligopéptidos o las moléculas orgánicas inhibidores del crecimiento preferentes inhiben el crecimiento de células tumorales que expresen un TAT en un grado superior al 20%, preferentemente entre un 20 y un 50% aproximadamente, y, con mayor preferencia, superior al 50% (por ejemplo, entre el 50 y el 100% aproximadamente), en comparación con el control correspondiente, que suele ser un grupo de células cancerosas no tratadas con el anticuerpo, el oligopéptido u otra molécula orgánica que se esté probando. En una realización, la inhibición del crecimiento se puede medir a una concentración del anticuerpo comprendida entre unos 0,1 y 30 μg/ml o unos 0,5 nM y 200 nM en cultivo celular, donde la inhibición del crecimiento se determina entre 1 y 10 días tras la exposición de las células tumorales al anticuerpo. La inhibición del crecimiento de las células tumorales *in vivo* se puede determinar de formas diversas como se describe más adelante en la sección Ejemplos experimentales. El anticuerpo es un inhibidor del crecimiento in vivo si la administración del anticuerpo anti-TAT, a concentraciones comprendidas aproximadamente entre 1 μg/kg y 100 mg/kg de peso corporal, da lugar a la reducción del tamaño del tumor o de la proliferación celular entre unos 5 días y 3 meses después de la primera administración del anticuerpo, preferentemente entre unos 5 y 30 días.

Un anticuerpo, un oligopéptido u otra molécula orgánica que "induce la apoptosis" es aquél que induce la muerte celular programada tal como se determina mediante la unión de anexina V, la fragmentación del ADN, la contracción de las células, la dilatación del retículo endoplásmico, la fragmentación celular y/o la formación de vesículas en la membrana (llamadas cuerpos apoptóticos). La célula es normalmente una que sobreexprese un polipéptido TAT. Preferentemente, la célula es una célula tumoral, por ejemplo, una célula de la próstata, el seno, el ovario, el estómago, el endometrio, el pulmón, el riñón, el colon o la vejiga. Existen diversos procedimientos para evaluar los sucesos celulares asociados a la apoptosis. Por ejemplo, la translocación de la fosfatidil serina (PS) puede medirse mediante la unión de anexina, la fragmentación del ADN puede evaluarse a través de su escalonamiento y la condensación nuclear o de cromatina, junto con la fragmentación del ADN, puede evaluarse por cualquier aumento de las células hipodiploides. Preferentemente, el anticuerpo, el oligopéptido u otra molécula orgánica que induce la apoptosis es aquél que desarrolla un nivel de inducción de la unión de anexina superior entre 2 y 50 veces, preferentemente entre 5 y 50 veces, y más preferentemente entre 10 y 50 veces, en comparación con las células no tratadas en un ensayo de unión de anexina.

Las "funciones efectoras" de un anticuerpo hacen referencia a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (la región Fc de una secuencia nativa o de una variante de una secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo y varían con el isotipo del anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de un anticuerpo incluyen: La unión a C1q y la citotoxicidad dependiente de complementos, la unión a receptores de Fc, la citotoxicidad con mediación celular dependiente de anticuerpos (ADCC), la fagocitosis, la regulación a la baja de los receptores en la superficie celular (por ejemplo, el receptor de células B) y la activación de las células B.

La "citotoxicidad con mediación celular dependiente de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una forma de citotoxicidad en la cual una Ig secretada y unida a los receptores de Fc (FcRs) presentes en determinadas células citotóxicas (por ejemplo, células asesinas naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) posibilita que estas células efectoras citotóxicas se unan de forma especifica a una célula objetivo que porte un antígeno y, posteriormente, la destruyan con citotoxinas. Los anticuerpos "arman" a las células citotóxicas y son absolutamente necesarios para dicha destrucción. Las células principales para mediar en la ADCC, es decir, las células NK, sólo expresan FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión del FcR en células hematopoyéticas se resume en la Tabla 3 de la página 464 de Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol., 9:457-92 (1991). A fin de evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, se puede realizar un ensayo de ADCC in vitro, como el que se describe en las patentes de EE.UU.

n°s 5.500.362 ó 5.821.337. Entre las células efectoras útiles para estos ensayos se incluyen las células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) y las asesinas naturales (NK). Como alternativa, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede evaluarse in vivo, por ejemplo, en un modelo animal como el que se detalla en Clynes y col., (USA) 95:652-656 (1998).

El término "receptor de Fc" o "FcR" describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferente es un FcR humano con secuencia nativa. Además, un FcR preferente es aquél que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluidas las variantes alélicas y las formas enlazadas alternativamente de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen el FcγRIIA (un "receptor activador") y el FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), los cuales tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en sus dominios citoplasmáticos. El receptor activador FcγRIIA contiene en su dominio citoplasmático un motivo activador inmunorreceptor basado en la tirosina (ITAM). El receptor inhibidor FcγRIIB contiene en su dominio citoplasmático un motivo inhibidor inmunorreceptor basado en la tirosina (ITIM). (véase la reseña M. en Daëron, Annu. Rev. Immunol., 15:203-234 (1997)). En Ravetch y Kinet, Annu. Rev. Immunol., 9:457-492 (1991), Capel y col., Immunomethods, 4:25-34 (1994) y de Haas y col., J. Lab. Clin. Med., 126:330-41 (1995) también se analizan los FcR. Otros FcR, incluyendo aquéllos que se identifiquen en el futuro, se engloban bajo el término "FcR" empleado en la presente memoria descriptiva. Este término también incluye el receptor neonatal, FcRn, responsable de la transferencia de los IgG maternos al feto (Guyer y col., J. Immunol., 117:587 (1976) y Kim y col., J. Immunol., 24:249 (1994)).

Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. Preferentemente, las células expresan al menos el FcγRIII y realizan la función efectora de ADCC. Ejemplos de leucocitos humanos que median en la ADCC serían las células mononucleares de la sangre periférica (PBMC), las células asesinas naturales (NK), los monocitos, las células T citotóxicas y los neutrófilos, siendo las PBMC y las NK las células preferentes. Las células efectoras se pueden aislar de una fuente nativa, por ejemplo, de la sangre.

La "citotoxicidad dependiente de complementos" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula objetivo en presencia del complemento. La activación de la vía clásica del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a los anticuerpos (de la subclase apropiada) que están unidos a su antígeno cognado. A fin de evaluar la activación del complemento, se puede efectuar un ensayo de CDC, por ejemplo, tal como se describe en Gazzano-Santoro y col., J. Immunol. Methods, 202:163 (1996).

Los términos "cáncer" y "canceroso" describen o se refieren al estado fisiológico de los mamíferos típicamente caracterizado por un crecimiento celular no regulado. Entre los ejemplos de cáncer se incluyen, pero no se limitan a, el carcinoma, el linfoma, el blastoma, el sarcoma y la leucemia o las neoplasias linfoides. Ejemplos más concretos de estas clases de cáncer serían el cáncer de células escamosas (por ejemplo, el cáncer de células escamosas epiteliales), el cáncer de pulmón (incluyendo el cáncer de células pulmonares pequeñas, el cáncer de células pulmonares no pequeñas, el adenocarcinoma pulmonar y el carcinoma pulmonar escamoso), el cáncer de peritoneo, el cáncer hepatocelular, el cáncer gástrico o estomacal (incluyendo el cáncer gastrointestinal), el cáncer pancreático, el glioblastoma, el cáncer cervical, el cáncer de ovario, el cáncer de hígado, el cáncer de vejiga, el cáncer del tracto urinario, el hepatoma, el cáncer de mama, el cáncer de colon, el cáncer rectal, el cáncer colorrectal, el carcinoma endometrial o uterino, el carcinoma de las glándulas salivares, el cáncer de riñón o renal, el cáncer de próstata, el cáncer vulval, el cáncer de tiroides, el carcinoma hepático, el carcinoma anal, el carcinoma de pene, el melanoma, el mieloma múltiple y el linfoma de células B, el cáncer de cerebro, así como el de cabeza y cuello, y metástasis asociadas.

Los términos "trastorno celular proliferativo" y "trastorno proliferativo" se refieren a trastornos asociados a algún grado de proliferación celular anómala. En una realización, el trastorno celular proliferativo es cáncer.

En la presente memoria descriptiva, el término "tumor" se refiere a todo crecimiento y proliferación celular neoplásico, tanto benigno como maligno, así como todos los tejidos y las células cancerosos y precancerosos.

Un anticuerpo, un oligopéptido u otra molécula orgánica que "induce la muerte celular" es aquél que convierte una célula viable en inviable. La célula es una que expresa un polipéptido TAT, y preferentemente que lo sobreexprese, en comparación con una célula normal de la misma clase de tejido. El polipéptido TAT puede ser un polipéptido transmembrana que se exprese en la superficie de una célula cancerosa o un polipéptido producido y secretado por una célula cancerosa. Preferentemente, la célula es una célula cancerosa, por ejemplo, una célula del seno, el ovario, el estómago, el endometrio, la glándula salivar, el pulmón, el hígado, el colon, el tiroides, el páncreas o la vejiga. La muerte celular *in vitro* se puede determinar en ausencia de células inmunoefectoras y de complemento a fin de distinguir si la muerte celular se ha inducido por citotoxicidad con mediación celular dependiente de anticuerpos (ADCC) o citotoxicidad dependiente de complementos (CDC). Por tanto, el ensayo de detección de muerte celular se puede llevar a cabo utilizando suero desactivado por calor (es decir, en ausencia de complemento) y en ausencia de células inmunoefectoras. Para determinar si el anticuerpo, el oligopéptido u otra molécula orgánica tiene

capacidad para inducir la muerte celular se puede evaluar la pérdida de la integridad de la membrana mediante evaluación de la absorción de yoduro de propidio (PI), azul tripán (véase Moore y col., Cytotechnology 17:1-11 (1995)) o 7AAD con respecto a células no tratadas. Los anticuerpos inductores de la muerte celular, oligopéptidos u otras moléculas orgánicas preferentes son los que inducen la absorción de PI en el ensayo de absorción de PI en células BT474.

Una "célula que expresa un TAT" es una célula que expresa un polipéptido TAT endógeno o transfectado bien en la superficie celular o de forma secretada. Un "cáncer que expresa un TAT" es un cáncer que contiene células con un polipéptido TAT presente en la superficie celular o que producen y secretan un polipéptido TAT. Opcionalmente, un "cáncer que expresa un TAT" produce niveles suficientes de polipéptidos TAT en la superficie de sus células, de modo que un anticuerpo anti-TAT, un oligopéptido u otra molécula orgánica pueda unírsele y proporcionarle un efecto terapéutico. En otra realización, un "cáncer que expresa un TAT" opcionalmente produce y secreta niveles suficientes de polipéptidos TAT en la superficie de sus células, de modo que un anticuerpo anti-TAT, un oligopéptido u otra molécula orgánica antagonista pueda unírsele y proporcionarle un efecto terapéutico. Con relación a este ultimo caso, el antagonista puede ser un oligonucleótido antisentido que reduce, inhibe o previene la producción y secreción del polipéptido TAT que las células tumorales secretan. Un cáncer que "sobreexpresa" un polipéptido TAT es aquél que tiene niveles significativamente superiores de polipéptidos TAT en la superficie de sus células, o produce y secreta, en comparación con una célula no cancerosa de la misma clase de tejido. Dicha sobreexpresión puede estar causada por una amplificación génica o un aumento de la transcripción o traducción. La sobreexpresión de los polipéptidos TAT puede determinarse en un ensayo de diagnóstico o prognosis evaluando el aumento de los niveles de la proteína TAT presente en la superficie de una célula, o que la propia célula ha secretado (por ejemplo, a través de un ensayo inmunohistoquímico usando anticuerpos anti-TAT preparados para actuar contra un polipéptido TAT aislado mediante tecnología de ADN recombinante a partir de un ácido nucleico aislado que codifica el polipéptido TAT, o análisis FACS, etc.). Como alternativa, o adicionalmente, se pueden medir los niveles en la célula del ácido nucleico que codifica el polipéptido TAT o el ARNm, por ejemplo, a través de hibridación fluorescente *in situ* empleando una sonda basada en ácidos nucleicos correspondiente a un ácido nucleico que codifique un TAT o el complemento del mismo (FISH; véase el documento WO98/45479 publicado en octubre de 1998), o las técnicas de "Southern blot", "Northern blot" o reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como por ejemplo la PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR). También se puede estudiar la sobreexpresión del polipéptido TAT midiendo el antígeno vertido en un fluido biológico como el suero, por ejemplo, utilizando

ensayos basados en anticuerpos (véase también la patente de EE.UU. nº 4.933.294 concedida el 12 de junio de 1990, el documento WO91/05264 publicado el 18 de abril de 1991, la patente de EE.UU. nº 5.401.638 concedida el 28 de marzo de 1995 y Sias y col., J. Immunol. Methods, 132: 73-80 (1990)). Aparte de los anteriores ensayos, el experto en la materia también dispone de diversos ensayos *in vivo*. Por ejemplo, se puede exponer células del cuerpo del paciente a un anticuerpo que esté opcionalmente marcado con un marcador detectable, por ejemplo, un isótopo radiactivo, y evaluar la unión del anticuerpo a dichas células, por ejemplo, mediante la exploración externa por radiactividad o analizando una biopsia tomada de un paciente previamente expuesto al anticuerpo.

Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "inmunoadhesina" designa moléculas parecidas a anticuerpos que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesina") con las funciones efectoras de los dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden la fusión de una secuencia de aminoácidos que tenga la especificidad de unión deseada, y que no sea el reconocimiento de un antígeno ni el sitio de unión de un anticuerpo (es decir, que sea "heterólogo") con una secuencia del dominio constante de inmunoglobulina. La porción de adhesina de una molécula de inmunoadhesina es, generalmente, una secuencia de aminoácidos contiguos que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o ligando. La secuencia del dominio constante de inmunoglobulina en la inmunoadhesina puede obtenerse a partir de cualquier inmunoglobulina, como por ejemplo las subclases IgG-1, IgG-2, IgG-3 o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM.

En la presente memoria descriptiva, el término "marcador" se refiere a un compuesto o una composición detectable que se conjuga directa o indirectamente con el anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica para generar un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica "marcado". El marcador puede ser detectable por sí mismo (por ejemplo, marcadores de isótopos radioactivos o fluorescentes) o, en el caso de un marcador enzimático, puede catalizar la alteración química de un compuesto o una composición sustrato que sea detectable.

El término "agente citotóxico", en el contexto de la presente memoria descriptiva, se refiere a una sustancia que inhibe o evita la función de las células y/o causa su destrucción. El término pretende incluir isótopos radiactivos (por ejemplo, At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32} y los isótopos radiactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, enzimas y fragmentos de éstas como enzimas nucleolíticas, antibióticos y toxinas como las de molécula pequeña o con actividad enzimática de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo los fragmentos y/o las variantes de las mismas y los diversos agentes antitumorales o antineoplásicos detallados más

adelante. Otros agentes citotóxicos se describen más adelante. Un agente tumoricida ocasiona la destrucción de las células tumorales.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil para el tratamiento del cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos serían los agentes alquilantes como la tiotepa y la ciclofosfamida (CYTOXAN®); los sulfonatos de alquilo como el busulfán, el improsulfán y el piposulfán; las aziridinas como la benzodopa, la carboquona, la meturedopa y la uredopa; las etiloniminas y metilamelaminas incluyendo la altretamina, la trietilenomelamina, la trietilenofosforamida, la trietilenotiofosforamida y la trimetilolomelamina; los acetogeninos (en especial, el bullatacín y la bullatacinona); el delta-9-tetrahidrocanabinol (dronabinol, MARINOL®); la beta-lapachona; el lapachol; las colchicinas; el ácido betulínico, una camptotecina (incluyendo el topotecán análogo sintético (HYCAMTIN®), el CPT-11 (irinotecán, CAMPTOSAR®), la acetilcamptotecina, la escopolectina y la 9-aminocamptotecina); la briostatina; la callistatina; el CC-1065 (incluyendo sus análogos sintéticos adocelesina, carcelesina y bicelesina); la podofilotoxina; el ácido podofilínico; la teniposida; las criptoficinas (particularmente la criptoficina 1 y la 8); la dolastatina; la duocarmicina (incluyendo los análogos sintéticos KW-2189 y CB1-TM1); la eleuterobina; la pancratistatina; una sarcodictina; la espongistatina; las mostazas nitrogenadas como el clorambucil, la clornafacina, la colofosfamida, la estramustina, la ifosfamida, la mecloretamina, el clorhidrato de óxido de mecloretamina, el melfalán, la novembichina, la fenesterina, la prednimustina, la trofosfamida y la uramustina; las nitrosureas como la carmustina, la clorozotocina, la fotemustina, la lomustina, la nimustina y la ranimustina; los antibióticos como los de enedina (por ejemplo, la caliqueamicina, especialmente la caliqueamicina gamma 1I y la omega I1 (véase, por ejemplo, Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)); la dinemicina, incluyendo la dinemicina A; una esperamicina; el cromóforo de neocarcinostatina y los cromóforos de antibióticos de enedina cromoproteína relacionados (las aclacinomisinas, la actinomicina, la autramicina, la azaserina, las bleomicinas, la cactinomicina, la carabicina, la carminomicina, la carcinofilina, las cromomicinas, la dactinomicina, la daunorrubicina, la detorrubicina, la 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, la doxorrubicina (incluyendo ADRIAMYCIN®, la morfolino-doxorrubicina, la cianomorfolino-doxorrubicina, la 2-pirrolino-doxorrubicina y la desoxidoxorrubicina), la epirrubicina, la esorrubicina, la idarrubicina, la marcelomicina, las mitomicinas como la mitomicina C, el ácido micofenólico, la nogalamicina, las olivomicinas, la peplomicina, la potfiromicina, la puromicina, la quelamicina, la rodorrubicina, la estreptonigrina, la estreptozocina, la tubercidina, el ubenimex, la cinostatina y la zorrubicina); los antimetabolitos como el metotrexato y el 5-fluorouracilo (5-FU); los análogos del ácido fólico como la denopterina, el metotrexato, la teropterina y el trimetrexato;

los análogos de la purina como la fludarabina, la 6-mercaptopurina, la tiamiprina y la tioguanina; los análogos de la pirimidina como la ancitabina, la azacitidina, la 6-azauridina, el carmofur, la citarabina, la didesoxiuridina, la doxifluridina, la enocitabina y la floxuridina; los andrógenos como la calusterona, el propionato de dromostanolona, el epitiostanol, el mepitiostano, la testolactona los antiadrenérgicos como la aminoglutetimida, el mitotano y el trilostano; un reabastecedor del ácido fólico como el ácido folínico; la aceglatona; el glucósido aldofosfamida; el ácido aminolevulínico; el eniluracilo; la amsacrina; el bestrabucil; el bisantreno; el edatraxato; la defofamina; la demecolcina; la diaziquona; la elfornitina; el acetato de eliptinio; una epotilona; el etoglúcido; el nitrato de galio; la hidroxiurea; el lentinán; la lonidainina; los maitansinoides como la maitansina y las ansamitocinas; la mitoguazona; la mitoxantrona; el mopidanmol; la nitraerina; el pentostatín; el fenamet; la pirarrubicina; la losoxantrona; la 2-etilhidracida; la procarbacina; el complejo polisacárido PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); el razoxano; la rizoxina; el sizofirán; el espirogermanio; el ácido tenuazónico; la triaciquona; la 2,2',2"-triclorotrietilamina; los tricotecenos (especialmente la toxina T-2, el verracurín A, el roridín A y la anguidina); el uretano; la vindesina (ELDISINE®, FILDESIN®); la dacarbacina; la manomustina; el mitobronitol; el mitolactol; el pipobromán; la gacitosina; la arabinosida ("Ara-C"); la tiotepa; los taxoides, por ejemplo, el paclitaxel (TAXOL®) (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), la formulación de nanopartículas de paclitaxel mediante ingeniería de albúmina libre de Cremofor (ABRAXANE^{TM}) (American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Illinois) y el doxetaxel (TAXOTERE®) (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, Francia); el clorambucil; la gemcitabina (GEMZAR®); la 6-tioguanina; la mercaptopurina; el metatrexato; los análogos de platino o los basados en platino como el cisplatino y el carboplatino; la vinblastina (VELBAN®); el platino; el etopósido (VP-16); la ifosfamida; la mitoxantrona; la vincristina (ONCOVIN®); el oxaliplatino; la leucovovina; la vinorrelbina (NAVELBINE®); la novantrona; el edatrexato; la daunomicina; la aminopterina; el ibandronato; el inhibidor RFS 2000 de la topoisomerasa; la difluorometilornitina (DMFO); los retinoides como el ácido retinoico; la capecitabina (XELODA®); las sales, los ácidos o los derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de las sustancias anteriores, así como las combinaciones de una o más de las sustancias anteriores como la CHOP, la abreviatura de una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina y prednisolona, y la FOLFOX, la abreviatura de un régimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN^{TM}) combinado con 5-FU y leucovovina.

También se incluyen en esta definición los agentes antihormonales que regulan, reducen, bloquean o inhiben los efectos de las hormonas que pueden fomentar el crecimiento del cáncer y se presentan a menudo en la forma de un tratamiento sistémico o de aplicación integral a todo el

cuerpo. Estos agentes podrían ser hormonas propiamente. Los ejemplos comprenden a los antiestrógenos y los moduladores selectivos de receptores de estrógenos (SERM), incluyendo, por ejemplo, el tamoxifeno (también el tamoxifeno NOLVADEX®), el raloxifeno (EVISTA®), el droloxifeno, el 4-hidroxitamoxifeno, el trioxifeno, el keoxifeno, el LY117018, la onapristona y el toremifeno (FARESTON®); las antiprogesteronas; los reguladores a la baja de los receptores de estrógenos (ERD); los agentes que oprimen o cierran los ovarios, por ejemplo, los agonistas de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) como el acetato de leuprolida (LUPRON® y ELIGARD®), el acetato de goserelina, el acetato de buserelina y la tripterelina; otros antiandrógenos como la flutamida, la nilutamida y la bicalutamida y los inhibidores de la aromatasa que inhiben la enzima aromatasa, encargada de regular la producción de estrógenos en las glándulas suprarrenales, como, por ejemplo, las 4(5)-imidazolas, la aminoglutetimida, el acetato de megestrol (MEGASE®), el exemestano (AROMASIN®), la formestania, la fadrozola, la vorozola (RIVISOR®), el letrozol (FEMARA®) y la anastrozola (ARIMIDEX®). Además, esta definición de los agentes quimioterapéuticos incluye los bisfosfonatos como el clodronato (por ejemplo, BONEFOS® u OSTAC®), el etidronato (DIDROCAL®), el NE-58095, el ácido zoledrónico/zoledronato (ZOMETA®), el alendronato (FOSAMAX®), el pamidronato (AREDIA®), el tiludronato (SKELID®) o el risedronato (ACTONEL®), así como la troxacitabina (un análogo de la citosina nucleósida 1,3-dioxolano); los oligonucleótidos antisentido, en particular los que inhiben la expresión génica en las rutas de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante, como, por ejemplo, el PKC-alfa, el Raf, el H-Ras y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); las vacunas como THERATOPE® y las que se aplican para terapias génicas, por ejemplo, la ALLOVECTIN®, la LEUVECTIN® y la VAXID®; el inhibidor de la topoisomerasa 1 LURTOTECAN®; el rmRH ABARELIX®; el ditosilato de lapatinib (un inhibidor de molécula pequeña doble de tirosincinasa del ErbB-2 y el EGFR conocido también como GW572016) y las sales, los ácidos o los derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de las sustancias anteriores.

Un "agente inhibidor del crecimiento" se refiere, en el contexto de la presente memoria descriptiva, a un compuesto o una composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente una célula cancerosa que exprese un TAT, tanto *in vitro* como *in vivo*. Así, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduzca significativamente el porcentaje de células que expresen un TAT en la fase S. Ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento serían los agentes que bloquean la progresión del ciclo celular (en un punto distinto de la fase S), como los agentes que inducen la detención de la G1 y la fase M. Entre los bloqueadores clásicos de la fase M se incluyen

las vincas (vincristina y vinblastina), los taxanos y los inhibidores de la topoisomerasa II como la doxorrubicina, la epirrubicina, la daunorrubicina, el etopósido y la bleomicina. Esos agentes que detienen la G1 también se desbordan en la detención de la fase S, por ejemplo, los agentes de alquilación del ADN como el tamoxifeno, la prednisona, la dacarbacina, la mecloretamina, el cisplatino, el metotrexato, el 5-fluorouracilo y la ara-C. Puede encontrarse más información al respecto en The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., capítulo 1, titulado "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" (Regulación del ciclo celular, oncogenes y fármacos antineoplásicos) por Murakami y col. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especially p. 13. The taxanes (paclitaxel and docetaxel) are anticancer drugs both derived from the yew tree.Filadelfia, 1995), especialmente en la página 13. Los taxanos (paclitaxel y docetaxel) son medicamentos anticáncer derivados ambos del tejo. El docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer) se deriva del tejo europeo y es un análogo semisintético del paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). El paclitaxel y el docetaxel promueven, a partir de dímeros de tubulina, la unión de microtúbulos y los estabilizan evitando la despolimerización, que ocasiona la inhibición de la mitosis celular.

La "doxorrubicina" es un antibiótico de antraciclina. El nombre químico completo de la doxorrubicina es (8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-trideoxi-α-L-lixo-hexapiranosil)oxi]-7,8,9,10-tetrahidro-6,8,11-trihidroxi-8-(hidroxiacetil)-1-metoxi-5,12-naftacenediona.

El término "citoquina" denomina de forna genérica aquellas proteínas, liberadas por una población de células, que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Ejemplos de tales citoquinas son las linfoquinas, las monoquinas y las hormonas polipeptídicas tradicionales. Las citoquinas también incluyen hormonas del crecimiento como la hormona humana del crecimiento, la hormona humana del crecimiento N-metionilo y la hormona bovina del crecimiento, la hormona paratiroidea, la tiroxina, la insulina, la proinsulina, la relaxina, la prorrelaxina, las hormonas glicoproteicas como la hormona estimuladora del folículo (FSH), la hormona estimuladora del tiroides (TSH) y la hormona luteinizante (LH), el factor del crecimiento hepático, el factor del crecimiento fibroblástico, la prolactina, el lactógeno placentario, los factores α y β de la necrosis tumoral, las sustancias de inhibición mulleriana, los péptidos asociados a la gonadotropina de los ratones, la inhibina, la activina, el factor del crecimiento endotelial vascular, la integrina, la trombopoyetina (TPO), los factores del crecimiento nervioso como el NGF-β, el factor del crecimiento plaquetario, los factores del crecimiento transformador (TGF) como el TGF-α y el TGF-β, los factores I y II del crecimiento similar a la insulina, la eritropoyetina (EPO), los factores osteoinductivos, los interferones como el interferón-α, -β y -γ, los factores de estimulación colonial

(CSF) como el CSF macrófago (M-CSF), el CSF granulocito macrófago (GM-CSF) y el CSF granulocito (G-CSF), las interleuquinas (IL) como la IL-1, la IL-1a, la IL-2, la IL-3, la IL-4, la IL-5, la IL-6, la IL-7, la IL-8, la IL-9, la IL-11 y la IL-12, un factor de necrosis tumoral como el TNF-α o el TNF-ß y otros factores polipéptidos incluyendo el LIF y el ligando de kit (KL). En el contexto de la presente memoria descriptiva, el término citoquina incluye proteínas de fuentes naturales o cultivos de células recombinantes y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas con secuencia nativa.

El término "prospecto" se utiliza para hacer referencia a las instrucciones habitualmente incluidas en los envases comerciales de los productos terapéuticos, las cuales contienen información sobre las indicaciones, el uso, la posología, la administración, las contraindicaciones y/o las advertencias de uso de dichos productos terapéuticos.

Tabla 1

```
/*
 *
 * C-C increased from 12 to 15
 * Z is average of EQ
 * B is average of ND
 * match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
 */
#define         _M      -8      /* value of a match with a stop */

int     _day[26][26] = {
/*   A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U V W X Y Z */
/* A */  { 2, 0,-2, 0, 0,-4, 1,-1,-1, 0,-1,-2,-1, 0,_M, 1, 0,-2, 1, 1, 0, 0,-6, 0,-3, 0},
/* B */  { 0, 3,-4, 3, 2,-5, 0, 1,-2, 0, 0,-3,-2, 2,_M,-1, 1, 0, 0, 0, 0,-2,-5, 0,-3, 1},
/* C */  {-2,-4,15,-5,-5,-4,-3,-3,-2, 0,-5,-6,-5,-4,_M,-3,-5,-4, 0,-2, 0,-2,-8, 0, 0,-5},
/* D */  { 0, 3,-5, 4, 3,-6, 1, 1,-2, 0, 0,-4,-3, 2,_M,-1, 2,-1, 0, 0, 0,-2,-7, 0,-4, 2},
/* E */  { 0, 2,-5, 3, 4,-5, 0, 1,-2, 0, 0,-3,-2, 1,_M,-1, 2,-1, 0, 0, 0,-2,-7, 0,-4, 3},
/* F */  {-4,-5,-4,-6,-5, 9,-5,-2, 1, 0,-5, 2, 0,-4,_M,-5,-5,-4,-3,-3, 0,-1, 0, 0, 7,-5},
/* G */  { 1, 0,-3, 1, 0,-5, 5,-2,-3, 0,-2,-4,-3, 0,_M,-1,-1,-3, 1, 0, 0,-1,-7, 0,-5, 0},
/* H */  {-1, 1,-3, 1, 1,-2,-2, 6,-2, 0, 0,-2,-2, 2,_M, 0, 3, 2,-1,-1, 0,-2,-3, 0, 0, 2},
/* I */  {-1,-2,-2,-2,-2, 1,-3,-2, 5, 0,-2, 2, 2,-2,_M,-2,-2,-2,-1, 0, 0, 4,-5, 0,-1,-2},
/* J */  { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* K */  {-1, 0,-5, 0, 0,-5,-2, 0,-2, 0, 5,-3, 0, 1,_M,-1, 1, 3, 0, 0, 0,-2,-3, 0,-4, 0},
/* L */  {-2,-3,-6,-4,-3, 2,-4,-2, 2, 0,-3, 6, 4,-3,_M,-3,-2,-3,-3,-1, 0, 2,-2, 0,-1,-2},
/* M */  {-1,-2,-5,-3,-2, 0,-3,-2, 2, 0, 0, 4, 6,-2,_M,-2,-1, 0,-2,-1, 0, 2,-4, 0,-2,-1},
/* N */  { 0, 2,-4, 2, 1,-4, 0, 2,-2, 0, 1,-3,-2, 2,_M,-1, 1, 0, 1, 0, 0,-2,-4, 0,-2, 1},
/* O */  {_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,
          0,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M},
/* P */  { 1,-1,-3,-1,-1,-5,-1, 0,-2, 0,-1,-3,-2,-1,_M, 6, 0, 0, 1, 0, 0,-1,-6, 0,-5, 0},
/* Q */  { 0, 1,-5, 2, 2,-5,-1, 3,-2, 0, 1,-2,-1, 1,_M, 0, 4, 1,-1,-1, 0,-2,-5, 0,-4, 3},
/* R */  {-2, 0,-4,-1,-1,-4,-3, 2,-2, 0, 3,-3, 0, 0,_M, 0, 1, 6, 0,-1, 0,-2, 2, 0,-4, 0},
/* S */  { 1, 0, 0, 0, 0, 0,-3, 1,-1,-1, 0, 0,-3,-2, 1,_M, 1,-1, 0, 2, 1, 0,-1,-2, 0,-3, 0},
/* T */  { 1, 0,-2, 0, 0,-3, 0,-1, 0, 0, 0,-1,-1, 0,_M, 0,-1,-1, 1, 3, 0, 0,-5, 0,-3, 0},
/* U */  { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* V */  { 0,-2,-2,-2,-2,-1,-1,-2, 4, 0,-2, 2, 2,-2,_M,-1,-2,-2,-1, 0, 0, 4,-6, 0,-2,-2},
/* W */          {-6,-5,-8,-7,-7, 0,-7,-3,-5, 0,-3,-2,-4,-4,_M,-6,-5, 2,-2,-5, 0,-6,17, 0, 0,-6},
/* X */  { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* Y */  {-3,-3, 0,-4,-4, 7,-5, 0,-1, 0,-4,-1,-2,-2,_M,-5,-4,-4,-3,-3, 0,-2, 0, 0,10,-4},
/* Z */  { 0, 1,-5, 2, 3,-5, 0, 2,-2, 0, 0,-2,-1, 1,_M, 0, 3, 0, 0, 0, 0,-2,-6, 0,-4, 4}
};
```

Tabla 1 (cont')

```
/*
 */
#include <stdio.h>
#include <ctype.h>

#define     MAXJMP    16    /* max jumps in a diag */
#define     MAXGAP    24    /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define     JMPS      1024  /* max jmps in an path */
#define     MX        4     /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */

#define     DMAT      3     /* value of matching bases */
#define     DMIS      0     /* penalty for mismatched bases */
#define     DINS0     8     /* penalty for a gap */
#define     DINS1     1     /* penalty per base */
#define     PINS0     8     /* penalty for a gap */
#define     PINS1     4     /* penalty per residue */

struct jmp {
        short           n[MAXJMP]; /* size of jmp (neg for dely) */
        unsigned short  x[MAXJMP]; /* base no. of jmp in seq x */
};                                 /* limits seq to 2^16 -1 */

struct diag {
        int             score;     /* score at last jmp */
        long            offset;    /* offset of prev block */
        short           ijmp;      /* current jmp index */
        struct jmp      jp;        /* list of jmps */
};

struct path {
        int     spc;        /* number of leading spaces */
        short   n[JMPS];    /* size of jmp (gap) */
        int     x[JMPS];    /* loc of jmp (last elem before gap) */
};

char            *ofile;             /* output file name */
char            *namex[2];          /* seq names: getseqs() */
char            *prog;              /* prog name for err msgs */
char            *seqx[2];                   /* seqs: getseqs() */
int             dmax;               /* best diag: nw() */
int             dmax0;                      /* final diag */
int             dna;                /* set if dna: main() */
int             endgaps;                    /* set if penalizing end gaps */
int             gapx, gapy;         /* total gaps in seqs */
int             len0, len1;         /* seq lens */
int             ngapx, ngapy;       /* total size of gaps */
int             smax;               /* max score: nw() */
int             *xbm;               /* bitmap for matching */
```

```
long            offset;             /* current offset in jmp file */
struct diag     *dx;                /* holds diagonals */
struct path     pp[2];              /* holds path for seqs */

char            *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char            *getseq(), *g_calloc();
```

Tabla 1 (cont')

```
/* Needleman-Wunsch alignment program
 *
 * usage: progs file1 file2
 *  where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
 *  The sequences can be in upper- or lower-case an may contain ambiguity
 *  Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
 *  Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
 *  A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
 *  Output is in the file "align.out"
 *
 * The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
 * Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
 */
#include "nw.h"
#include "day.h"

static  _dbval[26] = {
        1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};

static  _pbval[26] = {
        1, 2|(1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
        128, 256, 0xFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
        1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
        1<<23, 1<<24, 1<<25|(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))
};

main(ac, av)                                                    main
        int     ac;
        char    *av[];
{
        prog = av[0];
        if (ac != 3) {
                fprintf(stderr,"usage: %s file1 file2\n", prog);
                fprintf(stderr,"where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
                fprintf(stderr,"The sequences can be in upper- or lower-case\n");
                fprintf(stderr,"Any lines beginning with ';' or '<' are ignored\n");
                fprintf(stderr,"Output is in the file \"align.out\"\n");
                exit(1);
        }
        namex[0] = av[1];
        namex[1] = av[2];
        seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
        seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
        xbm = (dna)? dbval : pbval;

        endgaps = 0;            /* 1 to penalize endgaps */
        ofile = "align.out";            /* output file */
```

```
nw();          /* fill in the matrix, get the possible jmps */
readjmps();    /* get the actual jmps */
print();       /* print stats, alignment */

cleanup(0);    /* unlink any tmp files */}
```

Tabla 1 (cont')

```
/* do the alignment, return best score: main()
 * dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
 * pro: PAM 250 values
 * When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
 * a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
 * to a gap in seq y.
 */
nw()                                                              nw
{
        char        *px, *py;           /* seqs and ptrs */
        int         *ndely, *dely;  /* keep track of dely */
        int         ndelx, delx;    /* keep track of delx */
        int         *tmp;           /* for swapping row0, row1 */
        int         mis;            /* score for each type */
        int         ins0, ins1;     /* insertion penalties */
        register        id;             /* diagonal index */
        register        ij;             /* jmp index */
        register        *col0, *col1;   /* score for curr, last row */
        register        xx, yy;         /* index into seqs */

        dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));
        ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
        dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
        col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
        col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
        ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
        ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;
        smax = -10000;
        if (endgaps) {
                for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
                        col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
                        ndely[yy] = yy;
                }
                col0[0] = 0;    /* Waterman Bull Math Biol 84 */
        }
        else
                for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
                        dely[yy] = -ins0;
        /* fill in match matrix
         */
        for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
                /* initialize first entry in col
                 */
                if (endgaps) {
                        if (xx == 1)
                                col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
                        else
                                col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
```

```
        ndelx = xx;
}
else {
        col1[0] = 0;
        delx = -ins0;
        ndelx = 0;
}
```

Tabla 1 (cont')


```
for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
        mis = col0[yy-1];
        if (dna)
                mis += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
        else
                mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];

        /* update penalty for del in x seq;
         * favor new del over ongong del
         * ignore MAXGAP if weighting endgaps
         */
        if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
                if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
                        dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
                        ndely[yy] = 1;
                } else {
                        dely[yy] -= ins1;
                        ndely[yy]++;
                }
        } else {
                if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
                        dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
                        ndely[yy] = 1;
                } else
                        ndely[yy]++;
        }

        /* update penalty for del in y seq;
         * favor new del over ongong del
         */
        if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
                if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
                        delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
                        ndelx = 1;
                } else {
                        delx -= ins1;
                        ndelx++;
                }
        } else {
                if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
                        delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
                        ndelx = 1;
                } else
                        ndelx++;
        }

        /* pick the maximum score; we're favoring
         * mis over any del and delx over dely
```

```
*/
```

...nw

```
id = xx - yy + len1 - 1;
if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
        col1[yy] = mis;
```


168

Tabla 1 (cont')

```
                else if (delx >= dely[yy]) {
                        col1[yy] = delx;
                        ij = dx[id].ijmp;
                        if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndelx >= MAXJMP
                        && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
                                dx[id].ijmp++;
                                if (++ij >= MAXJMP) {
                                        writejmps(id);
                                        ij = dx[id].ijmp = 0;
                                        dx[id].offset = offset;
                                        offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
                                }
                        }
                        dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
                        dx[id].jp.x[ij] = xx;
                        dx[id].score = delx;
                }
                else {
                        col1[yy] = dely[yy];
                        ij = dx[id].ijmp;
if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
                        && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
                                dx[id].ijmp++;
                                if (++ij >= MAXJMP) {
                                        writejmps(id);
                                        ij = dx[id].ijmp = 0;
                                        dx[id].offset = offset;
                                        offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
                                }
                        }
                        dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
                        dx[id].jp.x[ij] = xx;
                        dx[id].score = dely[yy];
                }
                if (xx == len0 && yy < len1) {
                        /* last col
                         */
                        if (endgaps)
                                col1[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
                        if (col1[yy] > smax) {
                                smax = col1[yy];
                                dmax = id;
                        }
                }
        }
        if (endgaps && xx < len0)
                col1[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
        if (col1[yy-1] > smax) {
                smax = col1[yy-1];
```

```
                dmax = id;
        }
        tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;          }
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
(void) free((char *)col1);                    }
```

Tabla 1 (cont')

```
/*
 *
 * print() -- only routine visible outside this module
 *
 * static:
 * getmat() -- trace back best path, count matches: print()
 * pr_align() -- print alignment of described in array p[]: print()
 * dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
 * nums() -- put out a number line: dumpblock()
 * putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 * stars() - -put a line of stars: dumpblock()
 * stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
 */

#include "nw.h"

#define SPC   3
#define P_LINE      256     /* maximum output line */
#define P_SPC       3       /* space between name or num and seq */

extern _day[26][26];
int     olen;           /* set output line length */
FILE    *fx;            /* output file */

print()                                                          print
{
        int     lx, ly, firstgap, lastgap;          /* overlap */

        if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
                fprintf(stderr,"%s: can't write %s\n", prog, ofile);
                cleanup(1);
        }
        fprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
        fprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
        olen = 60;
        lx = len0;
        ly = len1;
        firstgap = lastgap = 0;
        if (dmax < len1 - 1) {  /* leading gap in x */
                pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
                ly -= pp[0].spc;
        }
        else if (dmax > len1 - 1) {     /* leading gap in y */
                pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
                lx -= pp[1].spc;
        }
        if (dmax0 < len0 - 1) {         /* trailing gap in x */
                lastgap = len0 - dmax0 -1;
                lx -= lastgap;
```

```
}
else if (dmax0 > len0 - 1) {    /* trailing gap in y */
        lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
        ly -= lastgap;
}
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
pr_align();     }
```


172

Tabla 1 (cont')

```
/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)                                    getmat
        int     lx, ly;                 /* "core" (minus endgaps) */
        int     firstgap, lastgap;              /* leading trailing overlap */
{
        int             nm, i0, i1, siz0, siz1;
        char            outx[32];
        double          pct;
        register                n0, n1;
        register char  *p0, *p1;
        /* get total matches, score
         */
        i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
        p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
        p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
        n0 = pp[1].spc + 1;
        n1 = pp[0].spc + 1;
        nm = 0;
        while ( *p0 && *p1 ) {
                if (siz0) {
                        p1++;
                        n1++;
                        siz0--;
                }
                else if (siz1) {
                        p0++;
                        n0++;
                        siz1--;
                }
                else {
                        if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
                                nm++;
                        if (n0++ == pp[0].x[i0])
                                siz0 = pp[0].n[i0++];
                        if (n1++ == pp[1].x[i1])
                                siz1 = pp[1].n[i1++];
                        p0++;
                        p1++;
                }
        }

        /* pct homology:
         * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
         * else, knock off overhangs and take shorter core
         */
        if (endgaps)
```

```
        lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
else
        lx = (lx < ly)? lx : ly;
pct = 100.*(double)nm/(double)lx;
fprintf(fx, "\n");
fprintf(fx, "<%d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
        nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);
```

Tabla 1 (cont')

```
        fprintf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gapx);                    ...getmat
        if (gapx) {
                (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
                        ngapx, (dna)? "base":"residue", (ngapx == 1)? "":"s");
                fprintf(fx,"%s", outx);
        fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
        if (gapy) {
                (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
                        ngapy, (dna)? "base":"residue", (ngapy == 1)? "":"s");
                fprintf(fx,"%s", outx);
        }
        if (dna)
                fprintf(fx,
                "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
                smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
        else
                fprintf(fx,
                "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
                smax, PINS0, PINS1);
        if (endgaps)
                fprintf(fx,
                "<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
                firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
                lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
        else
                fprintf(fx, "<endgaps not penalized\n");
}
 static         nm;             /* matches in core -- for checking */
 static         lmax;           /* lengths of stripped file names */
 static         ij[2];          /* jmp index for a path */
 static         nc[2];          /* number at start of current line */
 static         ni[2];          /* current elem number -- for gapping */
 static         siz[2];
 static char    *ps[2];         /* ptr to current element */
 static char    *po[2];         /* ptr to next output char slot */
 static char    out[2][P_LINE];     /* output line */
 static char    star[P_LINE]; /* set by stars() */
/*
 * print alignment of described in struct path pp[]
 */
static
pr_align()                                                              pr_align
{
        int             nn;     /* char count */
        int             more;
        register                i;

        for (i = 0, lmax = 0; i < 2; i++) {
```

```
nn = stripname(namex[i]);
if (nn > lmax)
        lmax = nn;
nc[i] = 1;
ni[i] = 1;
siz[i] = ij[i] = 0;
ps[i] = seqx[i];
po[i] = out[i];                    }
```

Tabla 1 (cont')

...pr_align

```
        for (nn = nm = 0, more = 1; more; ) {
                for (i = more = 0; i < 2; i++) {
                        /*
                         * do we have more of this sequence?
                         */
                        if (!*ps[i])
                                continue;
                        more++;
                        if (pp[i].spc) { /* leading space */
                                *po[i]++ = ' ';
                                pp[i].spc--;
                        }
                        else if (siz[i]) {          /* in a gap */
                                *po[i]++ = '-';
                                siz[i]--;
                        }
                        else {              /* we're putting a seq element
                                             */
                                *po[i] = *ps[i];
                                if (islower(*ps[i]))
                                        *ps[i] = toupper(*ps[i]);
                                po[i]++;
                                ps[i]++;
                                /*
                                 * are we at next gap for this seq?
                                 */
                                if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
                                        /*
                                         * we need to merge all gaps
                                         * at this location
                                         */
                                        siz[i] = pp[i].n[ij[i]++];
                                        while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                                                siz[i] += pp[i].n[ij[i]++];
                                }
                                ni[i]++;
                        }
                }
                if (++nn == olen || !more && nn) {
                        dumpblock();
                        for (i = 0; i < 2; i++)
                                po[i] = out[i];
                        nn = 0;
                }
        }
}
/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
```

```
 */
static
dumpblock()                                                    dumpblock
{
        register        i;
        for (i = 0; i < 2; i++)
                *po[i]-- = '\0';
```


176

```
        (void) putc('\n', fx);
        for (i = 0; i < 2; i++) {
                if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
                        if (i == 0)
                                nums(i);
                        if (i == 0 && *out[1])
                                stars();
                        putline(i);
                        if (i == 0 && *out[1])
                                fprintf(fx, star);
                        if (i == 1)
                                nums(i);
                }
        }
}
/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
static
nums(ix)                                                        nums
        int     ix;     /* index in out[] holding seq line */
{
        char            nline[P_LINE];
        register                i, j;
        register char   *pn, *px, *py;
        for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
                *pn = ' ';
        for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
                if (*py == ' ' || *py == '-')
                        *pn = ' ';
                else {
                        if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                                j = (i < 0)? -i : i;
                                for (px = pn; j; j /= 10, px--)
                                        *px = j%10 + '0';
                                if (i < 0)
                                        *px = '-';
                        }
                        else
                                *pn = ' ';
                        i++;
                }
        }
        *pn = '\0';
        nc[ix] = i;
        for (pn = nline; *pn; pn++)
                (void) putc(*pn, fx);
```

```
        (void) putc('\n', fx);
}
/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 */
static
putline(ix)                                                    putline
        int     ix;                     {
```

Tabla 1 (cont')

...putline

```
        int             i;
        register char  *px;

        for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != ':'; px++, i++)
                (void) putc(*px, fx);
        for (; i < lmax+P_SPC; i++)
                (void) putc(' ', fx);

        /* these count from 1:
         * ni[] is current element (from 1)
         * nc[] is number at start of current line
         */
        for (px = out[ix]; *px; px++)
                (void) putc(*px&0x7F, fx);
        (void) putc('\n', fx);
}


/*
 * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
 */
static
stars()                                                         stars
{
        int             i;
        register char  *p0, *p1, cx, *px;

        if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(po[0]) == ' ') ||
          !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(po[1]) == ' '))
                return;
        px = star;
        for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
                *px++ = ' ';

        for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
                if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {

                        if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A']) {
                                cx = '*';
                                nm++;
                        }
                        else if (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
                                cx = '.';
                        else
                                cx = ' ';
                }
                else
```


181

```
                    cx = ' ';
                *px++ = cx;
        }
        *px++ = '\n';
        *px = '\0';
}
```

Tabla 1 (cont')

```
/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
 */
static
stripname(pn)                                                    stripname
        char    *pn;    /* file name (may be path) */
{
        register char  *px, *py;

        py = 0;
        for (px = pn; *px; px++)
                if (*px == '/')
                        py = px + 1;
        if (py)
                (void) strcpy(pn, py);
        return(strlen(pn));

}
```


183

Tabla 1 (cont')

```
/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_calloc() -- calloc() with error checkin
 * readjmps() -- get the good jmps, from tmp file if necessary
 * writejmps() -- write a filled array of jmps to a tmp file: nw()
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

char    *jname = "/tmp/homgXXXXXX";             /* tmp file for jmps */
FILE    *fj;
int     cleanup();                              /* cleanup tmp file */
long    lseek();
/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i)                                                          cleanup
        int     i;
{
        if (fj)
                (void) unlink(jname);
        exit(i);
}
/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char    *
getseq(file, len)                                                   getseq
        char    *file;  /* file name */
        int     *len;   /* seq len */
{
        char            line[1024], *pseq;
        register char   *px, *py;
        int             natgc, tlen;
        FILE            *fp;
        if ((fp = fopen(file,"r")) == 0) {
                fprintf(stderr,"%s: can't read %s\n", prog, file);
                exit(1);
        }
        tlen = natgc = 0;
        while (fgets(line, 1024, fp)) {
                if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
                        continue;
                for (px = line; *px != '\n'; px++)
                        if (isupper(*px) || islower(*px))
```

```
                    tlen++;
}
if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
        fprintf(stderr,"%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
        exit(1);
}
pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';
```


185

Tabla 1 (cont')

...getseq

```
        py = pseq + 4;
        *len = tlen;
        rewind(fp);
        while (fgets(line, 1024, fp)) {
                if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
                        continue;
                for (px = line; *px != '\n'; px++) {
                        if (isupper(*px))
                                *py++ = *px;
                        else if (islower(*px))
                                *py++ = toupper(*px);
                        if (index("ATGCU",*(py-1)))
                                natgc++;
                }
        }
        *py++ = '\0';
        *py = '\0';
        (void) fclose(fp);
        dna = natgc > (tlen/3);
        return(pseq+4);
}
char    *
g_calloc(msg, nx, sz)                                                   g_calloc
        char    *msg;           /* program, calling routine */
        int     nx, sz;         /* number and size of elements */
{
        char            *px, *calloc();
        if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
                if (*msg) {
                        fprintf(stderr, "%s: g_calloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx,
sz);
                        exit(1);
                }
        }
        return(px);
}

/*
 * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
 */
readjmps()                                                              readjmps
{
        int             fd = -1;
        int             siz, i0, i1;
        register        i, j, xx;
        if (fj) {
                (void) fclose(fj);
```


186

```
        if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
                fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
                cleanup(1);
        }
}
for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) {
        while (1) {
                for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
                        ;
```

Tabla 1 (cont')

...readjmps

```
                if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
                        (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
                        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
                        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
                        dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;                    }
                else
                        break;          }
        if (i >= JMPS) {
                fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
                cleanup(1);
        }
        if (j >= 0) {
                siz = dx[dmax].jp.n[j];
                xx = dx[dmax].jp.x[j];
                dmax += siz;
                if (siz < 0) {          /* gap in second seq */
                        pp[1].n[i1] = -siz;
                        xx += siz;
                        /* id = xx - yy + len1 - 1                      */
                        pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
                        gapy++;
                        ngapy -= siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
                        siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
                        i1++;
                }
                else if (siz > 0) {     /* gap in first seq */
                        pp[0].n[i0] = siz;
                        pp[0].x[i0] = xx;
                        gapx++;
                        ngapx += siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
                        siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
                        i0++;
                }
        }
        else
                break;
    }
    /* reverse the order of jmps    */
    for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
            i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
            i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
    }
    for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
            i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
            i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
    }
```

```
if (fd >= 0)
        (void) close(fd);
if (fj) {
        (void) unlink(jname);
        fj = 0;
        offset = 0;
}                                   }
```

Tabla 1 (cont')

```
/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
 */
writejmps(ix)                                                    writejmps
        int     ix;
{
        char    *mktemp();

        if (!fj) {
                if (mktemp(jname) < 0) {
                        fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
                        cleanup(1);
                }
                if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
                        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
                        exit(1);
                }
        }
        (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
        (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
}
```

Tabla 2

TAT	XXXXXXXXXXXXXXX	(Longitud = 15 aminoácidos)
Proteína comparada	XXXXXYYYYYYY	(Longitud = 12 aminoácidos)

porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos =

(la cantidad de residuos de aminoácidos que coincide idénticamente entre las dos secuencias de polipéptidos tal como determina el programa ALIGN-2) dividida entre (la cantidad total de residuos de aminoácidos del polipéptido TAT) =

5 dividido entre 15 = 33,3%

Tabla 3

TAT	XXXXXXXXXX	(Longitud = 10 aminoácidos)
Proteína comparada	XXXXXYYYYYYZZYZ	(Longitud = 15 aminoácidos)

porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos =

(la cantidad de residuos de aminoácidos que coincide idénticamente entre las dos secuencias de polipéptidos tal como determina el programa ALIGN-2) dividida entre (la cantidad total de residuos de aminoácidos del polipéptido TAT) =

5 dividido entre 10 = 50%

Tabla 4

TAT-ADN	NNNNNNNNNNNNN	(Longitud = 14 nucleótidos)
ADN comparado	NNNNNNLLLLLLLLL	(Longitud = 16 nucleótidos)

porcentaje de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos =

(la cantidad de residuos de nucleótidos que coincide idénticamente entre las dos secuencias de ácidos nucleicos tal como determina el programa ALIGN-2) dividida entre (la cantidad total de nucleótidos de la secuencia de ácidos nucleicos del TAT-ADN) =

6 dividido entre 14 = 42,9%

Tabla 5

TAT-ADN	NNNNNNNNNNN	(Longitud = 12 nucleótidos)
ADN comparado	NNNNLLLVV	(Longitud = 9 nucleótidos)

porcentaje de identidad de la secuencia de ácidos nucleicos =

(la cantidad de residuos de nucleótidos que coincide idénticamente entre las dos secuencias de ácidos nucleicos tal como determina el programa ALIGN-2) dividida entre (la cantidad total de nucleótidos de la secuencia de ácidos nucleicos del TAT-ADN) =

4 dividido entre 12 = 33,3%

II. Composiciones y métodos de la invención

A. Anticuerpos anti-TAT

En una realización, la presente invención ofrece anticuerpos anti-TAT que pueden usarse en la presente memoria descriptiva como agentes terapéuticos y/o de diagnóstico. Entre los ejemplos de estos anticuerpos se incluirían los policlonales, monoclonales, humanizados, biespecíficos y heteroconjugados.

1. Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales se producen preferentemente en animales mediante inyecciones múltiples subcutúneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno relevante y un adyuvante. Puede resultar útil conjugar el antígeno relevante (especialmente cuando se utilicen péptidos sintéticos) con una proteína que sea inmunogénica en la especie que deba inmunizarse. Por ejemplo, el antígeno puede conjugarse con hemocianina de lapa (KLH), albúmina sérica, tiroglobulina bovina o un inhibidor de tripsina de semilla de soja, empleando un agente bifuncional o derivador, por ejemplo, éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, $SOCl_2$ o $R^1N=C=NR$, donde R y R^1 son grupos alquilo distintos.

Los animales se inmunizan contra el antígeno, los conjugados inmunogénicos o derivados combinando, por ejemplo, 100 ó 5 μg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con tres volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución

intradérmicamente en múltiples sitios. Un mes más tarde, se administra a los animales una dosis de refuerzo comprendida entre 1/5 y 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. Entre 7 y 14 días más tarde, se extrae sangre a los animales y el suero se analiza para titular los anticuerpos. Los animales se refuerzan hasta obtener los niveles adecuados de valoración. Los conjugados también se pueden obtener en cultivos celulares recombinantes como fusiones proteínicas. Asimismo, los agentes agregantes como el alumbre se utilizan para incrementar la respuesta inmune.

2. Anticuerpos monoclonales

Pueden conseguirse anticuerpos monoclonales por el método del hibridoma, descrito por primera vez en Kohler y col., Nature, 256:495 (1975), o el del ADN recombinante (patente de Estados Unidos nº 4.816.567).

En el método del hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado, como un hámster, se inmuniza como se describió anteriormente para obtener linfocitos que produzcan o sean capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. De manera alternativa, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. Tras la inmunización, se aíslan los linfocitos y, luego, se fusionan con una línea celular de mieloma utilizando un agente fusionante adecuado, como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, páginas 59-103 (Academic Press, 1986)).

Por tanto, las células de hibridoma preparadas se siembran y crecen en un medio de cultivo adecuado que preferentemente contenga una o más sustancias que inhiban el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas (denominadas también asociadas de fusión). Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo selectivo para los hibridomas generalmente incluirá hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), sustancias que evitan el crecimiento de células con déficit de HGPRT.

Las células de mieloma preferidas como asociadas de fusión son aquéllas que se fusionan eficazmente, soportan altos niveles de producción estable de anticuerpos por parte de las células productoras de anticuerpos seleccionadas y son sensibles a un medio selectivo que selecciona contra las células parentales no fusionadas. Las líneas celulares de mieloma preferidas son líneas de mieloma murino, como aquéllas derivadas de los tumores de ratones MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, en San Diego (California, EE.UU.), y las células SP-2 y derivados, por ejemplo, las X63-Ag8-653, disponibles en el American Type Culture Collection, en Rockville (Maryland, EE. UU.). 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); y Brodeur y col., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, páginas 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

El medio de cultivo en el cual las células de hibridoma crecen se analiza para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos directamente contra el antígeno. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma está determinada por la inmunoprecipitación o por un ensayo de unión *in vitro*, como el radioinmunoensayo (RIA) o el ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA).

La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal puede, por ejemplo, determinarse mediante el análisis Scatchard descrito en Munson y col., Anal. Biochem., 107:220 (1980).

Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos con la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones se pueden subclonar limitando los procedimientos de dilución y desarrollar mediante métodos estándar (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, páginas 59-103 (Academic Press, 1986)). Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medios D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma pueden crecer *in vivo* como tumores con ascitis en un animal; por ejemplo, inyectando las células en ratones por vía intraperitoneal.

Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan del medio de cultivo, los fluidos ascíticos o el suero mediante procedimientos convencionales de purificación de anticuerpos, como por ejemplo, cromatografía de afinidad (empleando proteína A o G-sefarosa), cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis, etc.

El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla y se secuencia utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como fuente preferente de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que después se transfectan a células huésped, como por ejemplo las de *E. coli*, las COS de simios, las de ovario de hámster chino (CHO) o las de mieloma, que no produzcan la proteína del anticuerpo de alguna otra manera, a fin de obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Entre los artículos de reseña sobre expresión recombinante en bacterias del ADN que codifica el anticuerpo se incluyen Skerra y col., Curr. Opinion in Immunol., 5:256-262 (1993) y Plückthun, Immunol. Revs., 130:151-188 (1992).

En otra realización, los anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de librerías de fagos de anticuerpos generados mediante las técnicas descritas en McCafferty y col., Nature, 348:552-554 (1990). Clackson y col., Nature, 352:624-628 (1991) y Marks y col., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, utilizando librerías de fagos. Las publicaciones subsiguientes describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) mediante combinación de cadenas (Marks y col., Bio/Technology, 10:779-783 (1992)), así como una infección combinatoria y recombinación *in vivo* como estrategia para construir librerías de fagos muy grandes (Waterhouse y col., Nuc. Acids. Res., 21:2265-2266 (1993)). De este modo, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas tradicionales de hibridoma de anticuerpo monoclonal para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

El ADN que codifica el anticuerpo se puede modificar para producir polipéptidos de anticuerpos quiméricos o de fusión, por ejemplo, sustituyendo las secuencias de los dominios constantes de las cadenas humanas pesada y ligera (C_H y C_L) por las secuencias murinas homólogas (patente de EE.UU. nº 4.816.567 y Morrison, y col., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 81:6851 (1984)), o fusionando toda o parte de la secuencia codificadora de un polipéptido, que no sea inmunoglobulina (polipéptido heterólogo), con la secuencia codificadora de la inmunoglobulina. Estas secuencias de polipéptidos que no son inmunoglobulinas pueden sustituir los dominios constantes de un anticuerpo o sustituirse por los dominios variables de un sitio de combinación del antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo bivalente quimérico que comprenda un sitio de combinación del antígeno con especificidad para un antígeno y otro sitio de combinación del antígeno que tenga especificidad para otro antígeno diferente.

3. Anticuerpos humanos y humanizados

Los anticuerpos anti-TAT de la invención pueden comprender también anticuerpos humanizados o humanos. Las formas humanizadas de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (como Fv, Fab, Fab', $F(ab')_2$ u otras subsecuencias de anticuerpos que se unen a un antígeno) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Los anticuerpos humanizados incluyen inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región de determinación de la complementariedad (CDR) del receptor son sustituidos por los residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo donante), como el ratón, la rata o el conejo que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural Fv de la inmunoglobulina humana se sustituyen por sus correspondientes

198

residuos no humanos. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni la CDR importada o las secuencias de la región estructural. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos los dominios variables (o al menos uno, y típicamente dos) en los que todas, o sustancialmente todas, las regiones CDR correspondan a las de una inmunoglobulina no humana y todas, o sustancialmente todas, las regiones FR sean las de una secuencia consensual de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado, óptimamente, también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana [Jones y col., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann y col., Nature, 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596 (1992)].

Los procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos son bien conocidos en la materia. Por lo general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en él desde una fuente que es no humana. A estos residuos de aminoácidos no humanos se hace referencia con frecuencia como residuos "importados", que generalmente se toman de un dominio variable de "importación". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el método de Winter y sus 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 las CDR o las secuencias de las CDR de roedores por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de EE.UU. nº 4.816.567), donde se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son generalmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR, y posiblemente algunos de FR, se sustituyen por residuos de sitios anólogos en los anticuerpos de roedores.

La elección de dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que se utilizarán para realizar los anticuerpos humanizados es muy importante para disminuir la antigenicidad y la respuesta HAMA (anticuerpo antiratón humano), cuando se prevé dar un uso terapéutico humano al anticuerpo. Según el llamado método del "más apto", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de un roedor se compara con toda la librería de secuencias conocidas de dominios variables de humanos. Se identifica la secuencia humana del dominio V que sea más parecida a la de los roedores, y, entonces, la región estructural humana (FR) que haya en su interior se acepta para el anticuerpo humanizado (Sims y col., J. Immunol., 151:2296 (1993); Chothia y col., J. Mol. Biol., 196:901 (1987)). Otro procedimiento utiliza una región estructural concreta derivada de la secuencia

consensual de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo en particular de cadenas ligeras o pesadas. La misma estructura se puede utilizar para diferentes anticuerpos humanizados (Carter y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta y col., J. Immunol., 151:2623 (1993)).

Es también importante que los anticuerpos se humanicen reteniendo una afinidad de unión alta para el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, siguiendo el procedimiento preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios productos humanizados conceptuales que utilizan modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Generalmente se dispone de modelos tridimensionales de inmunoglobina conocidos por los expertos en la materia. Existen programas informáticos que ilustran y muestran probables estructuras tridimensionales de conformación de secuencias candidatas seleccionadas de inmunoglobulina. La inspección de estas visualizaciones permite analizar el papel que los residuos probablemente desempeñan en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de los residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos de la FR se pueden seleccionar y combinar a partir de las secuencias receptoras y de importación para lograr la característica deseada del anticuerpo, como por ejemplo una mayor afinidad para el/los antígeno(s). En general, los residuos de la región hipervariable influyen, de forma directa y sobre todo sustancial, en la unión del antígeno.

Se contemplan diversas formas de anticuerpos anti-TAT humanizados. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede ser un fragmento de anticuerpo, como un Fab, que se conjuga opcionalmente con uno o más agentes citotóxicos para generar un inmunoconjugado. Alternativamente, el anticuerpo humanizado puede ser un anticuerpo intacto, como un anticuerpo IgG1 intacto.

Como alternativa a la humanización, se pueden generar anticuerpos humanos. Por ejemplo, actualmente es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que sean capaces, una vez inmunizados, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos cuando no exista producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigótica del gen de la región que se une a la cadena pesada (J_H) del anticuerpo en ratones mutantes con líneas quiméricas y germinales ocasiona la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia del grupo de genes de la inmunoglobulina de la línea germinal humana en dichos ratones mutantes con líneas germinales ocasionará la producción de anticuerpos humanos ante la presencia del antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits y col., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggemann

y col., Year in Immunol. 7:33 (1993); las patentes de EE.UU. n°s 5.545.806, 5.569.825, 5.591.669 (todas de GenPharm); 5.545.807; y el documento WO 97/17852.

Alternativamente, se puede utilizar la tecnología de presentación en fagos (McCafferty y col., Nature 348:552-553 [1990]) para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos *in vitro*, de los repertorios de genes de dominios variables (V) de inmunoglobulina de donantes no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, los genes de los dominios V de los anticuerpos se clonan dentro de la estructura en un gen proteínico con revestimiento o bien mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, como el M13 o fd, y se presentan como fragmentos de anticuerpo funcionales en la superficie de la partícula del fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia del ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones que se basan en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan lugar a la selección del gen que codifica el anticuerpo que muestra esas propiedades. Por tanto, el fago imita alguna de las propiedades de la célula B. La presentación en fagos se puede realizar en diversos formatos, reseñados, por ejemplo, en Johnson, Kevin S. y Chiswell, David J., Current Opinion in Structural Biology 3:564-571 (1993). Se pueden utilizar varias fuentes de segmentos del gen V para la presentación en fagos. Clackson y col., Nature, 352:624-628 (1991) aislaron un conjunto diverso de anticuerpos anti-oxazolona de una pequeña biblioteca aleatoria y combinatoria de genes V derivados de bazos de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V de donantes humanos no inmunizados y se pueden aislar anticuerpos contra un gran conjunto de antígenos (incluyendo autoantígenos) siguiendo esencialmente las técnicas descritas por Marks y col., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991), o Griffith y col., EMBO J. 12:725-734 (1993). Véanse también las patentes de EE.UU. n°s 5.565.332 y 5.573.905.

Como se describe anteriormente, los anticuerpos humanos también se pueden generar mediante células B activadas *in vitro* (véanse las patentes de EE.UU. n°s 5.567.610 y 5.229.275).

4. Fragmentos de anticuerpos

En determinadas circunstancias, resulta ventajoso utilizar fragmentos de anticuerpos en lugar de anticuerpos enteros. El tamaño menor de los fragmentos permite una eliminación rápida y puede brindar mejor acceso a los tumores sólidos.

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos se obtenían mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, por ejemplo, Morimoto y col., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); y Brennan y col., Science, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos ahora se pueden producir directamente mediante células huésped recombinantes. Los fragmentos de

198

anticuerpos Fab, Fv y ScFv pueden expresarse todos en *E. coli* y secretarse a partir de dicha sustancia, lo que permite la fácil producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpos se pueden aislar de las bibliotecas de fagos de anticuerpos descritas anteriormente. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH se pueden recuperar directamente de *E. coli* y emparejarse químicamente para formar fragmentos $F(ab')_2$ (Carter y col., Bio/Technology 10:163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, los fragmentos $F(ab')_2$ se pueden aislar directamente de cultivos de células huésped recombinantes. Los fragmentos Fab y $F(ab')_2$ con mayor vida media *in vivo* que comprenden residuos de un epítopo de unión a un receptor de rescate se describen en la patente de EE.UU. nº 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el médico cualificado. En otras realizaciones, el anticuerpo elegido es un fragmento Fv de cadena única (scFv). Véase el documento WO 93/16185; la patente de EE.UU. nº 5.571.894 y la patente de EE.UU. nº 5.587.458. Fv y sFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos que están privadas de regiones constantes; por ello, son aptas para una unión no específica reducida durante el uso *in vivo*. Las proteínas de fusión sFv se pueden construir para obtener la fusión de una proteína efectora en cualquiera de los extremos amino o carboxi terminal de un sFv. Véase Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, supra. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. nº 5.641.870. Estos fragmentos de anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

5. Anticuerpos biespecíficos

Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión para al menos dos epítopos diferentes. Los anticuerpos biespecíficos ejemplares se pueden unir a dos epítopos diferentes de la proteína TAT, tal como se describe en la presente memoria descriptiva. Otros anticuerpos de esta clase pueden combinar un sitio de unión a un TAT con un sitio de unión para otra proteína. Alternativamente, un brazo anti-TAT se puede combinar con un brazo que se una a una molécula activadora en un leucocito como por ejemplo una molécula receptora de célula-T (por ejemplo, CD3) o receptores de Fc para IgG (FcγR), como por ejemplo FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16), a fin de centrarse en los mecanismos de defensa celular y localizarlos en la célula que expresa el TAT. Los anticuerpos biespecíficos también se pueden utilizar para localizar agentes citotóxicos de las células que expresen un TAT. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión a un TAT y un brazo que se une al agente citotóxico (por ejemplo, saporín, anti-interferón-α, alcaloide de la vinca, cadena A de ricino, metotrexato o hapteno con un isótopo radiactivo). Los

anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos $F(ab')_2$).

En el documento WO 96/16673 se describe un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/anti-FcγRIII, y en la patente de EE.UU. nº 5.837.234 se detalla un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/anti-FcγRI. En el documento WO98/02463 se muestra un anticuerpo biespecífico anti ErbB2/Fcα. En la patente de EE.UU. nº 5.821.337 se enseña un anticuerpo biespecífico anti-ErbB2/anti-CD3.

Los procedimientos para realizar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la materia. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen especificidades diferentes (Millstein y col., Nature, 305:537-539 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas diferentes de anticuerpos, de las cuales sólo una posee la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que generalmente se realiza mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante complicada, y la cantidad de producto que se obtiene es baja. En el documento WO 93/08829 y en Traunecker y col., EMBO J., 10:3655-3659 (1991) se dan a conocer procedimientos similares.

Según un enfoque distinto, los dominios variables de anticuerpos con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan con las secuencias de domino constante de inmunoglobulina. Preferentemente, la fusión es con un dominio constante de cadena pesada de la inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, C_H2 y C_H3. Es preferible que la primera región constante de cadena pesada (C_H1) que contenga el sitio necesario para la unión de la cadena ligera esté presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones de cadena pesada de la inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de la inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se co-transfectan a una célula huésped adecuada. Esto permite una mayor flexibilidad a la hora de ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptidos en realizaciones en que las proporciones desiguales de las tres cadenas de polipéptidos utilizadas en la construcción proporcionan el rendimiento óptimo del anticuerpo biespecífico deseado. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificadoras de dos o todas tres cadenas de polipéptidos en un único vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas de polipéptidos con proporciones iguales produzca un alto rendimiento o cuando las proporciones no influyan significativamente en el rendimiento de la combinación de cadenas deseada.

En una realización preferente de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos se componen de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo y un par de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se descubrió que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de las combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo una de las mitades de la molécula biespecífica proporciona una forma sencilla de separación. Este enfoque se detalla en el documento WO 94/04690. Para obtener mayores detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos, véase, por ejemplo, Suresh y col., Methods in Enzymology, 121:210 (1986).

Según otro enfoque descrito en la patente de EE.UU. nº 5.731.168, la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpos se puede modificar para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan de un cultivo celular recombinante. La interfaz preferente comprende al menos una parte del dominio C_H3. En este método, una o más cadenas laterales pequeñas de aminoácidos de la interfaz de la primera molécula del anticuerpo se reemplazan por cadenas laterales de mayor tamaño (por ejemplo, tirosina o triptófano). Las "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) lateral(es) grande(s) se crean en la interfaz de la segunda molécula del anticuerpo al reemplazar las cadenas laterales grandes de aminoácidos por cadenas más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para incrementar la producción del heterodímero con relación a otros productos finales no deseados como los homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos de enlace cruzado o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos del heteroconjugado puede emparejarse con avidina y el otro con biotina. Estos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para que células del sistema inmunitario actuén sobre células no deseadas (patente de EE.UU. nº 4.676.980) y para el tratamiento de la infección de VIH (WO 91/00360, WO 92/200373 y la patente europea nº 03089). Los anticuerpos heteroconjugados se pueden obtener utilizando cualquier procedimiento oportuno de enlace cruzado. Los agentes adecuados para los enlaces cruzados son bien conocidos en la materia y se detallan en la patente de EE.UU. nº 4.676.980 junto con una gran cantidad de técnicas de enlace cruzado.

Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también se han descrito en la bibliografía. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse utilizando un enlace químico. Brennan y col., Science, 229: 81 (1985) describen un

procedimiento en el que los anticuerpos intactos se separan proteolíticamente para generar fragmentos $F(ab')_2$. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente que forma complejos con el ditiol, el arsenito de sodio, para estabilizar los ditioles vecinales y evitar la formación de disulfuros intermoleculares. Los fragmentos Fab' generados se convierten entonces en derivados del tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados del Fab'-TNB se reconvierte entonces en Fab'-tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado del Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos pueden utilizarse como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

Avances actuales han facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. coli,* que pueden emparejarse químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby y col., J. Exp. Med. 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de anticuerpo biespecífico $F(ab')_2$ completamente humanizado. Cada uno de los fragmentos Fab' se secretó por separado a partir de *E. coli* y se sometió a un emparejamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de esta manera fue capaz de unirse a células que sobreexpresaban el receptor de ErbB2 y células T humanas normales, así como desencadenar la actividad lítica de los linfocitos citotóxicos humanos contra objetivos de tumor de mama humano.

También se han descrito diversas técnicas para realizar y aislar fragmentos de anticuerpos biespecíficos directamente de cultivos celulares recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos utilizando cremalleras de leucina. Kostelny y col., J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos con cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se enlazaron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros del anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y después se reoxidaron para formar los heterodímeros del anticuerpo. Este método también se puede utilizar para producir los homodímeros del anticuerpo. La tecnología "diacuerpo" descrita por Hollinger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para realizar fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos comprenden un V_H conectado a un V_L mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena. Por consiguiente, los dominios V_H y V_L de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios complementarios V_L y V_H de otro fragmento, formando, por tanto, dos sitios de unión al antígeno. También se ha informado de otra estrategia para realizar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante la utilización de dímeros Fv de cadena única (sFv). Véase Gruber y col., J. Immunol., 152:5368 (1994).

Se contemplan anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos triespecíficos. Tutt y col., J. Immunol. 147:60 (1991).

6. Anticuerpos heteroconjugados

Los anticuerpos heteroconjugados también están dentro del alcance de la presente invención. Los anticuerpos heteroconjugados se componen de dos anticuerpos unidos de forma covalente. Estos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para que células del sistema inmunitario actuén sobre células no deseadas [patente de EE.UU. nº 4.676.980] y para el tratamiento de la infección de VIH [WO 91/00360, WO 92/200373 y la patente europea nº 03089]. Se contempla que los anticuerpos puedan preparase *in vitro* mediante métodos conocidos en la química de proteínas sintéticas, incluyendo aquéllos en que intervienen agentes de enlaces cruzados. Por ejemplo, las inmunotoxinas pueden construirse empleando una reacción de intercambio de disulfuros o formando una unión de tioéter. Entre los ejemplos de reagentes adecuados para este propósito se incluyen el iminotiolato y el metil-4-mercaptobutirimidato, tal como se detalla, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 4.676.980.

7. Anticuerpos multivalentes

Un anticuerpo multivalente puede internalizarse (y/o catabolizarse) más rápido que un anticuerpo bivalente por medio de una célula que exprese un antígeno al que se unen los anticuerpos. Los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos multivalentes (que son los que no pertenecen a la clase IgM) con tres o más sitios de unión al antígeno (por ejemplo, anticuerpos tetravalentes), que pueden producirse fácilmente mediante la expresión recombinante del ácido nucleico que codifica las cadenas de polipéptidos del anticuerpo. El anticuerpo multivalente puede comprender un dominio de dimerización y tres o más sitios de unión al antígeno. El dominio preferente de dimerización comprende (o consiste en) una región Fc o bisagra. En esta situación, el anticuerpo comprenderá una región Fc y tres o más sitios de unión amino-terminal del antígeno a la región Fc. El anticuerpo multivalente preferente en la presente memoria descriptiva comprende (o consiste en) entre tres y ocho, aunque preferentemente cuatro, sitios de unión al antígeno. El anticuerpo multivalente contiene al menos una cadena de polipéptidos (y preferentemente dos), comprendiendo ésta(s) dos o más dominios variables. Por ejemplo, la(s) cadena(s) de polipéptidos puede(n) comprender VD1-$(X1)_n$-VD2-$(X2)_n$-Fc, donde VD1 es un primer dominio variable, VD2 es un segundo dominio variable, Fc es una cadena de polipéptidos de una región Fc, X1 y X2 representan un aminoácido o polipéptido y n es 0 ó 1. Por ejemplo, la(s) cadena(s) de polipéptidos puede(n) comprender: una cadena VH-CH1-enlazador flexible-VH-CH-región FC o una cadena VH-CH1-VH-CH1-región FC. El anticuerpo multivalente de la presente memoria descriptiva

preferentemente comprende también al menos dos (y preferentemente cuatro) polipéptidos del dominio variable de la cadena ligera. El anticuerpo multivalente de la presente memoria descriptiva, por ejemplo, puede comprender entre dos y ocho polipéptidos del dominio variable de cadena ligera. Los polipéptidos del dominio variable de cadena ligera considerados en la presente memoria descriptiva comprenden un dominio variable de cadena ligera y, opcionalmente, también un dominio CL.

8. Ingeniería de la función efectora

Tal vez se desee modificar el anticuerpo de la invención en lo referente a la función efectora, por ejemplo, para incrementar la citotoxicidad con mediación celular dependiente de antígenos (ADCC) y/o la citotoxicidad dependiente de complementos (CDC) del anticuerpo. Esto se puede lograr introduciendo una o más sustituciones de aminoácidos en una región Fc del anticuerpo. De manera alternativa o adicional, uno o más residuos de cisteína se pueden introducir en la región Fc, lo que permite la formación en esta región de un puente disulfuro entre las cadenas. El anticuerpo homodimérico generado de esta manera puede tener mayor capacidad de internalización y/o eliminación celular con mediación de complementos y citotoxicidad con mediación celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Véase Caron y col., J. Exp Med. 176:1191-1195 (1992) y Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992). Los anticuerpos homodiméricos con mayor actividad antitumoral también se pueden preparar utilizando agentes de enlaces cruzados heterobifuncionales tal como se describe en Wolff y col., Cancer Research 53:2560-2565 (1993). De manera alternativa, se puede diseñar un anticuerpo con dobles regiones Fc y, por tanto, potenciar la lisis mediante complementos y las capacidades de ADCC. Véase Stevenson y col., Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989). Para incrementar la vida media sérica del anticuerpo, se puede incorporar al anticuerpo (especialmente en un fragmento del mismo) un epítopo de unión a un receptor de rescate, tal como se describe en la patente de EE.UU. nº 5.739.277, por ejemplo. Tal como se utiliza en la presente memoria descriptiva, el término "epítopo de unión a un receptor de rescate" se refiere a un epítopo de la región Fc de una molécula de IgG (por ejemplo, IgG_1, IgG_2, IgG_3 o IgG_4) que sea responsable de incrementar la vida media sérica *in vivo* de la molécula de IgG.

9. Inmunoconjugados

La invención también se relaciona con los inmunoconjugados que comprendan un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico, como por ejemplo, un agente quimioterapéutico, un agente inhibidor del crecimiento, una toxina (*por ejemplo*, una toxina con actividad enzimática de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos de la misma) o un isótopo radiactivo (*es decir*, un radioconjugado).

Los agentes quimioterapéuticos útiles en la generación de dichos inmunoconjugados se han descrito anteriormente. Las toxinas con actividad enzimática y los fragmentos de las mismas que se pueden utilizar incluyen la cadena de difteria A, los fragmentos activos sin unión de la toxina de la difteria, la cadena de exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena de ricina A, la cadena de abrina A, la cadena de modecina A, la alfa-sarcina, las proteínas de *Aleurites fordii*, las proteínas de diantina, las proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), el inhibidor de la momordica charantia, la curcina, la crotina, el inhibidor de la saponaria officinalis, la gelonina, la mitogelina, la restrictocina, la fenomicina, la enomicina y el tricotecenos. Se dispone de diversos radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Entre los ejemplos están ^{212}Bi, ^{131}I, ^{131}In, ^{90}Y y ^{186}Re. Los conjugados del anticuerpo y el agente citotóxico se realizan utilizando una variedad de agentes de emparejamiento con una proteína bifuncionales, como por ejemplo N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (como el dimetiladipimidato HCL), ésteres activos (por ejemplo, disuccinimidil suberato), aldehídos (por ejemplo, glutaraldehídos), compuestos bis-azido (como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (por ejemplo, 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos bis-activos de fluoruro (como 1,5-difluoruro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina se puede preparar tal y como se describe en Vitetta y col., Science, 238: 1098 (1987). El ácido triaminopentaacético 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de un radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO94/11026.

También se contemplan en la presente memoria descriptiva los conjugados de un anticuerpo y una o más toxinas de molécula pequeña, como una caliqueamicina, maitansinoides, un tricoteno y un CC1065, así como los derivados de estas toxinas que tengan una actividad tóxica.

Maitansina y maitansinoides

En una realización preferente, un anticuerpo anti-TAT (de longitud completa o fragmentos) de la invención se conjuga con una o más moléculas de maitansinoides.

Los maitansinoides son inhibidores mitóticos que actúan inhibiendo la polimerización de la tubulina. La maitansina se aisló por primera vez a partir del arbusto de África oriental *Maytenus serrata* (patente de EE.UU. nº 3.896.111). Posteriormente, se descubrió que determinados microbios también producían maitansinoides, como el maitansinol y los ésteres de C-3 maitansinol (patente de EE.UU. nº 4.151.042). El maitansinol sintético y sus derivados y análogos se detallan, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. nºs 4.137.230, 4.248.870, 4.256.746, 4.260.608, 4.265.814, 4.294.757,

4.307.016, 4.308.268, 4.308.269, 4.309.428, 4.313.946, 4.315.929, 4.317.821, 4.322.348, 4.331.598, 4.361.650, 4.364.866, 4.424.219, 4.450.254, 4.362.663 y 4.371.533, y sus divulgaciones se incorporan expresamente en la presente memoria descriptiva a modo de referencia.

Conjugados maitansinoide-anticuerpo

En un intento de mejorar su índice terapéutico, la maitansina y los maitansinoides se han conjugado con anticuerpos que se unen de forma específica a antígenos de células tumorales. Los inmunoconjugados contienen maitansinoides, y su uso terapéutico se detalla, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n°s 5.208.020, 5.416.064 y la patente europea nº 0 425 235 B1, y sus divulgaciones se incorporan expresamente en la presente memoria descriptiva a modo de referencia. Liu y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) describen los inmunoconjugados que comprenden un maitansinoide denominado DM1 enlazado al anticuerpo monoclonal C242 dirigido contra el cáncer colorrectal humano. Se descubrió que el conjugado era altamente citotóxico para las células del cáncer de colon en cultivo, que mostró actividad antitumoral en un ensayo de crecimiento tumoral *in vivo*. Chari y col., Cancer Research 52:127-131 (1992) describen inmunoconjugados en los que un maitansinoide se conjugó por medio de un enlazador de disulfuros con el anticuerpo murino A7 que se une a un antígeno en las líneas celulares del cáncer de colon humano, o con otro anticuerpo monoclonal murino TA.1 que se une al oncogén HER-2/*neu*. La citotoxicidad del conjugado TA.1-maitansinoide se probó *in vitro* en la línea celular SK-BR-3 del cáncer de mama, que expresa 3 x 10^5 antígenos de superficie HER-2 por célula. El conjugado del fármaco consiguió un alto grado de citotoxicidad similar al del fármaco maitansinoide libre, que podría ser mayor aumentando la cantidad de moléculas de maitansinoides por cada molécula del anticuerpo. El conjugado A7-maitansinoide mostró una citotoxicidad sistémica baja en ratones.

Conjugados anticuerpo anti-polipéptido TAT-maitansinoide (inmunoconjugados)

Los conjugados anticuerpo anti-TAT-maitansinoide se preparan enlazando por vía química un anticuerpo anti-TAT con una molécula de maitansinoide sin que disminuya significativamente la actividad biológica de ambos elementos del conjugado. Se ha demostrado que una media de 3-4 moléculas de maitansinoides conjugadas por anticuerpo resulta eficaz para mejorar la citotoxicidad de las células objetivo sin afectar negativamente a la función o solubilidad del anticuerpo, aunque cabría esperar que incluso una molécula de toxina/anticuerpo mejorase la citotoxicidad con relación al uso del anticuerpo desnudo. Los maitansinoides son bien conocidos en la materia y pueden sintetizarse mediante técnicas conocidas o aislarse de fuentes naturales. Se detallan maitansinoides adecuados, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 5.208.020 y otras patentes y publicaciones no patentadas a las que anteriormente se ha hecho referencia en la presente memoria descriptiva. Los

maitansinoides preferentes son el maitansinol y análogos del mismo modificados en el anillo aromático u otras posiciones de la molécula de maitansinol, como distintos ésteres del maitansinol.

Se conocen muchos grupos de enlace en la materia para producir conjugados anticuerpo-maitansinoide, incluyendo, por ejemplo, los detallados en la patente de EE.UU. nº 5.208.020 o la patente europea nº 0 425 235 B1, y en Chari y col., Cancer Research 52:127-131 (1992). Los grupos de enlace incluyen grupos de disulfido, grupos de tioéter, grupos de lábil ácido, grupos de fotolábilos, grupos de lábil peptidasa o grupos de lábil esterasa, como los detallados en las patentes identificadas anteriormente, siendo los grupos de disulfido y tioéter los preferentes.

Los conjugados del anticuerpo y el maitansinoide se pueden realizar utilizando una variedad de agentes de emparejamiento con una proteína bifuncionales como por ejemplo N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (como el dimetiladipimidato HCL), ésteres activos (por ejemplo, disuccinimidil suberato), aldehídos (por ejemplo, glutaraldehídos), compuestos bis-azido (como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (por ejemplo, 2,6-diisocianato de tolueno) y compuestos bis-activos de fluoruro (como 1,5-difluoruro-2,4-dinitrobenceno). Los agentes de emparejamiento particularmente preferentes para proporcionar un enlace de disulfido incluyen N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP) (Carlsson y col., Biochem. J. 173:723-737 [1978]) y N-succinimidil-4-(2-piridiltio) pentanoato (SPP).

El enlazador se puede unir a la molécula de maitansinoide en varias posiciones, dependiendo de la clase de enlace. Por ejemplo, un enlace con éster se puede formar por reacción con un grupo hidroxilo utilizando técnicas convencionales de emparejamiento. La reacción puede ocurrir en la posición C-3 que tenga un grupo hidroxilo, la posición C-14 modificada con hidroximetilo, la posición C-15 modificada con un grupo hidroxilo y la posición C-20 que tenga un grupo hidroxilo. En una realización preferente, el enlace se forma en la posición 3 del maitansinol o un análogo de éste.

Caliqueamicina

Otro inmunoconjugado de interés comprende un anticuerpo anti-TAT conjugado con una o más moléculas de caliqueamicina. La familia de antibióticos de la caliqueamicina es capaz de producir rupturas del ADN de hebra doble en concentraciones por debajo de picomolar. Para la preparación de conjugados de la familia de la caliqueamicina, véanse las patentes de EE.UU. nºs 5.712.374, 5.714.586, 5.739.116, 5.767.285, 5.770.701, 5.770.710, 5.773.001, 5.877.296 (todas para American Cyanamid Company). Entre los análogos estructurales de la caliqueamicina que se pueden

utilizar se incluyen, aunque sin limitarse a, γ_1^I, α_2^I, α_3^I, N-acetyl-γ_1^I, PSAG y θ^I_1 (Hinman y col., Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode y col., Cancer Research 58:2925-2928 (1998) y las patentes de EE.UU. anteriormente mencionadas para American Cyanamid). Otro fármaco antitumoral con el que es posible conjugar el anticuerpo es el QFA, que es un antifolato. Tanto la caliqueamicina como el QFA tienen sitios intracelulares de acción y no atraviesan fácilmente la membrana plasmática. Por ello, la absorción celular de estos agentes a través de la internalización mediada con anticuerpos potencia enormemente sus efectos citotóxicos.

Otros agentes citotóxicos

Otros agentes antitumorales que se pueden conjugar con los anticuerpos anti-TAT de la invención incluyen BCNU, estreptozoicina, vincristina y 5-fluorouracilo, la familia de agentes conocida colectivamente como complejo LL-E33288 descrita en las patentes de EE.UU. n°s 5.053.394, 5.770.710, así como las esperamicinas (patente de EE.UU. nº 5.877.296).

Las toxinas con actividad enzimática y los fragmentos de las mismas que se pueden utilizar incluyen la cadena de difteria A, los fragmentos activos sin unión de la toxina de la difteria, la cadena de exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), la cadena de ricina A, la cadena de abrina A, la cadena de modecina A, la alfa-sarcina, las proteínas de *Aleurites fordii*, las proteínas de diantina, las proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII y PAP-S), el inhibidor de la momordica charantia, la curcina, la crotina, el inhibidor de la saponaria officinalis, la gelonina, la mitogelina, la restrictocina, la fenomicina, la enomicina y el tricotecenos. Véase, por ejemplo, el documento WO 93/21232 publicado el 28 de octubre de 1993.

La presente invención también contempla un inmunoconjugado formado entre un anticuerpo y un compuesto con actividad nucleolítica (por ejemplo, una ribonucleasa o una endonucleasa de ADN como por ejemplo una desoxirribonucleasa; DNasa).

Para la destrucción selectiva del tumor, el anticuerpo puede comprender un átomo altamente radioactivo. Hay disponible una variedad de isótopos radiactivos para la producción de anticuerpos anti-TAT radioconjugados. Entre los ejemplos se incluye At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} e isótopos radiactivos de Lu. Cuando el conjugado se utiliza para el diagnóstico, puede comprender un átomo radioactivo para estudios escintigráficos, por ejemplo tc^{99m} o I^{123}, o un marcador giratorio para resonancia magnética nuclear (RMN) (conocida también como imágenes obtenidas mediante resonancia magnética, irm), como yodo-123 nuevamente, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

Pueden incorporarse marcadores radiactivos o de otra clase al conjugado mediante formas conocidas. Por ejemplo, el péptido se puede biosintetizar o sintetizar mediante síntesis química de

aminoácidos utilizando precursores adecuados de aminoácidos que contengan, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Los marcadores como tc^{99m} o I^{123}, .Re^{186}, Re^{188} e In^{111} se pueden unir a través de un residuo de cisteína en el péptido. El itrio-90 se puede unir a través de un residuo de lisina. El método IODOGEN (Fraker y col (1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57) se puede utilizar para incorporar yodo-123. En "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) se describen otros métodos con detalle.

Los conjugados de anticuerpos y agentes citotóxicos se pueden realizar utilizando una variedad de agentes de emparejamiento con una proteína bifuncionales, como por ejemplo N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (como el dimetiladipimidato HCL), ésteres activos (por ejemplo, disuccinimidil suberato), aldehídos (por ejemplo, glutaraldehídos), compuestos bis-azido (como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (por ejemplo, 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos bis-activos de fluoruro (como 1,5-difluoruro-2,4-dinitrobenceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina se puede preparar tal como se describe en Vitetta y col., Science, 238:1098 (1987). El ácido triaminopentaacético 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno marcado con carbono 14 (MX-DTPA) es un ejemplo de agente quelante para la conjugación de un radionucleótido con el anticuerpo. Véase el documento WO94/11026. El enlazador puede ser un "enlazador escindible" que facilite la liberación del fármaco citotóxico en la célula. Por ejemplo, puede utilizarse un enlazador ácido-lábil, un enlazador sensible a la peptidasa, un enlazador fotolábil, un enlazador de dimetilo o un enlazador que contenga disulfuro (Chari y col., Cancer Research 52:127131 (1992); patente de EE.UU. nº 5.208.020).

Alternativamente, una proteína de fusión que contenga el anticuerpo anti-TAT y el agente citotóxico puede realizarse, por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o síntesis de péptidos. La longitud del ADN puede incluir regiones respectivas que codifiquen las dos porciones del conjugado, ya sea que estén adyacentes una a otra o separadas por una región que codifica un péptido enlazador que no destruye las propiedades deseadas del conjugado.

En otra realización, el anticuerpo puede conjugarse con un "receptor" (como la estreptavidina) para desarrollar una acción previa contra el tumor, donde el conjugado anticuerpo-receptor se administra al paciente, luego, el conjugado no unido se elimina de la circulación, utilizando un agente de eliminación, y posteriormente se administra un "ligando" (por ejemplo, la avidina) que se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, un radionucleótido).

10. Inmunoliposomas

Los anticuerpos anti-TAT detallados en la presente memoria descriptiva también se formulan como inmunoliposomas. Un "liposoma" es una pequeña vesícula compuesta por varias clases de lípidos, fosfolípidos y/o un surfactante que es útil para la administración de un fármaco a un mamífero. Por lo general, los componentes del liposoma se disponen en una formación de doble capa, de manera similar a la disposición de los lípidos en las membanas biológicas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan mediante procedimientos conocidos en la materia, como por ejemplo el descrito en Epstein y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985); Hwang y col., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 77:4030 (1980); las patentes de EE..UU. n°s 4.485.045 y 4.544.545; y el documento WO97/38731 publicado el 23 de octubre de 1997. Los liposomas con mayor tiempo de circulación se detallan en la patente de EE.UU. nº 5.013.556.

Se pueden generar liposomas particularmente útiles mediante el método de evaporación de fase inversa con una composición lipídica que comprenda fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivada de PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros con tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Los fragmentos Fab' del anticuerpo de la presente invención se pueden conjugar con los liposomas, tal como se describe en Martin y col., J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982), a través de una reacción de intercambio de disulfuros. Opcionalmente, el liposoma puede contener un agente quimioterapéutico. Véase Gabizon y col., J. National Cancer Inst. 81 (19):1484 (1989).

B. Oligopéptidos que se unen a un TAT

Los oligopéptidos que se unen a un TAT de la presente invención son oligopéptidos que se unen, preferentemente de forma específica, a un polipéptido TAT, tal como se describe en la presente memoria descriptiva. Los oligopéptidos que se unen a un TAT pueden sintetizarse químicamente a través de métodos conocidos de síntesis de oligopéptidos o prepararse y purificarse usando tecnología recombinante. La longitud de los oligopéptidos que se unen a un TAT es por lo general de al menos 5 aminoácidos, alternativamente de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 ó 100 aminoácidos o más, siendo estos oligopéptidos capaces de unirse, preferentemente de forma específica, a un polipéptido TAT, tal como se describe en la presente memoria descriptiva. Los oligopéptidos que se unen a un TAT pueden identificarse sin excesiva experimentación a través de técnicas bien conocidas. A este respecto, cabe destacar que las técnicas para explorar bibliotecas

210

de oligopéptidos a fin de encontrar oligopéptidos capaces de unirse específicamente a un polipéptido objetivo son bien conocidas en la materia (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n°s 5.556.762, 5.750.373, 4.708.871, 4.833.092, 5.223.409, 5.403.484, 5.571.689, 5.663.143; las publicaciones del PCT n^{os} WO 84/03506 y WO84/03564; Geysen y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3998-4002 (1984); Geysen y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:178-182 (1985); Geysen y col., en Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986); Geysen y col., J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987); Schoofs y col., J. Immunol., 140:611-616 (1988), Cwirla, S. E. y col. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378; Lowman, H.B. y col. (1991) Biochemistry, 30:10832; Clackson, T. y col. (1991) Nature, 352: 624; Marks, J. D. y col. (1991), J. Mol. Biol., 222:581; Kang, A.S. y col. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363, y Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668).

A este respecto, la presentación en bacteriófagos (fagos) es una técnica bien conocida que permite explorar extensas bibliotecas de oligopéptidos a fin de identificar los miembros capaces de unirse de forma específica a un objetivo polipéptido. La presentación en fagos es una técnica mediante la cual los polipéptidos con variantes se muestran como proteínas de fusión a la proteína con revestimiento presente en la superficie de las partículas de bacteriófagos (Scott, J.K. y Smith, G. P. (1990) Science 249: 386). La utilidad de la presentación en fagos reside en que las bibliotecas extensas de variantes de proteínas incluidas de forma selectiva y aleatoria (o ADNc clonados también de forma aleatoria) pueden clasificarse con rapidez y eficacia para detectar aquellas secuencias que se unen a una molécula objetivo con afinidad elevada. La presentación de bibliotecas de péptidos (Cwirla, S. E. y col. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378) o proteínas (Lowman, H.B. y col. (1991) Biochemistry, 30:10832; Clackson, T. y col. (1991) Nature, 352: 624; Marks, J. D. y col. (1991), J. Mol. Biol., 222:581; Kang, A.S. y col. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363) en fagos se ha utilizado para explorar millones de polipéptidos u oligopéptidos para detectar aquéllos que tengan propiedad de unión específica (Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668). La clasificación de bibliotecas de fagos de mutantes aleatorios requiere una estrategia para construir y propagar una gran cantidad de variantes, un procedimiento para purificar la afinidad usando el receptor del objetivo y un medio para evaluar los resultados de los enriquecimientos de la unión. Patentes de EE.UU. n°s 5.223.409, 5.403.484, 5.571.689 y 5.663.143.

A pesar de que en la mayoría de los métodos de presentación en fagos se han empleado fagos filamentosos, también se conocen los sistemas de presentación en fagos lambdoides (documento WO 95/34683; patente de EE.UU. n° 5.627.024), los sistemas de presentación en fagos T4 (Ren y col., Gene, 215: 439 (1998); Zhu y col., Cancer Research, 58(15): 3209-3214 (1998); Jiang y col., Infection & Immunity, 65(11): 4770-4777 (1997); Ren y col., Gene, 195(2):303-311 (1997); Ren,

Protein Sci., 5: 1833 (1996); Efimov y col., Virus Genes, 10: 173 (1995)) y los sistemas de presentación en fagos T7 (Smith y Scott, Methods in Enzymology, 217: 228-257 (1993); patente de EE.UU. nº 5.766.905).

Actualmente se han desarrollado muchas otras mejoras y variaciones del concepto básico de la presentación en fagos. Estas mejoras refuerzan la capacidad de los sistemas de presentación para explorar bibliotecas de péptidos a fin de unirlos a moléculas objetivo seleccionadas y mostrar proteínas funcionales, proporcionando el potencial de detectar en dichas proteínas las propiedades deseadas. Se han desarrollado dispositivos de reacción combinatoria para las reacciones de presentación en fagos (documento WO 98/14277), y se han utilizado bibliotecas de presentaciones en fagos para analizar y controlar las interacciones bimoleculares (documentos WO 98/20169 y WO 98/20159) y las propiedades de los péptidos helicoidales constreñidos (documento WO 98/20036). En el documento WO 97/35196 se describe un método para aislar un ligando de afinidad en que una biblioteca de presentaciones en fagos se pone en contacto con una solución en que el ligando se unirá a una molécula objetivo y una segunda solución en que el ligando de afinidad no se unirá a la molécula objetivo, a fin de aislar selectivamente los ligandos de unión. En el documento WO 97/46251 se describe un método para establecer ciclos de selección en una biblioteca aleatoria de presentaciones en fagos con un anticuerpo de afinidad purificado y después aislar el fago de unión, seguido de un proceso de microciclos de selección utilizando pozos de microplacas a fin de aislar el fago de unión de alta afinidad. También se ha informado sobre el uso de la proteína A de *Staphlylococcus aureus* como señal de afinidad (Li y col. (1998) Mol. Biotech., 9:187). En el documento WO 97/47314 se describe el uso de bibliotecas de sustracción de sustratos para distinguir las especifidades enzimáticas usando una biblioteca combinatoria que puede ser una biblioteca de presentaciones en fagos. En el documento WO 97/09446 se describe un método para seleccionar enzimas adecuadas para su uso en detergentes mediante presentaciones en fagos. También se describen métodos adicionales para seleccionar proteínas de unión específicas en las patentes de EE.UU. nºs 5.498.538, 5.432.018 y el documento WO 98/15833.

Los métodos para generar bibliotecas de péptidos y explorarlas también se detallan en las patentes de EE.UU. nºs 5.723.286, 5.432.018, 5.580.717, 5.427.908, 5.498.530, 5.770.434, 5.734.018, 5.698.426, 5.763.192 y 5.723.323.

C. Moléculas orgánicas que se unen a un TAT

Las moléculas orgánicas que se une a un TAT son moléculas orgánicas distintas de los oligopéptidos o anticuerpos, tal como se define en la presente memoria descriptiva, que se unen, preferentemente de forma específica, a un polipéptido TAT, tal como se describe en la presente

212

memoria descriptiva. Las moléculas orgánicas que se unen a un TAT pueden identificarse y sintetizarse químicamente a través de métodos conocidos (véase, por ejemplo, las publicaciones del PCT n^{os} WO00/00823 y WO00/39585). El tamaño de las moléculas orgánicas que se unen a un TAT es normalmente inferior a los 2.000 daltons, alternativamente inferior a unos 1.500, 750, 500, 250 ó 200 daltons, y dichas moléculas orgánicas capaces de unirse, preferentemente de forma específica, a un polipéptido TAT, tal como se describe en la presente memoria descriptiva, pueden identificarse sin excesiva experimentación a través de técnicas bien conocidas. A este respecto, cabe destacar que las técnicas para explorar bibliotecas de moléculas orgánicas a fin de encontrar moléculas capaces de unirse a un polipéptido objetivo son bien conocidas en la materia (véase, por ejemplo, las publicaciones del PCT n^{os} WO00/00823 y WO00/39585). Las moléculas orgánicas que se unen a un TAT pueden ser, por ejemplo, aldehídos, cetonas, oximos, hidrazonas, semicarbazonas, carbacidas, aminos primarios, secundarios y terciarios, hidracinas con el radical N sustituido, hidrazidas, alcoholes, éteres, tioles, tioéteres, disulfuros, ácidos carboxílicos, ésteres, amidas, úreas, carbamatos, carbonatos, cetales, tiocetales, acetales, tioacetales, arilhaluros, arilsulfonatos, alquilhaluros, alquilsulfonatos, compuestos aromáticos, compuestos heterocíclicos, anilinas, alquenos, alquinos, dioles, alcoholes amino, oxazolidinas, oxazolinas, tiazolidinas, tiazolinas, enaminas, sulfonamidas, epóxidos, aziridinas, isocianatos, cloruros de sulfonilo, compuestos de diazo, cloruros ácidos o similares.

D. Exploración de anticuerpos anti-TAT, oligopéptidos que se unen a un TAT y moléculas orgánicas que se unen a un TAT con las propiedades deseadas

Las técnicas para generar anticuerpos, oligopéptidos y moléculas orgánicas que se unen a polipéptidos TAT se han descrito anteriormente. También se pueden seleccionar anticuerpos, oligopéptidos u otras moléculas orgánicas con ciertas características biológicas, como se desee.

Los efectos inhibidores del crecimiento de un anticuerpo anti-TAT, oligopéptido u otra molécula orgánica de la invención pueden evaluarse mediante métodos conocidos en la materia, por ejemplo, utilizando células que expresen un polipéptido TAT, bien de forma endógena o tras una transfección con el gen de un TAT. Por ejemplo, las líneas de células tumorales y las células transfectadas con un TAT apropiadas pueden tratarse con un anticuerpo monoclonal anti-TAT, oligopéptido u otra molécula orgánica de la invención en diversas concentraciones durante unos cuantos días (por ejemplo, de 2 a 7 días) y teñirse con cristal violeta o MTT o analizarse mediante algún otro análisis colorimétrico. Otro método para medir la proliferación sería comparando la absorción de ^{3}H-timidina por parte de las células tratadas en presencia o ausencia de un anticuerpo anti-TAT, un oligopéptido que se una a un TAT o una molécula orgánica que se una a un TAT de la

invención. Tras el tratamiento con anticuerpos, las células se recogen y la cantidad de radioactividad incorporada en el ADN se cuantifica en un contador de escintilación. Los controles positivos apropiados incluyen el tratamiento de una línea celular seleccionada con un anticuerpo inhibidor del crecimiento conocido por inhibir el crecimiento de esa línea celular. La inhibición *in vivo* del crecimiento de células tumorales puede determinarse de diversas formas conocidas en la materia. Preferentemente, la célula tumoral es una que sobreexprese un polipéptido TAT. En una realización, a una concentración de anticuerpos de alrededor de entre 0,5 y 30 μg/ml, el anticuerpo anti-TAT, el oligopéptido que se una a un TAT o la molécula orgánica que se una a un TAT inhibirá la proliferación celular de una célula tumoral que exprese un TAT *in vitro* o *in vivo* preferentemente alrededor de entre un 25 y un 100%, más preferentemente alrededor de entre un 30 y un 100%, y más preferentemente aún alrededor de entre un 50 y un 100% o entre un 70 y un 100%, en comparación con la célula tumoral no tratada. La inhibición del crecimiento se puede medir a una concentración de anticuerpos de alrededor de entre 0,5 y 30 μg/ml o entre 0,5 nM y 200 nM en cultivo celular, donde la inhibición del crecimiento se determina entre 1 y 10 días tras la exposición de las células tumorales al anticuerpo. El anticuerpo es un inhibidor del crecimiento *in vivo* si la administración del anticuerpo anti-TAT, a concentraciones de alrededor de entre 1 μg/kg y 100 mg/kg de peso corporal, da lugar a la reducción del tamaño del tumor o la proliferación celular entre unos 5 días y 3 meses después de la primera administración del anticuerpo, preferentemente entre unos 5 y 30 días.

Para seleccionar un anticuerpo anti-TAT, un oligopéptido que se una a un TAT o una molécula orgánica que se una a un TAT que induzca la muerte celular, se puede evaluar la pérdida de la integridad de la membrana con relación al agente de control, lo cual se puede detectar, por ejemplo, mediante absorción de yoduro de propidio (PI), azul de tripán o 7AAD. Se puede realizar un análisis de absorción de PI en ausencia de células efectoras inmunes y de complemento. Las células tumorales que expresan un polipéptido TAT se incuban en un medio solo o uno que contenga el anticuerpo anti-TAT (por ejemplo, a una concentración de unos 10 μg/ml), el oligopéptido que se une a un TAT o la molécula orgánica que se une a un TAT apropiado. Las células se incuban durante 3 días. Después de cada tratamiento, las células se lavan y se alicuotan en tubos de 35 mm con filtro en la tapa de 12 x 75 (1 ml por tubo, 3 tubos por grupo de tratamiento) para eliminar la agregación celular. Los tubos reciben entonces el PI (10 μg/ml). Las muestras se pueden analizar utilizando un citómetro de flujo FACSCAN® y software FACSCONVERT® CellQuest (Becton Dickinson). Esos anticuerpos anti-TAT, oligopéptidos que se unen a un TAT o moléculas orgánicas que se unen a un TAT que inducen niveles estadísticamente significativos de muerte celular, tal

como se determina mediante absorción de PI, pueden seleccionarse como anticuerpos anti-TAT, oligopéptidos que se unen a un TAT o moléculas orgánicas que se unen a un TAT que inducen la muerte celular.

A fin de examinar los anticuerpos, oligopéptidos u otras moléculas orgánicas que se unen a un epítopo o polipéptido TAT ligado por un anticuerpo de interés, se puede llevar a cabo un ensayo rutinario de bloqueo cruzado como el descrito en Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Este ensayo puede emplearse para determinar si un anticuerpo, oligopéptido u otra molécula orgánica de prueba se une en el mismo sitio o epítopo que un anticuerpo anti-TAT conocido. De forma alternativa, o adicionalmente, el mapeo del epítopo se puede realizar mediante métodos conocidos en la materia. Por ejemplo, la secuencia de anticuerpos se puede mutagenizar, por ejemplo, mediante barrido de alanina, para identificar residuos de contacto. Inicialmente, se prueba la unión del anticuerpo mutante a un anticuerpo policlonal para garantizar un plegamiento correcto. En un método diferente, los péptidos que corresponden a diferentes regiones de un polipéptido TAT se pueden utilizar en análisis de competición con los anticuerpos de prueba o un anticuerpo de prueba y un anticuerpo con un epítopo caracterizado o conocido.

E. Terapia con profármaco con mediación enzimática dependiente de anticuerpos (ADEPT)

Los anticuerpos de la presente invención también se pueden usar en la ADEPT conjugando el anticuerpo con una enzima activadora de profármacos que convierte un profármaco (por ejemplo, un agente quimioterapéutico peptidil, véase el documento WO81/01145) en un antineoplásico activo. Véase, por ejemplo, el documento WO 88/07378 y la patente de EE.UU. nº 4.975.278.

El componente enzimático del inmunoconjugado útil para la ADEPT incluye cualquier enzima capaz de actuar sobre un profármaco de tal forma que lo convierta en su forma citotóxica más activa.

Las enzimas que son útiles en el método de la presente invención incluyen, aunque sin limitarse a, fosfatasa alcalina, útil para convertir los profármacos que contengan fosfatasa en fármacos libres; arilsulfatasa, útil para convertir los profármacos que contengan sulfato en fármacos libres; citosina deaminasa, útil para convertir 5-fluorocitosina no tóxica en el fármaco antineoplásico, 5-fluorouracil; proteasas, como serratia proteasa, termolisina, subtilisina, carboxipeptidasas y catepsinas (como catepsinas B y L), que son útiles para convertir profármacos que contengan péptidos en fármacos libres; D-alanilcarboxipeptidasas, útiles para convertir profármacos que contengan sustituyentes de ácido D-amino; enzimas que escinden carbohidratos,

como β-galactosidasa y neuraminidasa, útiles para convertir los profármacos glicosilados en fármacos libres; β-lactamasa, útil para convertir fármacos derivados de β-lactamos en fármacos libres; y penicilina amidasas, como penicilina V amidasa o penicilina G amidasa, útiles para convertir fármacos derivados en sus nitrógenos de amino de grupos fenoxiacetil o fenilacetil, respectivamente, en fármacos libres. Alternativamente, los anticuerpos con actividad enzimática, también conocidos en la materia como "abismas", se pueden utilizar para convertir los profármacos de la invención en fármacos libres activos (véase, por ejemplo, Massey, Nature 328:457-458 (1987)). Los conjugados anticuerpo-abzima se pueden preparar, tal como se describe en la presente memoria descriptiva, para la administración de la abzima a una población de células tumorales.

Las enzimas de la presente invención se pueden unir de forma covalente a los anticuerpos anti-TAT mediante técnicas bien conocidas en la materia, como el uso de los reagentes heterobifuncionales de enlace cruzado mencionados anteriormente. Alternativamente, las proteínas de fusión que incluyen al menos la región de unión al antígeno de un anticuerpo de la invención enlazado al menos a una porción funcionalmente activa de una enzima de la invención se pueden construir usando técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la materia (véase, por ejemplo, Neuberger y col., Nature, 312: 604-608 (1984)).

F. Polipéptidos TAT de longitud completa

La presente invención también proporciona secuencias de nucleótidos de reciente identificación y aislamiento que codifican polipéptidos a los cuales se hace referencia en la presente solicitud como polipéptidos TAT. En particular, se han identificado y aislado ADNc (de longitud parcial y completa) que codifican diversos polipéptidos TAT, tal como se detalla más adelante con mayor detalle en los Ejemplos.

Tal como se detalla más adelante en los Ejemplos, diversos clones de ADNc se han depositado en la ATCC. El experto en la materia puede determinar rápidamente las secuencias de nucleótidos reales de estos clones secuenciando el clon depositado mediante procedimientos rutinarios en la materia. La secuencia de aminoácidos pronosticada puede determinarse a partir de la secuencia de nucleótidos a través de técnicas rutinarias. En algunos casos, los solicitantes han identificado para los polipéptidos TAT y ácidos nucleicos codificadores descritos en la presente memoria descriptiva lo que se cree que es la estructura de lectura que mejor se puede identificar con la información sobre secuencias de que se dispone en estos momentos.

G. Variantes de anticuerpos anti-TAT y polipéptidos TAT

Además de los anticuerpos anti-TAT y los polipéptidos TAT con secuencia nativa de longitud completa descritos en la presente memoria descriptiva, se contempla que se puedan

preparar variantes de anticuerpos anti-TAT y polipéptidos TAT. Las variantes de anticuerpos anti-TAT y polipéptidos TAT se pueden preparar introduciendo cambios nucleótidos adecuados en el ADN codificador y/o mediante síntesis del anticuerpo o polipéptido deseado. Los expertos en la materia observarán que los cambios en los aminoácidos pueden alterar los procesos postranslacionales del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT, como el cambio de la cantidad o posición de los sitios de glicosilación o la alteración de las características de anclaje a la membrana.

Se pueden introducir variaciones en los anticuerpos anti-TAT y polipéptidos TAT descritos en la presente memoria descriptiva utilizando, por ejemplo, cualquiera de las técnicas y pautas para mutaciones conservadoras y no conservadoras explicadas, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 5.364.934. Estas variaciones pueden ser una sustitución, eliminación o inserción de uno o más codones que codifiquen el anticuerpo o polipéptido, lo que origina un cambio en la secuencia de aminoácidos con respecto al anticuerpo o polipéptido de secuencia nativa. Opcionalmente, la variación consiste en la sustitución de al menos un aminoácido por cualquier otro aminoácido en uno o más dominios del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT. Las pautas para determinar qué residuo de aminoácidos se puede insertar, sustituir o eliminar sin afectar negativamente a la actividad deseada se pueden obtener comparando la secuencia del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT con la de las moléculas de proteínas homólogas conocidas y minimizando la cantidad de cambios en la secuencia de aminoácidos realizados en regiones con alta homología. Las sustituciones de aminoácidos pueden ser la consecuencia de sustituir un aminoácido por otro con propiedades estructurales y/o químicas similares, como la sustitución de una leucina por una serina; es decir, sustituciones de aminoácidos conservadoras. Las inserciones o eliminaciones pueden ser, opcionalmente, del orden de entre 1 y 5 aminoácidos. La variación permitida se puede determinar mediante la realización sistemática de inserciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos en la secuencia y el análisis de las variantes resultantes para evaluar la actividad presentada por la secuencia nativa madura o de longitud completa.

En la presente memoria descriptiva se proporcionan fragmentos de anticuerpos anti-TAT y polipéptidos TAT. Dichos fragmentos pueden truncarse en los terminales N o C, o carecer de residuos internos, por ejemplo, en comparación con una proteína o un anticuerpo nativo de longitud completa. Ciertos fragmentos carecen de residuos de aminoácidos que no son esenciales para una actividad biológica deseada del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT.

Los fragmentos de anticuerpos anti-TAT o polipéptidos TAT pueden prepararse mediante cualquiera de una serie de técnicas convencionales. Los fragmentos de péptidos deseados se pueden sintetizar químicamente. Un enfoque alternativo supone generar fragmentos de anticuerpos o

polipéptidos mediante digestión enzimática, por ejemplo, tratando la proteína con una enzima que se sepa que escinde las proteínas en sitios definidos por residuos de aminoácidos concretos, o mediante digestión del ADN con enzimas de restricción adecuadas y aislando el fragmento deseado. Otra técnica adecuada entraña el aislamiento y la amplificación de un fragmento de ADN que codifique un fragmento de anticuerpo o polipéptido deseado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Durante la PCR, en los extremos 5' y 3' de los cebadores, se emplean oligonucleótidos que definen los extremos terminales deseados del fragmento de ADN. Preferentemente, los fragmentos de anticuerpos anti-TAT y polipéptidos TAT comparten al menos una actividad biológica y/o inmunológica con el anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT nativo detallado en la presente memoria descriptiva.

En realizaciones concretas, las sustituciones conservadoras de interés se muestran en la Tabla 6, bajo el epígrafe de sustituciones preferentes. Si dichas sustituciones ocasionan un cambio en la actividad biológica, entonces se producen cambios más sustanciales, denominados "sustituciones ejemplares" en la Tabla 6, o como se describe a continuación con relación a las clases de aminoácidos, y los productos se seleccionan.

Tabla 6

Residuo original	Sustituciones ejemplares	Sustituciones preferentes
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lis; Gln; Asn	Lis
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lis; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cis (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gli (G)	Pro; Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lis; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Fe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Fe	Ile
Lis (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Fe; Ile	Leu

Fe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tir	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Tr	Tr
Tr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tir; Fe	Tir
Tir (Y)	Trp; Fe; Tr; Ser	Fe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Fe; Ala; Norleucina	Leu

Las modificaciones sustanciales en la función o identidad inmunológica del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT se logran seleccionando sustituciones que difieran significativamente en su efecto de mantener (a) la estructura de la columna del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación plana o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio objetivo, o (c) la mayor parte de la cadena lateral. Los residuos que aparecen de forma natural se dividen en grupos sobre la base de las propiedades comunes de sus cadenas laterales:

(1) hidrófobos: Norleucina, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) hidrófilos neutros: Cis, Ser, Tr; Asn; Gln;

(3) ácidos: Asp, Glu;

(4) básicos: His, Lis, Arg;

(5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: Gli, Pro; y

(6) aromáticos: Trp, Tir, Fe.

Las sustituciones no conservadoras supondrán intercambiar un miembro de una de estas clases por otra clase. Estos residuos sustituidos también se pueden introducir en sitios de sustitución conservadora o, con mayor preferencia, en los sitios restantes (no conservados).

Las variaciones se pueden realizar utilizando métodos conocidos en la materia, como mutagénesis (dirigida al sitio) con mediación de oligonucleótidos, barrido de alanina y mutagénesis dirigida mediante PCR. La mutagénesis dirigida al sitio [Carter y col., Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986); Zoller y col., Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987)], la mutagénesis por inserción de un casete [Wells y col., Gene, 34:315 (1985)], la mutagénesis por selección de restricción [Wells y col., Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 (1986)] u otras técnicas conocidas se pueden realizar en el ADN clonado para obtener el ADN de las variantes de anticuerpos anti-TAT o polipéptidos TAT.

También se puede emplear el análisis de aminoácidos por barrido para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua. Entre los aminoácidos preferentes obtenidos por barrido están los aminoácidos neutros relativamente pequeños. Estos aminoácidos incluyen alanina, glicina, serina y cisteína. La alanina es, por lo general, un aminoácido obtenido por barrido preferente en este grupo porque elimina la cadena lateral más allá del carbono-beta y tiene menos probabilidades de alterar la conformación de la cadena principal de la variante [Cunningham y Wells, Science, 244:1081-1085 (1989)]. La alanina se suele preferir también porque es el aminoácido más común. Además, se encuentra frecuentemente tanto en posiciones expuestas como ocultas [Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150:1 (1976)]. Si la sustitución de alanina no permite obtener cantidades suficientes de la variante, se puede utilizar un aminoácido isotérico.

Cualquier residuo de cisteína que no intervenga en el mantenimiento de la conformación adecuada del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT también se puede sustituir, generalmente con serina, para mejorar la estabilidad oxidativa de la molécula y evitar enlaces cruzados aberrantes. A la inversa, la(s) unión(es) de cisteína se puede(n) agregar al anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT para mejorar su estabilidad (particularmente donde el anticuerpo sea un fragmento de anticuerpo como por ejemplo un fragmento Fv).

Una clase de variante de sustitución particularmente preferente supone sustituir uno o más residuos de la región hipervariable de un anticuerpo parental (por ejemplo, un anticuerpo humanizado o humano). Generalmente, la variante o las variantes resultantes seleccionadas para mayor desarrollo tendrán propiedades biológicas mejoradas con relación al anticuerpo parental desde el cual se generaron. Una manera conveniente de generar dichas variantes de sustitución involucra la maduración de la afinidad utilizando una presentación en fagos. De manera resumida, varios sitios de la región hipervariable (por ejemplo, 6-7 sitios) se mutan para generar todas las sustituciones posibles de aminoácidos en cada sitio. Las variantes del anticuerpo generadas de este modo se presentan de forma monovalente, a partir de partículas de fagos filamentosos, como fusiones con el producto del gen III de M13 que hay dentro de cada partícula. Las variantes presentadas en fagos se examinan entonces para detectar su actividad biológica (por ejemplo, afinidad de unión), tal como se detalla en la presente memoria descriptiva. A fin de identificar los sitios de la región hipervariable candidatos para la modificación, se puede realizar mutagénesis por barrido de alanina para identificar los residuos de la región hipervariable que contribuyan significativamente a la unión al antígeno. De manera alternativa, o adicionalmente, puede ser beneficioso analizar una estructura cristalina del complejo antígeno-anticuerpo para identificar puntos de contacto entre el anticuerpo y

el polipéptido TAT humano. Dichos residuos de contacto y adyacentes son candidatos para la sustitución de acuerdo con las técnicas elaboradas en la presente memoria descriptiva. Una vez generadas dichas variantes, el panel de variantes está sujeto a exploración, tal como se describe en la presente memoria descriptiva, y los anticuerpos con propiedades superiores en uno o más ensayos relevantes se pueden seleccionar para mayor desarrollo.

Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican las variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-TAT se preparan a través de diversos métodos conocidos en la materia. Éstos incluyen, aunque sin limitarse a, el aislamiento desde una fuente natural (en el caso de variantes de la secuencia de aminoácidos que aparezcan naturalmente) o la preparación por mutagénesis con mediación de oligonucleótidos (o dirigida al sitio), mutagénesis dirigida mediante PCR y mutagénesis por inserción de un casete de una variante preparada anteriormente o una versión no variante del anticuerpo anti-TAT.

H. Modificaciones de los anticuerpos anti-TAT y polipéptidos TAT

Las modificaciones covalentes de los anticuerpos anti-TAT y polipéptidos TAT se incluyen en el campo de la presente invención. Una clase de modificación covalente incluye la reacción de residuos de aminoácidos objetivo de un anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT con un agente derivativo orgánico que sea capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos de los terminales N o C del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT. La derivación con agentes bifuncionales resulta útil, por ejemplo, para realizar enlaces cruzados, en cualquier sentido, entre un anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT y una matriz o superficie de soporte insoluble en agua que se emplee en el método para purificar anticuerpos anti-TAT. Entre los agentes de enlaces cruzados que normalmente se utilizan se incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetilo)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres de disuccinimidilo como 3,3'-ditiobis-(succinimidilpropionato), maleimidos bifuncionales como bis-N-maleimido-1,8-octano y agentes como metilo-3-[(p-azidofenilo)ditio]propioimidato.

Otras modificaciones incluyen desamidación de residuos de glutaminilo y asparaginilo por los residuos de glutamilo y aspartilo correspondientes, respectivamente, hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilos de residuos serilos o treonilos, metilación de grupos α-amino de lisina, arginina y cadenas laterales de histidina [T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, páginas 79-86 (1983)], acetilación del amino con terminal N y amidación de cualquier grupo carboxilo con terminal C.

Otra clase de modificación covalente del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT incluida en el campo de la presente invención consiste en alterar el patrón nativo de glicosilación del anticuerpo o polipéptido. Para los fines de la presente memoria descriptiva, la "alteración del patrón nativo de glicosilación" significa la eliminación de una o más porciones de carbohidratos presentes en la secuencia nativa del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT (bien eliminando el sitio de glicosilación subyacente, o suprimiendo la glicosilación en sí mediante medios químicos y/o enzimáticos) y/o la adición de uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en la secuencia nativa del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT. Además, esta frase incluye cambios cualitativos en la glicosilación de las proteínas nativas, lo que entraña un cambio en la naturaleza y las proporciones de las diversas porciones de carbohidratos presentes.

La glicosilación de anticuerpos y otros polipéptidos se realiza, generalmente, por enlace N u O. El enlace N se refiere al anclaje de la porción de carbohidratos en la cadena lateral de un residuo de asparragina. Las secuencias de tripéptidos asparragina-X-serina y asparragina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto la prolina, son las secuencias de reconocimiento para los anclajes enzimáticos de la porción de carbohidratos a la cadena lateral de asparragina. Por tanto, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptidos en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación por enlace O se refiere al anclaje de uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a un ácido hidroxiamino, más comúnmente serina o treonina, a pesar de que también se puede utilizar 5-hidroxiprolina y 5-hidroxilisina.

La adición de sitios de glicosilación al anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT se logra convenientemente alterando la secuencia de aminoácidos para que contenga una o más de las secuencias de tripéptidos descritas anteriormente (para sitios de glicosilación unidos por enlace N). La alteración también se puede realizar añadiendo, o sustituyendo, uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT original (para sitios de glicosilación unidos por enlace O). Opcionalmente, la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT se puede alterar introduciendo cambios en el ADN, especialmente mutando el ADN que codifique el anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT en bases previamente seleccionadas, de forma que se generen codones que se traducirán en los aminoácidos deseados.

Otro medio de aumentar la cantidad de porciones de carbohidratos en el el anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT es mediante emparejamiento químico o enzimático de los glucósidos al polipéptido. Estos métodos se describen en la materia, por ejemplo, en el documento WO 87/05330, publicado el 11 de septiembre de 1987, y en Aplin y Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., páginas 259-306 (1981).

La eliminación de las porciones de carbohidratos presentes en el anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT se puede lograr por métodos químicos o enzimáticos o por sustitución mutacional de los codones que codifiquen los residuos de aminoácidos que sirven como objetivos para la glicosilación. Las técnicas químicas de desglicosilación son conocidas en la materia y se describen, por ejemplo, en Hakimuddin, y col., Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987) y Edge y col., Anal. Biochem., 118:131 (1981). La escisión enzimática de porciones de carbohidratos en polipéptidos puede llevarse a cabo mediante el uso de diversas endo- y exo-glicosidasas, tal como se describe en Thotakura y col., Meth. Enzymol., 138:350 (1987).

Otra clase de modificación covalente de un anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT comprende el enlace del anticuerpo o polipéptido con uno de diversos polímeros no proteínicos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxialquilenos, tal como se establece en las patentes de EE.UU. n°s 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 ó 4.179.337. El anticuerpo o polipéptido también puede atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial (por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y poli-(metilmetacilato), respectivamente), en sistemas coloidales de administración de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se detallan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Oslo, A., Ed., (1980).

El anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT de la presente invención también se puede modificar de un modo que forme moléculas quiméricas que comprendan un anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT fusionado con otro polipéptido heterólogo o una secuencia de aminoácidos.

En otra realización, dicha molécula quimérica comprende una fusión del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT con un polipéptido señalizador que suministra un epítopo al que puede unirse selectivamente un anticuerpo antiseñal. La señal del epítopo se coloca generalmente en el terminal amino o carboxilo del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT. La presencia de estas formas del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT señalizadas con epítopos puede detectarse usando un anticuerpo contra el polipéptido señalizador. Asimismo, gracias a la señal del epítopo el anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT puede purificarse fácilmente mediante purificación de afinidad usando un anticuerpo antiseñal o cualquier otra clase de matriz de afinidad que se una a la señal del epítopo. En la materia se conocen diversos polipéptidos señalizadores y sus respectivos anticuerpos. Los ejemplos incluyen las señales de poli-histidina (poli-his) o poli-histidina-glicina (poli-his-gli); el polipéptido señalizador de la gripe HA y su anticuerpo 12CA5 [Field y col., Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)]; el señalizador c-myc y sus anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y

9E10 [Evan y col., Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)]; y el señalizador de la glicoproteína D (gD) del virus del Herpes Simplex y su anticuerpo [Paborsky y col., Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)]. Otros polipéptidos señalizadores incluyen el péptido señalizador [Hopp y col., BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)]; el péptido del epítopo KT3 [Martin y col., Science, 255:192-194 (1992)]; un péptido epítopo de la α-tubulina [Skinner y col., J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)]; y el señalizador del péptido de la proteína 10 del gen T7 [Lutz-Freyermuth y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)].

En una realización alternativa, la molécula quimérica puede comprender una fusión del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula quimérica (a la que también se hace referencia como una "inmunoadhesina"), dicha fusión podría ser la región Fc de una molécula de IgG. Las fusiones de Ig preferentemente incluyen la introducción de una forma soluble (dominio transmembrana eliminado o inactivado) de un anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT en sustitución de al menos una región variable dentro de una molécula de Ig. En una realización particularmente preferente, la fusión de inmunoglobulina incluye las regiones bisagra, CH_2 y CH_3, o las regiones bisagra, CH_1, CH_2 y CH_3 de una molécula de IgG1. Para la producción de las fusiones de inmunoglobulina, véase también la patente de EE.UU. nº 5.428.130 concedida el 27 de junio de 1995.

I. Preparación de anticuerpos anti-TAT y polipéptidos TAT

La siguiente descripción está relacionada principalmente con la producción de anticuerpos anti-TAT y polipéptidos TAT mediante células de cultivo transformadas o transfectadas con un vector que contiene un ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-TAT y el polipéptido TAT. Se contempla, por supuesto, que se puedan emplear métodos alternativos, bien conocidos en la materia, para preparar anticuerpos anti-TAT y polipéptidos TAT. Por ejemplo, se puede producir la secuencia de aminoácidos apropiada, o partes de la misma, mediante síntesis directa de péptidos utilizando técnicas de fase sólida [véase, por ejemplo, Steward y col., Solid-Phase Peptide Synthesis, (1969) W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963)]. La síntesis de proteínas *in vitro* se puede realizar utilizando técnicas manuales o mediante automatización. La síntesis automatizada se puede conseguir, por ejemplo, utilizando un sintetizador de péptidos Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Diversas porciones del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT pueden sintetizarse químicamente por separado y combinarse usando métodos químicos o enzimáticos a fin de producir el anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT deseado.

1. Aislamiento del ADN que codifica un anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT

El ADN que codifica un anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT puede obtenerse de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejidos que se crea que posea el ARNm del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT y lo exprese a un nivel detectable. Por consiguiente, el ADN humano del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT se puede obtener oportunamente de una biblioteca de ADNc preparada a partir de tejido humano. El gen que codifica el anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT también se puede obtener de una biblioteca genómica o mediante procedimientos sintéticos conocidos (por ejemplo, síntesis automatizada de ácidos nucleicos).

Las bibliotecas se pueden explorar con sondas (como oligonucleótidos de al menos unas 20-28 bases) diseñadas para identificar el gen de interés o la proteína codificada por él. La exploración del ADNc o la biblioteca genómica con la sonda seleccionada se puede llevar a cabo utilizando procedimientos estándar, como los descritos en Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Un medio alternativo para aislar el gen que codifica el anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT consisten en utilizar la metodología de la PCR [Sambrook y col., supra; Dieffenbach y col., PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

Las técnicas de exploración de una biblioteca de ADNc son bien conocidas en la materia. Las secuencias de oligonucleótidos seleccionadas como sondas deberían tener la longitud suficiente y ser lo suficientemente unívocas como para minimizar los falsos positivos. El oligonucleótido está preferentemente marcado de forma que se pueda detectar tras la hibridación con el ADN de la biblioteca que se esté explorando. Los métodos de marcado son bien conocidos en la materia e incluyen el uso de radiomarcadores como ATP marcado con ^{32}P, biotinilación o marcado enzimático. Las condiciones de hibridación, incluyendo las restrictivas moderadas y altas, se indican en Sambrook y col., supra.

Las secuencias identificadas en estos métodos de exploración de bibliotecas se pueden comparar y alinear con otras secuencias conocidas depositadas y disponibles en bases de datos públicas como GenBank u otras bases de datos privadas de secuencias. La identidad de las secuencias (ya sea al nivel de aminoácidos o nucleótidos) dentro de regiones definidas de la molécula o en la secuencia de longitud completa se puede determinar mediante métodos conocidos en la materia, tal como se describe en la presente memoria descriptiva.

El ácido nucleico con secuencia codificadora de proteínas se puede obtener mediante exploración de moléculas de ADNc o bibliotecas genómicas seleccionadas utilizando la secuencia

de aminoácidos deducida detallada en la presente memoria descriptiva por primera vez y, si fuera necesario, empleando métodos convencionales de extensión de cebadores tal como se describe en Sambrook y col., supra, para detectar precursores e intermediarios del procesamiento del ARNm que tal vez no se hayan retrotranscrito en ADNc.

2. Selección y transformación de células huésped

Las células huésped se transfectan o transforman con los vectores de expresión o clonación descritos en la presente memoria descriptiva para la producción de anticuerpos anti-TAT o polipéptidos TAT y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados adecuadamente para inducir promotores, seleccionar transformadores o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. El experto en la materia puede seleccionar las condiciones de cultivo, como el medio de cultivo, la temperatura, el pH y similares, sin excesiva experimentación. En general, los principios, los protocolos y las técnicas prácticas para maximizar la productividad de los cultivos celulares se pueden encontrar en Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) y Sambrook y col., supra.

Los métodos de transfección de células eucarióticas y transformación de células procarióticas son bien conocidos por el experto en la materia, por ejemplo, electroporación con mediación de liposomas, $CaCl_2$ y $CaPO_4$. Según la célula huésped que se utilice, la transformación se realiza empleando técnicas estándar apropiadas para dichas células. El tratamiento con calcio que emplea cloruro cálcico, descrito en Sambrook y col., supra, o electroporación, se utiliza generalmente para las procariotas. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se utiliza para la transformación de determinadas células vegetales, como se describe en Shaw y col., Gene, 23:315 (1983) y el documento WO 89/05859 publicado el 29 de junio de 1989. Para las células de mamíferos sin estas paredes celulares, se puede emplear el método de precipitación con fosfato cálcico de Graham y van der Eb, Virology, 52:456-457 (1978). Se han descrito aspectos generales de las transfecciones del sistema de células huésped de mamíferos en la patente de EE.UU. nº 4.399.216. Las transformaciones en levadura se suelen llevar a cabo según el método de Van Solingen y col., J. Bact., 130:946 (1977) y Hsiao y col., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76:3829 (1979). No obstante, también se pueden utilizar otros métodos para introducir ADN en células, como microinyección nuclear, electroporación, fusión de protoplastos bacterianos con células intactas, o policaciones, por ejemplo, polibreno, poliornitina. Para información sobre diversas técnicas para la transformación de células de mamíferos, véase Keown y col., Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990) y Mansour y col., Nature, 336:348-352 (1988).

Las células huésped adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores de la presente memoria descriptiva incluyen células procariotas, de levadura o eucariotas superiores. Las células procariotas aptas incluyen, aunque sin limitarse a, eubacterias, como los organismos Gram negativos o positivos, por ejemplo, enterobacterias como *E. coli*. Diversas cepas de *E. coli* están públicamente disponibles, como la MM294 de *E. coli* K12 (ATCC 31.446), la X1776 (ATCC 31.537), la W3110 (ATCC 27.325) y la 775 de *E. coli* K5 (ATCC 53.635). Otras células huésped procariotas adecuadas incluyen enterobacterias, como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans*, y *Shigella*, así como *Bacilli* tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis* 41P detallada en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. Estos ejemplos tienen un carácter ilustrativo más que restrictivo. La cepa W3110 es una huésped particularmente preferente o parental, porque comúnmente actúa como huésped en las fermentaciones de productos de ADN recombinante. Preferentemente, la célula huésped secreta cantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la cepa W3110 se puede modificar para obtener una mutación genética en los genes que codifican proteínas endógenas en el huésped, y entre los ejemplos de estos huéspedes están la cepa 1A2 de *E. coli* W3110, que tiene el genotipo completo *tonA*; la cepa 9E4 de *E. coli* W3110, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3*; la cepa 7C7 de *E. coli* W3110 (ATCC 55.244), que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan*^{r}; la cepa 37D6 de *E. coli* W3110, que tiene el genotipo completo *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan*^{r}; la cepa 40BA de *E. coli* W3110, que es la cepa 37D6 mutada a través de la eliminación resistente de *degP* sin kanamicina; y una cepa de *E. coli* con proteasa periplasmática mutada descrita en la patente de EE.UU. nº 4.946.783 publicada el 7 de agosto de 1990. Alternativamente, los métodos *in vitro* de clonación, por ejemplo, PCR u otras reacciones de la polimerasa de ácidos nucleicos, son adecuados.

Los anticuerpos de longitud completa, los fragmentos de anticuerpo y las proteínas de fusión del anticuerpo se pueden producir en bacterias, en especial cuando la glicosilación y la función efectora de Fc no se necesitan, lo que ocurre por ejemplo cuando el anticuerpo terapéutico se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, una toxina) y el inmunoconjugado por si mismo muestra eficacia en la destrucción de células tumorales. Los anticuerpos de longitud completa tienen mayor vida media en circulación. La producción en E. coli es más rápida y rentable. Para la expresión de fragmentos de anticuerpos y polipéptidos en bacterias, véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n°s 5.648.237 (Carter y col.), 5.789.199 (Joly y col.), y 5.840.523 (Simmons y col.), que

227

describen las secuencias de señal y la región de iniciación de la traducción (TIR) para optimizar la expresión y secreción. Estas patentes se incorporan en la presente memoria descriptiva a modo de referencia. Tras la expresión, el anticuerpo se aísla de la pasta celular de E. coli en una fracción soluble y se puede purificar a través, por ejemplo, de una columna de proteínas A o G, dependiendo del isotipo. La purificación final puede realizarse de forma similar al proceso de purificación de anticuerpos expresados en, por ejemplo, células CHO.

Además de las células procariotas, los microbios eucarióticos, como los hongos filamentosos o la levadura, también son aptos como huéspedes para clonar o expresar los vectores que codifiquen anticuerpos anti-TAT o polipéptidos TAT. Un microorganismo huésped eucariótico inferior que se utiliza comúnmente es *Saccharomyces cerevisiae*. Otros incluyen *Schizosaccharomyces pombe* (Beach y Nurse, Nature, 290: 140 [1981]; patente europea nº 139.383 publicada el 2 de mayo de 1985); huéspedes *Kluyveromyces* (patente de EE.UU. nº 4.943.529; Fleer y col., Bio/Technology, 9:968-975 (1991)) 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. wickeramii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilarum* (ATCC 36.906; Van den Berg y col., Bio/Technology, 8:135 (1990)), *K. thermotolerans* y *K. marxianus; yarrowia* (patente europea nº 402.226); *Pichia pastoris* (patente europea nº 183.070; Sreekrishna y col., J. Basic Microbiol., 28:265-278 [1988]); *Candida; Trichoderma reesia* (patente europea nº 244.234); *Neurospora crassa* (Case y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5259-5263 [1979]); *Schwanniomyces* como *Schwanniomyces occidentalis* (patente europea nº 394.538 publicada el 31 de octubre de 1990); y hongos filamentosos como, por ejemplo, *Neurospora, Penicillium, Tolypocladium* (documento WO 91/00357 publicado el 10 de enero de 1991), y huéspedes *Aspergillus* 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 metilotrópicas son adecuadas en la presente memoria descriptiva e incluyen, aunque sin limitarse a, levaduras capaces de crecer en metanol seleccionadas del género formado por *Hansenula, Candida, Kloeckera, Pichia, Saccharomyces, Torulopsis* and *Rhodotorula*. Una lista de especies específicas que son ejemplos típicos de esta clase de levaduras se puede encontrar en C. Anthony, The Biochemistry of Methylotrophs, 269 (1982).

Las células huésped adecuadas para la expresión del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT glicosilado se derivan de organismos pluricelulares. Entre los ejemplos de células de invertebrados están las células de insectos como Drosofila S2 y Espodoptera Sf9, así como células vegetales, como

cultivos celulares de algodón, maíz, patata, semilla de soja, petunia, tomate y tabaco. Se han identificado numerosas cepas y variantes baculovirales y las correspondientes células huésped de insectos permisivas procedentes de huéspedes como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Diversas cepas de virus para transfección están públicamente disponibles, por ejemplo, la variante L-1 del NPV *Autographa californica* y la cepa Bm-5 del NPV *Bombyx mori*, y estos virus se pueden usar como el virus en la presente memoria descriptiva, de acuerdo con la presente invención, en concreto para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

No obstante, el mayor interés se ha centrado en las células de vertebrados, y la propagación de éstas en cultivos (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento habitual. Ejemplos de líneas celulares útiles de mamíferos son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (293 ó 293 células subclonadas para crecer en cultivo en suspensión, Graham y col., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); células de riñón de crías de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO, Urlaub y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); células sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC CCL 2); células caninas de riñón (MDCK, ATCC CCL 34); células de riñón de ratas búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células humanas de pulmón (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); tumor de mama 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).

Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o clonación descritos anteriormente para la producción del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados como es adecuado para inducir promotores, seleccionar transformadores o amplificar los genes que codifiquen las secuencias deseadas.

3. Selección y uso de un vector replicable

El ácido nucleico (por ejemplo, ADNc o genómico) que codifica un anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT puede insertarse en un vector replicable para clonar (amplificación del ADN) o expresar. Diversos vectores están públicamente disponibles. El vector, por ejemplo, puede presentarse en forma de un plásmido, cósmido, partícula viral o fago. La secuencia apropiada de ácidos nucleicos se puede insertar en el vector mediante diversos procedimientos. En general, el ADN se inserta en uno o más sitios de endonucleasa de restricción apropiados utilizando técnicas

conocidas en la materia. Los componentes del vector suelen incluir, aunque sin limitarse a, una o más secuencias de señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de finalización de la transcripción. En la construcción de vectores adecuados que contengan uno o más de estos componentes se emplean técnicas estándar de ligado que los expertos en la materia conocen.

El TAT puede producirse de forma recombinante, no sólo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que puede ser una secuencia de señal u otro polipéptido con un sitio de escisión específico en el extremo N-terminal de la proteína madura o el polipéptido. En general, la secuencia de señal puede ser un componente del vector, o puede ser parte del ADN que codifica el anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT que se inserta en el vector. La secuencia de señal puede ser una secuencia de señal procariótica seleccionada, por ejemplo, a partir del grupo de la fosfatasa alcalina, penicilasa, lpp o los líderes de enterotoxina II termoestables. Para la secreción de levadura, la secuencia de señal puede ser, por ejemplo, el líder de la invertasa de la levadura, el líder del factor alfa (incluyendo los líderes del factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, este último descrito en la patente de EE.UU. nº 5.010.182), o el líder de la fosfatasa ácida, el líder de la glucoamilasa *C. albicans* (patente europea nº 362.179, publicada el 4 de abril de 1990), o la señal descrita en el documento WO 90/13646 publicado el 15 de noviembre de 1990. En la expresión de células de mamíferos, las secuencias de señal de mamíferos se pueden utilizar para dirigir la secreción de la proteína, como las secuencias de señal procedentes de polipéptidos secretados de la misma especie o una afín, así como los líderes de secretores de virus.

Los vectores tanto de expresión como clonación contienen una secuencia de ácidos nucleicos que permite que el vector se replique en una o más células huésped seleccionadas. Dichas secuencias son bien conocidas para diversas bacterias, levaduras y virus. El origen de la replicación a partir del plásmido pBR322 es apto para la mayoría de las bacterias Gram negativas, el origen plasmídico 2μ es adecuado para la levadura y varios orígenes virales (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para los vectores de clonación en células de mamíferos.

Los vectores de expresión y clonación contendrán, por lo general, un gen de selección, también denominado marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) otorgan resistencia a antibióticos u otras toxinas, como por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan las deficiencias auxotróficas o (c) proporcionan nutrientes importantes que no se encuentran disponibles en medios complejos, como por ejemplo, el gen que codifica la D-alanina racemasa para *Bacilli*.

Un ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamíferos está formado por aquéllos que permiten la identificación de células con capacidad para absorber el ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT, como DHFR o timidina quinasa. Una célula huésped apropiada cuando se emplea el DHFR de tipo natural es la línea celular de CHO deficiente en actividad de DHFR, preparada y propagada como se describe en Urlaub y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980). Un gen de selección apto para su 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 *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad para crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC nº 44076 o PEP4-1 [Jones, Genetics, 85:12 (1977)].

Los vectores de expresión y clonación suelen contener un promotor enlazado de forma operable a la secuencia de ácidos nucléicos que codifica el anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT para dirigir la síntesis del ARNm. Los promotores reconocidos por diversas células huésped posibles son bien conocidos. Entre los promotores aptos para su uso con huéspedes procarióticos están los sistemas promotores de la β-lactamasa y la lactosa [Chang y col., Nature, 275:615 (1978); Goeddel y col., Nature, 281:544 (1979)], la fosfatasa alcalina, un sistema promotor del triptofano (trp) [Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); patente europea nº 36.776] y promotores híbridos como el promotor tac [deBoer y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)]. Los promotores que se utilizan en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia Shine-Dalgarno (S.D.) enlazada de forma operable al ADN que codifica el anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT.

Entre los ejemplos de secuencias de promotores adecuadas para el uso con huéspedes de levadura están los promotores para 3-fosfoglicerato quinasa [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, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosefosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa.

Otros promotores de la levadura, que son promotores inducibles con la ventaja adicional de tener una transcripción controlada por las condiciones de crecimiento, son las regiones de promotores para alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradativas asociadas al metabolismo del nitrógeno, metalotioneina, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. En la patente europea nº 73.657 se

describen con mayor detalle los vectores y promotores adecuados para usarlos en la expresión de la levadura.

La transcripción del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT a partir de los vectores en células huésped de mamíferos está controlada, por ejemplo, por promotores obtenidos a partir de los genomas de virus como el virus polioma, el virus de la viruela de las aves de corral (patente del R.U. nº 2.211.504 publicada el 5 de julio de 1989), el adenovirus (como el adenovirus 2), el virus del papiloma bovino, el virus del sarcoma aviario, el citomegalovirus, un retrovirus, el virus de la hepatitis B y el Simian Virus 40 (SV40), a partir de promotores heterólogos de mamíferos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, y a partir de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de las células huésped.

La trascripción del ADN que codifica el anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT mediante eucariotas superiores se puede aumentar insertando la secuencia de un potenciador en el vector. Los potenciadores son elementos de ADN que actúan en Cis, por lo general de entre10 y 300 bp, que actúan en un promotor para aumentar su transcripción. Actualmente, se conocen muchas secuencias de potenciadores de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, α-fetoproteína e insulina). No obstante, lo habitual es que se utilice un potenciador procedente de un virus de células eucarióticas. Entre los ejemplos destacan el potenciador del SV40 en el lado tardío del origen de la replicación (100-270 bp), el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de la replicación y los potenciadores de adenovirus. El potenciador puede empalmarse en el vector en una posición 5' o 3' a la secuencia codificadora del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT, pero preferentemente se coloca en un sitio 5' desde el promotor.

Los vectores de expresión utilizados en las células huésped eucarióticas (células de levadura, fúngicas, de insectos, vegetales, animales, humanas o nucleadas de otros organismos multicelulares) también contarán con secuencias necesarias para finalizar la transcripción y estabilizar el ARNm. Estas secuencias están habitualmente disponibles en las regiones no traducidas del extremo 5', y ocasionalmente el 3', de los ADN o ADNc eucarióticos o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica un anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT.

Otros métodos, vectores y células huésped aptos para la adaptación a la síntesis del anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT en cultivos de células de vertebrados recombinantes se describen en Gething y col., Nature, 293:620-625 (1981); Mantei y col., Nature, 281:40-46 (1979); patente europea nº 117.060; y la patente europea nº 117.058.

4. Cultivo de células huésped

Las células huésped utilizadas para producir el anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT de la presente invención se pueden cultivar en diversos medios. Medios comercializados como Ham's F10 (Sigma), Minimal Essential Medium ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y Dulbecco's Modified Eagle's Medium ((DMEM), Sigma) son aptos para el cultivo de células huésped. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham y col., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes y col., Anal. Biochem.102:255 (1980), las patentes de EE.UU. n°s 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655 ó 5.122.469; el documento WO 90/03430; el documento WO 87/00195; o la patente de EE.UU. Re. 30.985 se pueden utilizar como medios de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios se puede suplementar cuando sea necesario con hormonas y/u otros factores del crecimiento (como insulina, transferrina o el factor del crecimiento epidérmico), sales (como cloruro sódico, calcio, magnesio y fosfato), tampones (como HEPES), nucleótidos (como adenosina y timidina), antibióticos (como el fármaco GENTAMYCIN™), elementos de traza (definidos como compuestos inorgánicos presentes, por lo habitual, en las concentraciones finales en el rango micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También se puede incluir cualquier otro suplemento necesario, a concentraciones adecuadas, que los expertos en la materia conociesen. Las condiciones del cultivo, como la temperatura o el pH entre otras, son las utilizadas anteriormente con la célula huésped seleccionada para expresión y serán evidentes para el experto en la materia.

5. Detección de la amplificación/expresión génica

La amplificación y/o expresión génica se puede medir en una muestra directamente, por ejemplo, mediante "Southern blot" convencional, "Northern blot" para cuantificar la transcripción del ARNm [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)], "dot blotting" (análisis del ADN) o hibridación *in situ*, utilizando una sonda debidamente marcada, basada en las secuencias suministradas en la presente memoria descriptiva. Como alternativa, se pueden emplear anticuerpos que puedan reconocer dúplex específicos, incluyendo dúplex de ADN, ARN, híbridos de ADN-ARN o ADN-proteína. A su vez, los anticuerpos se pueden marcar y se puede llevar a cabo el análisis donde el dúplex está unido a una supeficie, de forma que, tras la formación del dúplex en la superficie, se pueda detectar la presencia del anticuerpo unido al dúplex.

Alternativamente, la expresión génica se puede medir mediante métodos inmunológicos, como tinción inmunohistoquímica de células o secciones tisulares y análisis de cultivos celulares o fluidos corporales, para cuantificar directamente la expresión del producto génico. Los anticuerpos útiles para tinción inmunohistoquímica y/o análisis de fluidos de muestra pueden ser monoclonales o policlonales y se pueden preparar en cualquier mamífero. Es útil que los anticuerpos se puedan

preparar contra un polipéptido TAT de secuencia nativa o un péptido sintético sobre la base de las secuencias de ADN proporcionadas en la presente memoria descriptiva, o contra una secuencia exógena fusionada con el ADN de un TAT y que codifique un epítopo específico del anticuerpo.

6. Purificación de anticuerpos anti-TAT y polipéptidos TAT

Pueden recuperarse formas de anticuerpos anti-TAT y polipéptidos TAT de un medio de cultivo o lisados de células huésped. Si se encuentra unido a la membrana, puede liberarse de la membrana utilizando una solución detergente apropiada (por ejemplo, Triton-X 100) o mediante escisión enzimática. Las células utilizadas en la expresión del anticuerpo anti-TAT y el polipéptido TAT pueden verse alteradas por diversos medios físicos o químicos, como el ciclo de congelación/descongelación, la sonicación, la alteración mecánica o los agentes de lisado celular.

Es posible que se desee purificar el anticuerpo anti-TAT y el polipéptido TAT de proteínas o polipéptidos de células recombinantes. Los siguientes procedimientos son ejemplos de procedimientos de purificación adecuados: fraccionamiento en una columna de intercambio iónica, precipitación de etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice o una resina de intercambio iónico como DEAE, cromatoisoenfoque, SDS-PAGE, precipitación de sulfato de amonio, filtración en gel mediante, por ejemplo, Sephadex G-75, columnas de proteína A Sefarosa para eliminar contaminantes como IgG y columnas quelantes de metales para unir formas señalizadas con epítopo del anticuerpo anti-TAT y el polipéptido TAT. Pueden utilizarse diversos métodos de purificación de proteínas que son conocidos en la materia y se describen, por ejemplo, en Deutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, Nueva York (1982). Las etapas de purificación seleccionadas dependerán, por ejemplo, de la naturaleza del proceso de producción utilizado y el anticuerpo anti-TAT o polipéptido TAT concreto producido.

Cuando se usen técnicas recombinantes, el anticuerpo puede producirse a nivel intracelular, en el espacio periplásmico, o secretarse directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce a nivel intracelular, como primer paso, los residuos de partículas, ya sean células huésped o fragmentos lisados, se eliminan, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter y col., Bio/Technology 10:163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan en el espacio periplásmico de *E. coli*. En resumen, la pasta celular se descongela en presencia de acetato sódico (pH 3,5), EDTA y fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) en un período de unos 30 minutos. Los residuos celulares pueden eliminarse por centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta en el medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión se concentran primero, por lo general, utilizando un filtro para concentración de proteínas comercializado, por ejemplo una

unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. En cualquiera de las fases anteriores se puede incluir un inhibidor de la proteasa como PMSF para inhibir la proteolisis y antibióticos para impedir el crecimiento de contaminantes espontáneos.

La composición del anticuerpo preparado a partir de las células se puede purificar utilizando, por ejemplo, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo esta última la técnica de purificación preferente. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de las especies y el isotipo de cualquier domino Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A puede utilizarse para purificar anticuerpos que se basen en cadenas pesadas humanas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ (Lindmark y col., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y la $\gamma 3$ humana (Guss y col., EMBO J. 5:15671575 (1986)). La matriz a la que el ligando de afinidad se une suele ser la agarosa, pero también hay disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables, como vidrio poroso controlado o poli(estirenodivinil)benceno, permiten tasas de flujo más rápidas y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden lograr con agarosa. Cuando el anticuerpo comprende un dominio C_H3, la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, Nueva Jersey) es útil para la purificación. También están disponibles, según el anticuerpo que quiera recuperarse, otras técnicas para la purificación de las proteínas, como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación en etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina SEPHAROSE™, cromatografía en una resina de intercambio aniónico o catiónico (como una columna de ácido poliaspártico), cromatoisoenfoque, SDS-PAGE y precipitación en sulfato de amonio.

Siguiendo cualquiera de las fases preliminares de purificación, la mezcla que contiene el anticuerpo de interés y los contaminantes puede estar sujeta a cromatografía de interacción hidrófoba con pH bajo utilizando un tampón de elución a un pH entre 2,5 y 4,5, preferentemente a concentraciones bajas en sal (por ejemplo, entre 0 y 0,25 M sal aproximadamente).

J. Formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas de los anticuerpos anti-TAT, los oligopéptidos que se unen a un TAT, las moléculas orgánicas que se unen a un TAT y/o los polipéptidos TAT utilizadas de acuerdo con la presente invención se preparan para su almacenamiento mezclando el anticuerpo, polipéptido, oligopéptido o molécula orgánica que tenga el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizadores opcionales que sean aceptables para un uso farmacéutico (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los

receptores en las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones como acetato, Tris, fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos, antioxidantes que incluyen el ácido ascórbico y metionina; conservantes (como el cloruro de octadecildimetilbenzil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de benzetonio; fenol; alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos como polivinilpirrolidona; aminoácidos como glicina, glutamina, asparragina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes como EDTA; tonificantes, como trehalosa y cloruro sódico; azúcares como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; surfactantes como polisorbato; contraiones que formen sales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); y/o surfactantes no iónicos como TWEEN®, PLURONICS® o polietilenglicol (PEG). El anticuerpo comprende preferentemente el anticuerpo a una concentración comprendida entre 5 y 200 mg/ml, preferentemente entre 10 y 100 mg/ml.

Las formulaciones de la presente memoria descriptiva también contienen más de un compuesto activo tal y como sea necesario para la indicación particular que se esté tratando, preferentemente aquéllas con actividades complementarias que no se afecten de manera adversa entre sí. Por ejemplo, además de un anticuerpo anti-TAT, un oligopéptido que se una a un TAT o una molécula orgánica que se una a un TAT, podría ser deseable incluir en la formulación un anticuerpo adicional, por ejemplo, un segundo anticuerpo anti-TAT que se una a un epítopo distinto en el polipéptido TAT, o un anticuerpo para algún otro objetivo como un factor del crecimiento que afecte al crecimiento del cáncer en cuestión. De forma alternativa, o adicionalmente, la composición también puede comprender un agente quimioterapéutico, un agente citotóxico, una citoquina, un agente inhibidor del crecimiento, un agente antihormonal y/o un cardioprotector. Dichas moléculas están presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el fin que se pretende.

Los ingredientes activos también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y poli-(metilmetacilato), respectivamente, en sistemas coloidales de administración de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Dichas técnicas se detallan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Osol, A., Ed., (1980).

Se pueden elaborar preparaciones de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos

sólidos que contienen el anticuerpo, cuyas matrices están en forma de elementos moldeados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli-(2-hidroxietil-metacrilato), o poli-(vinilalcohol)), polilácticos (patente de EE.UU. nº 3.773.919), copolímeros del ácido L-glutámico y γ-etil-L-glutamato, acetato de etilenvinilo no degradable, copolímeros del ácido glicólico-ácido láctico degradables como LUPRON DEPOT® (microesferas inyectables compuestas por copolímeros del ácido glicólico-ácido láctico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico.

Las formulaciones para administrar *in vivo* deben ser estériles. Esto se logra filtrando a través de membranas de filtración estériles.

K. Diagnosis y tratamiento con anticuerpos anti-TAT, oligopéptidos que se unen a un TAT y moléculas orgánicas que se unen a un TAT

Existen varias pruebas diagnósticas para determinar la expresión de un TAT en el cáncer. En una realización, la sobreexpresión del polipéptido TAT puede analizarse mediante inmunohistoquímica (IHC). Las secciones de tejido de una biopsia tumoral impregnadas en parafina pueden someterse a la prueba de IHC, y se pueden determinar criterios para la intensidad de tinción proteínica de un TAT de la siguiente manera:

Puntuación 0 – no se observa tinción alguna, o se observa tinción de la membrana en menos del 10% de las células tumorales.

Puntuación 1+ – se detecta una tinción leve/apenas apreciable en más del 10% de las células tumorales. Sólo una parte de la membrana de las células presenta tinción.

Puntuación 2+ – se detecta una tinción entre débil y moderada en toda la membrana de más del 10% de las células tumorales.

Puntuación 3+ – se detecta una tinción entre moderada y fuerte en toda la membrana de más del 10% de las células tumorales.

Aquellos tumores con puntuación 0 ó 1+ en la expresión del polipéptido TAT pueden caracterizarse como tumores que no sobreexpresan un TAT, mientras que los que tengan una puntuación 2+ ó 3+ pueden caracterizarse como tumores que sobreexpresan un TAT.

De forma alternativa, o adicionalmente, las pruebas FISH como INFORM® (comercializado por Ventana, Arizona) o PATHVISION® (Vysis, Illinois) pueden realizarse en tejido tumoral impregnado en parafina y fijado en formalina para determinar la extensión (si la hay) de la sobreexpresión de un TAT en el tumor.

La sobreexpresión o amplificación de un TAT puede evaluarse utilizando una prueba diagnóstica *in vivo*, por ejemplo, administrando una molécula (como un anticuerpo, oligopéptido o

molécula orgánica) que une la molécula que se quiera detectar y está señalizada con un marcador detectable (por ejemplo, un isótopo radioactivo o marcador fluorescente) y explorando externamente al paciente para localizar el marcador.

Tal como se ha descrito anteriormente, los anticuerpos anti-TAT, los oligopéptidos y las moléculas orgánicas de la invención tienen diversas aplicaciones no terapéuticas. Los anticuerpos anti-TAT, los oligopéptidos y las moléculas orgánicas de la presente invención pueden ser útiles para diagnosticar y establecer las fases de cánceres que expresen un polipéptido TAT (por ejemplo, en el diagnóstico por radioimágenes). Los anticuerpos, los oligopéptidos y las moléculas orgánicas también son útiles para purificar o inmunoprecipitar los polipéptidos TAT de las células, detectar y cuantificar los polipéptidos TAT *in vitro*, por ejemplo, en un ensayo ELISA o un "Western blot", y matar y eliminar las células de una población heterogénea que expresen un TAT como paso en la purificación de otras células.

Actualmente, según la fase del cáncer, el tratamiento contra éste implica una de las siguientes terapias o una combinación de las mismas: cirugía para eliminar el tejido canceroso, radioterapia y quimioterapia. La terapia con anticuerpos anti-TAT, oligopéptidos o moléculas orgánicas puede ser especialmente deseable en pacientes de mayor edad que no toleren bien la toxicidad y los efectos secundarios de la quimioterapia y en casos de enfermedad metastásica donde la radioterapia tiene una utilidad limitada. Los anticuerpos anti-TAT, los oligopéptidos y las moléculas orgánicas de la invención que actúan sobre un tumor como objetivo son útiles para aliviar los cánceres que expresen un TAT tras el diagnóstico inicial de la enfermedad o durante las recidivas. Para las aplicaciones terapéuticas, el anticuerpo anti-TAT, el oligopéptido o la molécula orgánica se puede utilizar solo, o en terapia de combinación con, por ejemplo, hormonas, antiangiogenes o compuestos radiomarcados, o con cirugía, crioterapia y/o radioterapia. El tratamiento con anticuerpos anti-TAT, oligopéptidos o moléculas orgánicas puede administrarse junto con otras formas de terapias convencionales, bien antes, simultáneamente o después de una de estas terapias convencionales. Los fármacos quimioterapéuticos, como TAXOTERE® (docetaxel), TAXOL® (paclitaxel), estramustina y mitoxantrona, se utilizan para tratar el cáncer, en particular, en pacientes con un buen nivel de riesgo. En el presente método de la invención para tratar o aliviar el cáncer, se puede administrar al paciente un anticuerpo anti-TAT, un oligopéptido o una molécula orgánica junto con un tratamiento con uno o más de los agentes quimioterapéuticos anteriormente mencionados. En particular, se contempla la terapia de combinación con paclitaxel y derivados modificados (véase, por ejemplo, EP0600517). El anticuerpo anti-TAT, el oligopéptido o la molécula orgánica se administrará con una dosis terapéuticamente eficaz del agente quimioterapéutico. En otra realización, el anticuerpo

anti-TAT, el oligopéptido o la molécula orgánica se administra junto con quimioterapia a fin de potenciar la actividad y eficacia del agente quimioterapéutico, por ejemplo, paclitaxel. Las dosis detalladas en la Referencia de Escritorio de los Médicos (PDR, por sus siglas en inglés) de estos agentes se han utilizado en el tratamiento de diversos cánceres. La pauta posológica de estos fármacos quimioterapéuticos mencionados anteriormente que son terapéuticamente eficaces dependerá del cáncer en particular que se esté tratando, el grado de la enfermedad y otros factores conocidos por los médicos expertos en la materia, quienes pueden determinar dicho régimen.

En una realización en particular, se administra al paciente un conjugado compuesto por un anticuerpo anti-TAT, un oligopéptido o una molécula orgánica que se conjuga con un agente citotóxico. Preferentemente, la célula internaliza el inmunoconjugado unido a la proteína de un TAT, ocasionando una mayor eficacia terapéutica del inmunoconjugado para matar la célula cancerosa a la cual se une. En una realización preferente, el agente citotóxico actúa o interfiere en el ácido nucleico en la célula cancerosa. Anteriormente se han descrito ejemplos de dichos agentes citotóxicos, que incluyen maitansinoides, caliqueamicinas, ribonucleasas y endonucleasas de ADN.

Los anticuerpos anti-TAT, los oligopéptidos, las moléculas orgánicas o los conjugados de toxinas de los mismos se administran a un paciente humano de acuerdo con métodos conocidos, como la administración intravenosa, por ejemplo, como un bolo, o por infusión continua durante un período de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o por inhalación. Se prefiere la administración intravenosa o subcutánea del anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica.

Otros regímenes terapéuticos pueden combinarse con la administración del anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica. La administración combinada incluye la coadministración, utilizando formulaciones separadas o una única formulación farmacéutica, y la administración consecutiva en cualquier orden, en que preferentemente exista un período en el cual ambos (o todos los) agentes activos ejerzan simultáneamente sus actividades biológicas. Preferentemente, esta terapia combinada desencadena un efecto terapéutico sinérgico.

También puede ser deseable combinar la administración de los anticuerpos anti-TAT, los oligopéptidos o las moléculas orgánicas con la de un anticuerpo dirigido contra otro antígeno tumoral asociado al cáncer en cuestión.

En otra realización, los métodos de tratamiento terapéutico de la presente invención suponen la administración combinada de un anticuerpo (o anticuerpos) anti-TAT, oligopéptidos o moléculas orgánicas y uno o más agentes quimioterapéuticos o agentes inhibidores del crecimiento, incluyendo la coadministración de cócteles de diferentes agentes quimioterapéuticos. Entre los agentes

quimioterapéuticos se incluyen fosfato de estramustina, prednimustina, cisplatino, 5-fluorouracilo, melfalán, ciclofosfamida, hidroxiurea e hidroxiureataxanos (como paclitaxel y doxetaxel) y/o antibióticos de antraciclina. Los calendarios de preparación y dosificación para dichos agentes quimioterapéuticos se pueden utilizar de acuerdo con las instrucciones del fabricante o como determine empíricamente el médico cualificado. Los calendarios de preparación y dosificación para esta quimioterapia se describen también en Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992).

El anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica se puede combinar con compuestos antihormonales, por ejemplo, compuestos antiestrógeno como tamoxifen, antiprogesterona como onapristona (véase la patente europea nº 616.812) o antiandrógeno como flutamida, en dosis conocidas para esas moléculas. Si el cáncer que hay que tratar no depende de los andrógenos, puede que se haya sometido previamente al paciente a una terapia antiandrógenos y, una vez el cáncer ya es independiente de los andrógenos, se le puede administrar el anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica (y opcionalmente otros agentes tal como se describe en la presente memoria descriptiva).

En ocasiones, puede ser beneficiosa también la coadministración al paciente de un cardioprotector (para prevenir o reducir la disfunción miocárdica asociada al tratamiento) o una o más citocinas. Además de los anteriores regímenes terapéuticos, el paciente puede someterse a la eliminación quirúrgica de las células cancerosas y/o radioterapia, antes, simultanéamente o después de la terapia con anticuerpos, oligopéptidos o moléculas orgánicas. Las dosis adecuadas para cualquiera de los anteriores agentes coadministrados son aquéllas que se utilizan actualmente y se pueden reducir debido a la acción combinada (sinergia) del agente y el anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica.

Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, el médico elegirá la dosificación y el modo de administración de acuerdo con criterios conocidos. La dosis adecuada del anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica dependerá de la clase de enfermedad que deba tratarse, tal como se define anteriormente, la gravedad y el curso de la enfermedad, de si el anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica se administra con fines preventivos o terapéuticos, la terapia anterior, la historia clínica del paciente y su respuesta al anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica y la discreción del médico encargado. El anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica se administra adecuadamente al paciente una vez o en una serie de tratamientos. Preferentemente, el anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica se administra por infusión intravenosa o mediante inyecciones subcutáneas. Según la clase y gravedad de la enfermedad, una dosis inicial candidata para administrarla a un paciente es de aproximadamente entre 1 μg/kg y 50 mg/kg de peso corporal (por ejemplo, 0,1-15

mg/kg/dosis) de anticuerpo, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas o una infusión continua. Un ejemplo de pauta posológica comprende la administración de una dosis de carga inicial de unos 4 mg/kg, seguida de una dosis de mantenimiento semanal de aproximadamente 2 mg/kg del anticuerpo anti-TAT. No obstante, otras pautas posológicas también pueden ser útiles. Una dosis diaria típica podría oscilar entre aproximadamente 1 μg/kg y 100 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas durante varios días o un periodo más prolongado, según la afección, el tratamiento se mantiene hasta que se logra la supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. El progreso de esta terapia puede supervisarse fácilmente mediante métodos y ensayos convencionales basados en criterios que el médico u otras personas expertas en la materia conocen.

Además de la administración de la proteína del anticuerpo al paciente, la presente solicitud contempla la administración del anticuerpo mediante terapia génica. Esta administración del ácido nucleico que codifica el anticuerpo queda englobada en la expresión "administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo". Véase, por ejemplo, el documento WO96/07321 publicado el 14 de marzo de 1996 con relación al uso de la terapia génica para generar anticuerpos intracelulares.

Existen dos enfoques principales para introducir el ácido nucleico (opcionalmente contenido en un vector) en las células de un paciente: *in vivo* y *ex vivo.* En la administración *in vivo*, el ácido nucleico se inyecta directamente en el paciente, generalmente en el sitio donde se requiere el anticuerpo. Para el tratamiento *ex vivo*, las células del paciente se extraen, el ácido nucleico se introduce en estas células aisladas y las células modificadas se administran al paciente ya sea directamente o, por ejemplo, encapsuladas dentro de membranas porosas que se implantan en el paciente (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n°s 4.892.538 y 5.283.187). Existen diversas técnicas disponibles para introducir ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas varían dependiendo de si el ácido nucleico se transfiere *in vitro* a células en cultivo o *in vivo* a células del huésped pretendido. Las técnicas adecuadas para transferir *in vitro* el ácido nucleico a células de mamíferos incluyen el uso de liposomas, electroporación, microinyección, fusión celular, DEAE-dextrano, el método de precipitación con fosfato cálcico, etc. Un vector comúnmente utilizado para la administración *ex vivo* del gen es un vector retroviral.

Las técnicas actualmente preferentes para la transferencia *in vivo* de ácidos nucleicos incluyen la transfección con vectores virales (como un adenovirus, el virus del Herpes simple I o un virus asociado a un grupo adeno) y sistemas basados en lípidos (los lípidos útiles para la transferencia del gen con mediación de lípidos son DOTMA, DOPE y DC-Col, por ejemplo). Para

revisar los protocolos actualmente conocidos de la marcación de genes y la terapia génica, véase Anderson y col., Science 256:808-813 (1992). Véase también el documento WO 93/25673 y las referencias citadas en él.

Los anticuerpos anti-TAT de la invención pueden tener las distintas formas englobadas en la definición de "anticuerpo" de la presente memoria descriptiva. Por tanto, los anticuerpos incluyen anticuerpos de longitud completa o intactos, fragmentos de anticuerpos, variants de anticuerpos o aminoácidos con secuencia nativa, anticuerpos humanizados, quiméricos o de fusión, inmunoconjugados y fragmentos funcionales de los mismos. En los anticuerpos de fusión, una secuencia del anticuerpo se fusiona con una secuencia de un polipéptido heterólogo. Los anticuerpos pueden modificarse en la región Fc a fin de proporcionar las funciones efectoras deseadas. Tal como se comenta con más detalle en las secciones de la presente memoria descriptiva, con las regiones Fc apropiadas, el anticuerpo desnudo unido a la superficie celular puede inducir citotoxicidad, por ejemplo, a través de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), reclutando complementos en la citotoxicidad dependiente de complementos o algún otro mecanismo. Alternativamente, cuando se desee eliminar o reducir la función efectora, y a fin de minimizar los efectos secundarios o las complicaciones terapéuticas, se pueden utilizar otras regiones Fc.

En una realización, el anticuerpo compite para unirse, o se une de forma sustancial, al mismo epítopo que el de los anticuerpos de la invención. También se contemplan los anticuerpos que tengan las características biológicas de los anticuerpos anti-TAT presentes de la invención, incluyendo específicamente la acción *in vivo* sobre un tumor y cualquier inhibición de la proliferación celular o característica citotóxica.

Los métodos para producir los anteriores anticuerpos se describen con detalle en la presente memoria descriptiva.

Los anticuerpos anti-TAT, oligopéptidos y moléculas orgánicas presentes son útiles para tratar un cáncer que exprese un TAT o aliviar uno o más síntomas del cáncer en un mamífero. Dentro de estos cánceres se incluyen el de próstata, tracto urinario, pulmón, mama, colon y ovario, y más específicamente, el adenocarcinoma de próstata, los carcinomas de células renales, los adenocarcinomas colorrectales, los adenocarcinomas de pulmón, los carcinomas de células pulmonares escamosas y el mesotelioma pleural. Los cánceres engloban los cánceres metastásicos de cualquiera de las clases mencionadas. El anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica es capaz de unirse al menos a una porción de las células cancerosas que expresen un polipéptido TAT en el mamífero. En una realización preferente, el anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica es efectivo para destruir o matar las células tumorales que expresen un TAT o inhibir su crecimiento, *in vitro* o

in vivo, después de unirse a un polipéptido TAT en la célula. Entre estos anticuerpos se incluyen los anticuerpos anti-TAT desnudos (que no se conjugan con ningún agente). El rendimiento de los anticuerpos desnudos con propiedades citotóxicas o inhibitorias del crecimiento celular puede potenciarse aún más con la intervención de un agente citotóxico que les confiera mayor potencia para la destrucción de las células tumorales. Las propiedades citotóxicas pueden conferirse a un anticuerpo anti-TAT, por ejemplo, conjugándolo con un agente citotóxico, para formar un inmunoconjugado tal como se describe en la presente memoria descriptiva. El agente citotóxico o inhibidor del crecimiento es preferentemente una molécula pequeña. Las toxinas como la caliqueamicina o un maitansinoide y sus análogos o derivados son preferentes.

La invención ofrece una composición formada por un anticuerpo anti-TAT, un oligopéptido o una molécula orgánica de la invención y un vehículo. A fin de tratar el cáncer, las composiciones pueden administrarse al paciente que lo necesite, comprendiendo uno o más anticuerpos anti-TAT presentes, como un inmunoconjugado o el anticuerpo desnudo. En otra realización, las composiciones pueden comprender estos anticuerpos, oligopéptidos o moléculas orgánicas en combinación con otros agentes terapéuticos como los citotóxicos o inhibidores del crecimiento, incluyendo los quimioterapéuticos. La invención también proporciona formulaciones formadas por un anticuerpo anti-TAT, un oligopéptido o una molécula orgánica de la invención y un vehículo. En otra realización, la formulación es una formulación terapéutica que contiene un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto de la invención son los ácidos nucleicos aislados que codifican los anticuerpos anti-TAT. En este grupo se engloban los ácidos nucleicos que codifican las cadenas H y L, y especialmente los residuos de la región hipervariable, las cadenas que codifiquen el anticuerpo con secuencia nativa así como las variantes, modificaciones y versiones humanizadas del mismo.

La invención también ofrece métodos útiles para tratar un cáncer que exprese un polipéptido TAT o aliviar uno o más síntomas del cáncer en un mamífero, incluyendo la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo anti-TAT, un oligopéptido o una molécula orgánica al mamífero. Las composiciones terapéuticas de anticuerpos, oligopéptidos o moléculas orgánicas pueden administrarse a corto plazo (modo agudo), o de forma crónica o intermitente, tal como indique el médico. También se proporcionan métodos para la inhibición del crecimiento y eliminación de células que expresen un polipéptido TAT.

La invención también ofrece conjuntos y artículos fabricados que comprenden al menos un anticuerpo anti-TAT, un oligopéptido o una molécula orgánica. Los conjuntos que contienen anticuerpos anti-TAT, oligopéptidos o moléculas orgánicas pueden utilizarse, por ejemplo, en

pruebas de eliminación de células con un TAT, para la purificación o inmunoprecipitación del polipéptido TAT de las células. Por ejemplo, para el aislamiento y la purificación del TAT, el conjunto puede contener un anticuerpo anti-TAT, un oligopéptido o una molécula orgánica emparejado con microesferas (por ejemplo, microesferas de sefarosa). Los conjuntos con anticuerpos, oligopéptidos o moléculas orgánicas se pueden proporcionar para detectar y cuantificar un TAT *in vitro*, por ejemplo, en un ensayo ELISA o un "Western blot". Dicho anticuerpo, oligopéptido o molécula orgánica útil para la detección puede proporcionarse con un marcador, como un marcador fluorescente o un radiomarcador.

L. Artículos fabricados y conjuntos

Otra realización de la invención en un artículo fabricado que contiene materiales útiles para el tratamiento de un cáncer que exprese un anti-TAT. El artículo fabricado comprende un envase y una etiqueta o un prospecto en el mismo envase o asociado a él. Entre los envases adecuados se encuentran, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, etc. Los envases pueden estar hechos de diversos materiales, como vidrio o plástico. El envase contiene una composición que es efectiva en el tratamiento de la afección cancerosa y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el envase puede ser una bolsa para solución intravenosa o un vial con un tapón que una aguja hipodérmica pueda perforar). Al menos un agente activo de la composición es un anticuerpo anti-TAT, un oligopéptido o una molécula orgánica de la invención. La etiqueta o el prospecto indica que la composición sirve para el tratamiento del cáncer. Además, la etiqueta o el prospecto incluye instrucciones para administrar al paciente con cáncer la composición del anticuerpo, el oligopéptido o la molécula orgánica. Adicionalmente, el artículo fabricado puede comprender un segundo envase que contenga un tampón farmacéuticamente aceptable, como agua bacteriostática para inyección (BWF1), una solución salina tamponada con fosfato, una solución de Ringer y una solución de dextrosa. También puede incluir otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

También se proporcionan conjuntos útiles para diversos propósitos, por ejemplo, ensayos de eliminación de células que expresen un TAT o la purificación o inmunoprecipitación de un polipéptido TAT de las células. Para el aislamiento y la purificación del TAT, el conjunto puede contener un anticuerpo anti-TAT, un oligopéptido o una molécula orgánica emparejado con microesferas (por ejemplo, microesferas de sefarosa). Los conjuntos con anticuerpos, oligopéptidos o moléculas orgánicas se pueden proporcionar para detectar y cuantificar un polipéptido TAT *in vitro*, por ejemplo, en un ensayo ELISA o un "Western blot". Como ocurre con el artículo fabricado, el conjunto comprende un envase y una etiqueta o un prospecto en el mismo envase o asociado a él.

El envase contiene una composición que comprende al menos un anticuerpo anti-TAT, un oligpéptido o una molécula orgánica de la invención. Se pueden incluir otros envases adicionales que contengan, por ejemplo, diluyentes, tampones y anticuerpos de control. La etiqueta o el prospecto pueden proporcionar una descripción de la composición, así como instrucciones para el uso previsto, ya sea in vitro o diagnóstico.

M. Usos de los polipéptidos TAT y los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos TAT

Las secuencias de nucleótidos (o su complemento) que codifican polipéptidos TAT tienen diversas aplicaciones en el campo de la biología molecular, incluyendo su uso como sondas de hibridación, en el mapeado de cromosomas y genes y la generación de sondas antisentido de ARN y ADN. El ácido nucleico que codifica un TAT también será útil para preparar polipéptidos TAT mediante las técnicas de recombinación descritas en la presente memoria descriptiva, pudiéndose utilizar dichos polipéptidos TAT para, por ejemplo, preparar anticuerpos anti-TAT, tal como se describe en la presente memoria descriptiva.

El gen de un TAT con secuencia nativa y de longitud completa, o porciones del mismo, se puede utilizar como sonda de hibridación para una biblioteca de ADNc a fin de aislar el ADNc de un TAT de longitud completa u otras clases de ADNc (por ejemplo, los que codifiquen las variantes de un TAT que se produzca de forma natural o un TAT de otras especies) que tengan el porcentaje deseado de identidad de secuencia de la secuencia nativa del TAT detallada en la presente memoria descriptiva. Opcionalmente, la longitud de la sonda será de entre 20 y 50 bases. Las sondas de hibridación pueden derivarse de regiones al menos parcialmente nuevas de la secuencia nativa de nucleótidos de longitud completa que pueden determinarse sin excesiva experimentación o a partir de secuencias genómicas incluyendo promotores, elementos potenciadores e intrones de un TAT de secuencia nativa. Por ejemplo, un método de exploración comprenderá el aislamiento de la región codificadora del gen del TAT usando la secuencia de ADN conocida para sintetizar una sonda seleccionada de unas 40 bases. Las sondas de hibridación pueden marcarse con distintos marcadores, incluyendo radionucleótidos como ^{32}P o ^{35}S, o marcadores enzimáticos, como alcalina fosfatasa emparejada con la sonda a través de sistemas de emparejamiento de avidina/biotina. Las sondas marcadas que tengan una secuencia complementaria de la del gen del TAT de la presente invención pueden utilizarse para explorar bibliotecas de ADNc humano o ADN o ARNm genómico a fin de determinar con qué miembros de dichas bibliotecas se hibrida la sonda. Las técnicas de hibridación se describen más adelante con mayor detalle en la sección de Ejemplos. Cualquier secuencia EST detallada en la presente solicitud puede emplearse de forma similar a las sondas, usando los métodos detallados en la presente memoria descriptiva.

Otros fragmentos útiles de los ácidos nucleicos que codifiquen un TAT incluyen oligonucleótidos antisentido o sentido que comprendan una secuencia de ácidos nucleicos de una sola hebra (ya sea de ARN o ADN) capaces de unirse a secuencias objetivo de ARNm del TAT (sentido) o ADN del TAT (antisentido). De acuerdo con la presente invención, los oligonucleótidos antisentido o sentido comprenden un fragmento de la región codificadora del ADN del TAT. Dicho fragmento comprende por lo general al menos 14 nucleótidos, preferentemente entre 14 y 30. La capacidad para derivar un oligonucleótido antisentido o sentido, sobre la base de una secuencia de ADNc que codifique una proteína determinada, se describe en, por ejemplo, Stein y Cohen (Cancer Res. 48:2659, 1988) y van der Krol y col. (BioTechniques 6:958, 1988).

La unión de oligonucleótidos antisentido o sentido a secuencias objetivo de ácidos nucleicos da lugar a la formación de dúplexs que bloquean la transcripción o traducción de la secuencia objetivo a través de uno de diversos medios, incluyendo la degradación potenciada de los dúplexs, la finalización prematura de la transcripción o traducción u otros medios. La presente invención engloba todos estos métodos. Los oligonucleótidos antisentido pueden de este modo utilizarse para bloquear la expresión de las proteínas de un TAT, las cuales pueden intervenir en la inducción del cáncer en mamíferos. Los oligonucleótidos antisentido o sentido también comprenden oligonucleótidos que tengan columnas de azúcar-fosfodiéster modificadas (u otros enlaces de azúcares, como los descritos en el documento WO 91/06629), siendo dichos enlaces de azúcares resistentes a las nucleasas endógenas. Estos oligonucleótidos con enlaces de azúcares resistentes son estables *in vivo* (es decir, capaces de resistir la degradación enzimática), pero retienen la especificidad de la secuencia para poder unirse a las secuencias de nucleótidos objetivo.

Los sitios intragénicos preferentes para unirse a un antisentido incluyen la región que incorpora el codón de comienzo de la traducción/inicio (5'-AUG/5'-ATG) o el de finalización/detención (5'-UAA, 5'-UAG y 5-UGA/5'-TAA, 5'-TAG y 5'-TGA) de la estructura de lectura abierta (ORF) del gen. Estas regiones se refieren a una porción del ARNm o el gen que abarca entre 25 y 50 nucleótidos contiguos en cualquier dirección (es decir, 5' o 3') desde un codón de comienzo o finalización de la traducción. Otras regiones preferentes para la unión a un antisentido incluyen: intrones; exones; empalmes de intrones y exones; la estructura de lectura abierta (ORF) o "región codificadora", que es la región que hay entre el codón de comienzo de la traducción y el de finalización de ésta; el extremo 5' de un ARNm que comprende un residuo de guanosina N7-metilada unido al residuo 5' más lejano del ARNm a través de un enlace 5'-5' trifosfato, e incluye la estructura en sí del extremo 5' así como los primeros 50 nucleótidos adyacentes al extremo; la región del extremo 5' sin traducir (5'UTR) y la porción de un ARNm en la

dirección 5' desde el codón de comienzo de la traducción que incluye, por tanto, los nucleótidos que hay entre el sitio del extremo 5' y el codón de comienzo de la traducción de un ARNm o los nucleótidos correspondientes del gen; y la región del extremo 3' sin traducir (3'UTR) y la porción de un ARNm en la dirección 3' desde el codón de finalización de la traducción que incluye, por tanto, los nucleótidos que hay entre el codón de finalización de la traducción y el extremo 3' de un ARNm o los nucleótidos correspondientes del gen.

Entre los ejemplos específicos de compuestos antisentido preferentes útiles para inhibir la expresión de las proteínas de un TAT se incluyen los oligonucléotidos que contengan estructuras modificadas o enlaces internucleósidos no naturales. Los oligonucleótidos con estructuras modificadas incluyen aquéllos que retienen un átomo de fósforo en la estructura y los que carecen de dicho átomo. Para los propósitos de esta especificación, y como a veces se ha hecho referencia en la materia, los oligonucleótidos modificados que carezcan de un átomo de fósfoto en sus estructuras internucleósidas también se pueden considerar como oligonucleósidos. Las estructuras de oligonucleótidos modificadas preferentes incluyen, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotri-ésteres, metil y otros fosfonatos alquilo incluyendo fosfonatos 3'-alquileno, fosfonatos 5'-alquileno y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos incluyendo fosforamidato 3'-amino y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres, selenofosfatos y borano-fosfatos con enlaces 3'-5' normales, los análogos de éstos con enlaces 2'-5' y los que tengan polaridad invertida, siendo uno o más de los enlaces internucleótidos un enlace 3' a 3', 5' a 5' o 2' a 2'. Los oligonucleótidos con polaridad invertida comprenden un enlace único 3' a 3' en el enlace internucleótido en la posición 3' más lejana, es decir, un solo residuo de nucleósido invertido que puede ser abásico (la nucleobase falta o presenta un grupo hidróxilo en su lugar). También se incluyen diversas sales, sales mixtas y formas ácidas libres. Las patentes representativas de EE.UU. que muestran la preparación de enlaces que contienen fósforo incluyen, aunque sin limitarse a, las patentes de EE.UU. n^{os}: 3.687.808; 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.196; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.306; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361; 5.194.599; 5.565.555; 5.527.899; 5.721.218; 5.672.697 y 5.625.050, cada una de las cuales se incorpora a la presente memoria descriptiva a modo de referencia.

Las estructuras de oligonucleótidos modificadas preferentes que carecen de un átomo de fósforo están formadas por enlaces internucleósidos alquilo o cicloalquilo de cadena corta, enlaces de heteroátomos mixtos e internucleósidos alquilo o cicloalquilo o uno o más enlaces

internucleósidos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Éstas incluyen las que tienen enlaces de morfolino (formados en parte desde la porción de azúcar de un nucleósido); estructuras de siloxano; estructuras de sulfuro, sulfóxido y sulfona; estructuras de formacetil y tioformacetil; estructuras de metileno formacetil y tioformacetil; estructuras de riboacetil; estructuras que contengan alqueno; estructuras de sulfamato; estructuras de metileneimino y metilenehidrazino; estructuras de sulfonato y sulfonamida; estructuras de amida y otras que tengan N, O y S mezclado y partes del componente CH.sub.2. Las patentes representativas de EE.UU. que muestran la preparación de dichos oligonucleósidos incluyen, aunque sin limitarse a, las patentes de EE.UU. n^{os}: 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134; 5.216.141; 5.235.033; 5.264.562; 5.264.564; 5.405.938; 5.434.257; 5.466.677; 5.470.967; 5.489.677; 5.541.307; 5.561.225; 5.596.086; 5.602.240; 5.610.289; 5.602.240; 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070; 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437; 5.792.608; 5.646.269 y 5.677.439, cada una de las cuales se incorpora a la presente memoria descriptiva a modo de referencia.

En otros oligonucleósidos antisentido preferentes, el enlace tanto de azúcares como internucleósidos, es decir, la estructura, de las unidades de nucleótidos se sustituye por grupos nuevos. Las unidades base se mantienen para la hibridación con un compuesto objetivo apropiado de ácidos nucleicos. Dicho compuesto oligomérico contiene un elemento que mimetiza a los oligonucleótidos que ha demostrado tener excelentes propiedades de hibridación, al cual se hace referencia como un ácido nucleico péptido (PNA). En los compuestos de PNA, la estructura de azúcares de un oligonucleótido se sustituye por una estructura que contiene amida, en particular aminoetilglicina. Las nucleobases se retienen y se unen, directa o indirectamente, a átomos de aza-nitrógeno de la porción de amida de la estructura. Las patentes representativas de EE.UU. que muestran la preparación de compuestos de PNA incluyen, aunque sin limitarse a, las patentes de EE.UU. n^{os}: 5.539.082; 5.714.331 y 5.719.262, cada una de las cuales se incorpora a la presente memoria descriptiva a modo de referencia. En Nielsen y col., Science, 1991, 254, 1497-1500, pueden encontrarse más detalles sobre los compuestos de PNA.

Los oligonucleótidos antisentido preferentes incorporan estructuras de fosforotioato y/o heteroátomos, y en particular -CH_2-NH-O-CH_2-, -CH_2-N(CH_3)-O-CH_2- [conocida como una estructura de metileno (metilimino) o MMI], -CH_2-O-N(CH_3)-CH_2-, -CH_2-N(CH_3)-N(CH_3)-CH_2- y -O-N(CH_3)-CH_2-CH_2- [donde la estructura nativa de fosfodiéster se representa como -O-P-O-CH_2-], descrita en la patente de EE.UU. nº 5.489.677 anteriormente mencionada, y las estructuras de amida de la patente de EE.UU. nº 5.602.240 anteriormente mencionada. También son preferentes los

oligonucleótidos que tengan estructuras de morfolino descritas en la patente de EE.UU. nº 5.034.506 anteriormente mencionada.

Los oligonucleótidos modificados también pueden contener una o más porciones de azúcares sustituidas. Los oligonucleótidos preferentes comprenden uno de los siguientes elementos en la posición 2': OH; F; O-alquilo, S-alquilo o N-alquilo; O-alquenilo, S-alquinilo o N-alquenilo; O-alquinilo, S-alquinilo o N-alquinilo; u O-alquilo-O-alquilo, donde el alquilo, el alquenilo y el alquinilo pueden ser C_1 a C_{10} alquilo o C_2 a C_{10} alquenilo y alquinilo sustituidos o sin sustituir. Particularmente preferentes son $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$, $O(CH_2)_nOCH_3$, $O(CH_2)_nNH_2$, $O(CH_2)_nCH_3$, $O(CH_2)_nONH_2$ y $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3)]_2$, donde los valores n y m oscilan entre 1 y 10. Otros oligonucleótidos antisentido preferentes comprenden uno de los siguientes elementos en la posición 2': C_1 a C_{10} alquilo inferior, alquilo, alquenilo, alquinilo, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo u O-aralquilo sustituido inferior, SH, SCH_3, OCN, Cl, Br, CN, CF_3, OCF_3, $SOCH_3$, SO_2 CH_3, ONO_2, NO_2, N_3, NH_2, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, silil sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo de indicadores, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas o farmacodinámicas de un oligonucleótido u otros sustituyentes con propiedades similares. Una modificación preferente incluye 2'-metoxietoxi (2'-O-$CH_2CH_2OCH_3$, conocido también como 2'-O-(2-metoxietil) o 2'-MOE) (Martin y col., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504) es decir, un grupo alcoxialcoxi. Otra modificación preferente incluye 2'-dimetilaminooxietoxi, es decir, un grupo $O(CH_2)_2ON(CH_3)_2$, conocido también como 2'-DMAOE, tal como se describe más adelante en los ejemplos de la presente memoria descriptiva, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (conocido también en la materia como 2'-O-dimetilaminoetoxietil o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O-CH_2-O-CH_2-N(CH_2).

Otra modificación preferente incluye ácidos nucleicos bloqueados (LNA) en que el grupo 2'-hidroxil está enlazado al átomo de carbono 3' o 4' del anillo de azúcares, formando de ese modo una porción de azúcares bicíclica. El enlace es preferentemente un grupo metelino $(-CH_2-)_n$ que establece un puente con el átomo de oxígeno 2' y el de carbono 4', donde el valor n es 1 ó 2. Los LNA y su preparación se describen en los documentos WO 98/39352 y WO 99/14226.

Otras modificaciones preferentes incluyen 2'-metoxi (2'-O-CH_3), 2'-aminopropoxi (2'-$OCH_2CH_2CH_2$ NH_2), 2'-allilo (2'-CH_2-CH=CH_2), 2'-O-allilo (2'-O-CH_2-CH=CH_2) y 2'-fluoro (2'-F). La modificación 2' puede ser en la posición arabino (ascendente) o ribo (descendente). Una modificación 2'-arabino preferente es 2'-F. También pueden realizarse modificaciones similares en otras posiciones del oligonucleótido, particularmente en la posición 3' del azúcar del nucleótido terminal 3' o en oligonucleótidos con enlaces 2'-5' y la posición 5' del nucleótido terminal 5'. Los

oligonucleótidos también pueden tener elementos que mimetizan a los azúcares, como porciones de ciclobutilo en lugar del azúcar pentofuranosil. Las patentes representativas de EE.UU. que muestran la preparación de estas estructuras de azúcares modificadas incluyen, aunque sin limitarse a, las patentes de EE.UU. n^{os}: 4.981.957, 5.118.800, 5.319.080, 5.359.044, 5.393.878, 5.446.137, 5.466.786, 5.514.785, 5.519.134, 5.567.811, 5.576.427, 5.591.722, 5.597.909, 5.610.300, 5.627.053, 5.639.873, 5.646.265, 5.658.873, 5.670.633, 5.792.747 y 5.700.920, cada una de las cuales se incorpora íntegramente en la presente memoria descriptiva a modo de referencia.

Los oligonucleótidos también pueden incluir modificaciones o sustituciones de las nucleobases (a las cuales se hace a menudo referencia en la materia como simplemente "bases"). Tal como se emplean en la presente memoria descriptiva, las nucleobases "sin modificar" o "naturales" incluyen las bases de purina adenina (A) y guanina (G) y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las nucleobases modificadas incluyen otras nucleobases sintéticas y naturales como 5-metilcitosina (5-me-C), 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metil y otros derivados alquilo de adenina y guanina, 2-propil y otros derivados alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil (-C≡C-CH_3 o -CH_2-C≡CH) uracilo y citosina y otros derivados alquinilo de bases de pirimidina, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (seudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquil, 8-hidroxil y otras adeninas y guaninas 8- sustituidas, 5-halo particularmente 5-bromo, 5-trifluorometil y otros uracilos y citosinas 5- sustituidos, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-amino-adenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-desazaguanina y 7-desazaadenina y 3-desazaguanina y 3-desazaadenina. Otras nucleobases modificadas incluyen pirimidinas tricíclicas como fenoxazina citidina(1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxazina-2(3H)-uno), fenotiazina citidina (1H-pirimido[5,4-b][1,4]benzotiazina-2(3H)-uno), abrazaderas G como una fenoxazina citidina sustituida (por ejemplo, 9-(2-aminoetoxi)-H-pirimido[5,4-b][1,4]benzoxazina-2(3H)-uno), carbazola citidina (2H-pirimido[4,5-b]indol-2-uno), piridoindola citidina (H-pirido[3',2':4,5]pirrolo[2,3-d]pirimidín-2-uno). Las nucleobases modificadas también pueden incluir aquéllas en que la base de purina o pirimidina se sustituya por otros heterociclos, por ejemplo, 7-desaza-adenina, 7-desazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Otras nucleobases incluyen las detalladas en la patente de EE.UU. nº 3.687.808, las detalladas en The Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering (La Enciclopedia Concisa de la Ciencia y la Ingeniería de Polímeros), páginas 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990, y las detalladas en Englisch y col., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613. Algunas de estas nucleobases son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos

oligoméricos de la invención. Éstas incluyen pirimidinas 5- sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas, incluyendo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha demostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad de los dúplex de ácidos nucleicos en 0,6-1,2 grados. C. (Sanghvi y col., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Ratón, 1993, páginas 276-278) y son sustituciones de bases preferentes, incluso más particularmente cuando se combinan con modificaciones del azúcar 2'-O-metoxietilo. Las patentes representativas de EE.UU. que muestran la preparación de nucleobases modificadas incluyen, aunque sin limitarse a: la patente de EE.UU. nº 3.687.808, así como las patentes de EE.UU. nºs: 4.845.205, 5.130.302, 5.134.066, 5.175.273, 5.367.066, 5.432.272, 5.457.187, 5.459.255, 5.484.908, 5.502.177, 5.525.711, 5.552.540, 5.587.469, 5.594.121, 5.596.091, 5.614.617, 5.645.985, 5.830.653, 5.763.588, 6.005.096, 5.681.941 y 5.750.692, cada una de las cuales se incorpora en la presente memoria descriptiva a modo de referencia.

Otra modificación de los oligonucleótidos antisentido consiste en enlazar químicamente con el oligonucleótido una o más porciones o conjugados que potencien su actividad y distribución o absorción celular. Los compuestos de la invención pueden incluir grupos de conjugados unidos de forma covalente a grupos funcionales como los grupos hidroxil primarios o secundarios. Los grupos de conjugados de la invención incluyen intercaladores, moléculas indicadoras, poliaminas, poliamidas, polietilenglicoles, poliéteres y grupos que potencien las propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas de los oligómeros. Los grupos de conjugados típicos incluyen colesteroles, lípidos, lípidos cationes, fosfolípidos, fosfolípidos catiónicos, biotina, fenacina, folato, fenantridina, antraquinona, acridina, fluoresceínas, rodaminas, coumarinas y colorantes. En el contexto de la presente invención, los grupos que potencian las propiedades farmacodinámicas incluyen aquéllos que mejoran la absorción y resistencia a la degradación de los oligómeros y/o refuerzan la hibridación con ARN específica en la secuencia. En el contexto de la presente invención, los grupos que potencian las propiedades farmacocinéticas incluyen aquéllos que mejoran la absorción, la distribución, el metabolismo o la excreción de los oligómeros. Las porciones de conjugados incluyen, aunque sin limitarse a, porciones de lípidos como una porción de colesterol (Letsinger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553-6556), ácido cólico (Manoharan y col., Bioorg. Med. Chem. Let., 1994, 4, 1053-1060), un tioéter, por ejemplo, hexil-S-tritiltiol (Manoharan y col., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306-309; Manoharan y col., Bioorg. Med. Chem. Let., 1993, 3, 2765-2770), un tiocolesterol (Oberhauser y col., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538), una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecandiol o undecil (Saison-Behmoaras y col., EMBO J., 1991, 10, 1111-1118; Kabanov y col., FEBS Lett., 1990, 259, 327-330; Svinarchuk y col., Biochimie,

251

1993, 75, 49-54), un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o trietil-amonio 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato (Manoharan y col., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654; Shea y col., Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783), una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan y col., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973), o ácido acético de adamantano (Manoharan y col., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654), una porción de palmitil (Mishra y col., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237) o una porción de octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol. Los oligonucleótidos de la invención también pueden conjugarse con sustancias de fármacos activos, por ejemplo, aspirina, warfarina, fenilbutazona, ibuprofeno, suprofeno, fenbufeno, quetoprofeno, (S)-(+)-pranoprofeno, carprofeno, dansilsarcosina, ácido 2,3,5-triiodobenzoico, ácido flufenámico, ácido folínico, una benzotiadiazida, clorotiazida, una diazepina, indometicina, un barbitúrico, una cefalosporina, un fármaco sulfa, un antidiabético, un antibacterial o un antibiótico. Los conjugados oligonucleótido-fármaco y su preparación se describen en la solicitud Ser. de la patente de EE.UU. nº 09/334.130 (presentada el 15 de junio de 1999) y las patentes de EE.UU. n^{os}: 4.828.979; 4.948.882; 5.218.105; 5.525.465; 5.541.313; 5.545.730; 5.552.538; 5.578.717, 5.580.731; 5.580.731; 5.591.584; 5.109.124; 5.118.802; 5.138.045; 5.414.077; 5.486.603; 5.512.439; 5.578.718; 5.608.046; 4.587.044; 4.605.735; 4.667.025; 4.762.779; 4.789.737; 4.824.941; 4.835.263; 4.876.335; 4.904.582; 4.958.013; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.082.830; 5.112.963; 5.214.136; 5.245.022; 5.254.469; 5.258.506; 5.262.536; 5.272.250; 5.292.873; 5.317.098; 5.371.241, 5.391.723; 5.416.203, 5.451.463; 5.510.475; 5.512.667; 5.514.785; 5.565.552; 5.567.810; 5.574.142; 5.585.481; 5.587.371; 5.595.726; 5.597.696; 5.599.923; 5.599.928 y 5.688.941, cada una de las cuales se incorpora en la presente memoria descriptiva a modo de referencia.

No es necesario que todas las posiciones de un compuesto determinado estén modificadas de forma uniforme y, de hecho, más de una de las modificaciones mencionadas anteriormente puede incorporarse a un solo compuesto o incluso un solo nucleósido dentro de un oligonucleótido. La presente invención también incluye compuestos antisentido que son compuestos quiméricos. En el contexto de la presente invención, los compuestos antisentido "quiméricos" o "quimeras", son compuestos antisentido, particularmente de oligonucleótidos, que contienen dos o más regiones químicamente distintas, cada una de las cuales está compuesta al menos por una unidad monómera, es decir, un nucleótido en el caso de un compuesto de oligonucleótidos. Por lo general, estos oligonucleótidos contienen al menos una región donde el oligonucléotido se modifica a fin de adquirir mayor resistencia a la degradación de la nucleasa, mayor absorción celular y/o mayor afinidad de unión para el ácido nucleico objetivo. Una región adicional del oligonucleótido puede

servir como sustrato de enzimas capaces de escindir hibridos de ARN:ADN o ARN:ARN. Por ejemplo, la RNasa H es una endonucleasa celular que escinde la hebra de ARN de un dúplex ARN:ADN. Por tanto, la activación de la RNasa H da lugar a la escisión del objetivo de ARN y, de ese modo, potencia en gran medida la eficiencia por parte de los oligonucleótidos de la inhibición de la expresión génica. En consecuencia, a menudo pueden obtenerse resultados comparables con oligonucleótidos más cortos cuando se utilicen oligonucleótidos quiméricos, en comparación con los desoxioligonucleótidos de fosforotioato que hibridan con la misma región objetivo. Los compuestos antisentido quiméricos de la invención pueden formarse como estructuras compuestas de dos o más oligonucleótidos, oligonucleótidos modificados, oligonucleósidos y/o elementos que mimetizan a los oligonucleótidos tal como se ha descrito anteriormente. Los oligonucleótidos antisentido quiméticos preferentes incorporan al menos un azúcar 2' modificado (preferentemente 2'-O-$(CH_2)_2$-O-CH_3) en el terminal 3' a fin de conferir resistencia a la nucleasa y una región con al menos 4 azúcares 2'-H contiguos a fin de conferir la actividad de la RNasa H. En la materia también se ha hecho referencia a estos compuestos como híbridos o "gapmers". Los "gapmers" preferentes tienen una región de azúcares 2' modificados (preferentemente 2'-O-$(CH_2)_2$-O-CH_3) en los terminales 3' y 5', separados al menos por una región que tenga al menos 4 azúcares 2'-H contiguos, y preferentemente incorporan enlaces de estructuras de fosforotioato. Las patentes representativas de EE.UU. que muestran la preparación de estas estructuras híbridas incluyen, aunque sin limitarse a, las patentes de EE.UU. n°s 5.013.830; 5.149.797; 5.220.007; 5.256.775; 5.366.878; 5.403.711; 5.491.133; 5.565.350; 5.623.065; 5.652.355; 5.652.356 y 5.700.922, cada una de las cuales se incorpora íntegramente en la presente memoria descriptiva a modo de referencia.

Los compuestos antisentido utilizados de acuerdo con la presente invención pueden realizarse, de forma conveniente y rutinaria, a través de la técnica bien conocida de síntesis de fase sólida. Diversos fabricantes, incluyendo, por ejemplo, Applied Biosystems (Foster City, Calif.), comercializan los equipos para dicha clase de síntesis. También puede emplearse, adicional o alternativamente, cualquier otro medio conocido en la materia para efectuar esta síntesis. Es habitual usar técnicas similares para preparar oligonucleótidos como los fosforotioatos y los derivados alquilados. Los compuestos de la presente invención también pueden mezclarse, encapsularse, conjugarse o asociarse de cualquier otro modo a otras moléculas, estructuras de moléculas o mezclas de compuestos, como por ejemplo, liposomas, moléculas sobre las que actúen receptores, y formulaciones orales, rectales, tópicas o de otra clase, para ayudar en los procesos de captación, distribución y/o absorción. Las patentes representativas de EE.UU. que muestran la preparación de estas formulaciones que sirven para ayudar en los procesos de captación, distribución y/o absorción

incluyen, aunque sin limitarse a, las patentes de EE.UU. n°s 5.108.921; 5.354.844; 5.416.016; 5.459.127; 5.521.291; 5.543.158; 5.547.932; 5.583.020; 5.591.721; 4.426.330; 4.534.899; 5.013.556; 5.108.921; 5.213.804; 5.227.170; 5.264.221; 5.356.633; 5.395.619; 5.416.016; 5.417.978; 5.462.854; 5.469.854; 5.512.295; 5.527.528; 5.534.259; 5.543.152; 5.556.948; 5.580.575 y 5.595.756, cada una de las cuales se incorpora en la presente memoria descriptiva a modo de referencia.

Otros ejemplos de oligonucleótidos sentido o antisentido incluyen aquéllos que se enlazan de forma covalente a porciones orgánicas, como las descritas en el documento WO 90/10048, y otras porciones que aumentan la afinidad del oligonucleótido para una secuencia objetivo de ácidos nucleicos, como la poli-(L-lisina). Además, se pueden unir agentes intercaladores, como la elipticina, y alquilantes o complejos metálicos a oligonucleótidos sentido o antisentido a fin de modificar sus especificidades de unión para la secuencia objetivo de nucleótidos.

Los oligonucleótidos antisentido o sentido pueden introducirse en una célula que contenga la secuencia objetivo de ácidos nucleicos a través de cualquier método de transferencia génica, por ejemplo, transfección de ADN con mediación de $CaPO_4$, electroporación o utilizando vectores de transferencia génica como el virus Epstein-Barr. En un procedimiento preferente, un oligonucleótido antisentido o sentido se inserta en un vector retroviral adecuado. Una célula que contenga la secuencia objetivo de ácidos nucleicos se pone en contacto con el vector retroviral recombinante, ya sea *in vivo* o *ex vivo*. Los vectores retrovirales adecuados incluyen, aunque sin limitarse a, los derivados del retrovirus murino M-MuLV, N2 (un retrovirus derivado de M-MuLV) o los vectores de copia doble designados como DCT5A, DCT5B y DCT5C (véase el documento WO 90/13641).

Los oligonucleótidos sentido o antisentido también pueden introducirse en una célula que contenga la secuencia objetivo de nucleótidos formando un conjugado con una molécula que se una a un ligando, tal como se describe en el documento WO 91/04753. Las moléculas adecuadas que se unen a un ligando incluyen, aunque sin limitarse a, receptores de superficie celular, factores del crecimiento, otras citoquinas u otros ligandos que se unan a receptores de superficie celular. Preferentemente, la conjugación de la molécula que se una a un ligando no interfiere sustancialmente en su capacidad para unirse a su molécula o receptor correspondiente o bloquear la entrada en la célula del oligonucleótido sentido o antisentido o su versión conjugada.

Alternativamente, un oligonucleótido sentido o antisentido puede introducirse en una célula que contenga la secuencia objetivo de ácidos nucleicos formando un complejo oligonucleótido-lípido, tal como se describe en el documento WO 90/10448. Este complejo oligonucleótido sentido o antisentido-lípido se disocia preferentemente dentro de la célula mediante una lipasa endógena.

La longitud de las moléculas de ARN o ADN antisentido o sentido es por lo general de alrededor de 5 nucleótidos, y alternativamente de al menos alrededor de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990 ó 1.000 nucleótidos, donde, en este contexto, el término "alrededor de" significa la longitud de referencia de la secuencia de nucleótidos ±10%.

Las sondas también pueden emplearse en técnicas de PCR para generar un grupo de secuencias para identificar secuencias codificadoras de TAT estrechamente relacionadas.

Las secuencias de nucleótidos que codifican un TAT también se pueden utilizar para construir sondas de hibridación para mapear el gen que codifique ese TAT y realizar el análisis genético de individuos con trastornos genéticos. Las secuencias de nucleótidos proporcionadas en la presente memoria descriptiva pueden mapearse con un cromosoma y regiones específicas de un cromosoma mediante técnicas conocidas, como la hibridación *in situ*, el análisis de enlaces para compararlos con marcadores cromosomáticos conocidos y la exploración de la hibridación con bibliotecas.

Cuando las secuencias codificadoras para un TAT codifican una proteína que se una a otra proteína (por ejemplo, donde el TAT sea un receptor), el TAT puede utilizarse en ensayos para identificar las otras proteínas o moléculas que intervengan en la interacción de la unión. A través de estos métodos, se pueden identificar los inhibidores de la interacción de la unión entre el receptor y el ligando. Las proteínas que intervienen en estas interacciones de unión también se pueden usar para explorar inhibidores de péptidos o moléculas pequeñas o agonistas de la interacción de la unión. Además, el TAT receptor puede emplearse para aislar ligandos correlativos. Se pueden designar ensayos de exploración para encontrar compuestos principales que imiten la actividad biológica de un TAT nativo o un receptor para un TAT. Dichos ensayos de exploración incluirán ensayos capaces de establecer una exploración de alto rendimiento de bibliotecas de productos químicos, con lo cual serán particularmente adecuados para identificar candidatos fármacos de molécula pequeña. Las moléculas pequeñas contempladas incluyen compuestos sintéticos orgánicos e inorgánicos. Los ensayos pueden realizarse en diversos formatos, incluyendo ensayos de unión

proteína-proteína, ensayos de exploración bioquímica, inmunoensayos y ensayos basados en células, que están bien caracterizados en la materia.

Los ácidos nucleicos que codifican un TAT o sus formas modificadas también pueden utilizarse para generar ya sea animales transgénicos o "con bloqueo" (*"knock out"*), los cuales, a su vez, son útiles para desarrollar y explorar reagentes terapéuticamente útiles. Un animal transgénico (por ejemplo, un ratón o una rata) es un animal que posee células con un transgén que se insertó en el animal o un ancestro de éste en una etapa prenatal, por ejemplo, embrionaria. Un transgén es un ADN que se integra al genoma de una célula a partir de la cual se desarrolla un animal transgénico. En una realización, el ADNc que codifica un TAT puede utilizarse para clonar un ADN genómico que codifica un TAT, de acuerdo con las técnicas establecidas y las secuencias genómicas utilizadas para generar animales transgénicos que posean células que expresen el ADN que codifica un TAT. Los métodos para general animales transgénicos, en particular ratones o ratas, han devenido convencionales en la materia y se describen, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n°s 4.736.866 y 4.870.009. Generalmente, a fin de incorporar el transgén de un TAT, se realizaría una acción sobre células particulares con potenciadores específicos para tejidos concretos. Los animales transgénicos que incluyen una copia de un transgén que codifica un TAT insertado en la línea germinal del animal en una etapa embrionaria pueden utilizarse para examinar el efecto del aumento de la expresión del ADN que codifica un TAT. Dichos animales pueden utilizarse como animales de prueba para reagentes que se supone protegen contra, por ejemplo, afecciones patológicas asociadas a su sobreexpresión. Según esta faceta de la invención, se trata a un animal con el reagente, y una incidencia reducida de la afección patológica, en comparación con animales sin tratar que porten el transgén, indicaría una intervención terapéutica potencial para la afección patológica.

Alternativamente, los homólogos no humanos de un TAT pueden utilizarse para construir un animal "con bloqueo" provocado por un TAT que tenga un gen defectuoso o alterado que codifique dicho TAT como resultado de una recombinación homóloga entre el gen endógeno que codifique el TAT y el ADN genómico alterado que codifica un TAT insertado en una célula madre embrionaria del animal. Por ejemplo, el ADNc que codifica el TAT puede utilizarse para clonar ADN genómico que codifique el TAT, de acuerdo con las técnicas establecidas. Una parte del ADN genómico que codifica el TAT puede eliminarse o reemplazarse por otro gen, como por ejemplo, un gen que codifique un marcador seleccionable que puede utilizarse para supervisar la integración. Generalmente, varias kilobases de ADN flanqueador sin alterar (en los extremos 5' y 3') se incluyen en el vector [véase, por ejemplo, Thomas y Capecchi, Cell, 51:503 (1987) para obtener una descripción de los vectores de recombinación homóloga]. El vector se introduce en una línea de

células madre embrionarias (por ejemplo, por electroporación) y se seleccionan las células en las que el ADN insertado se haya recombinado homólogamente con el ADN endógeno [véase, por ejemplo, Li y col., Cell, 69:915 (1992)]. A continuación, las células seleccionadas se inyectan en un blastocito de un animal (por ejemplo, una rata o un ratón) para formar quimeras de agregación [véase, por ejemplo, Bradley, en *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), páginas 113-152]. Luego puede implantarse un embrión quimérico en una hembra nodriza pseudopreñada apropiada y hacer que el embrión llegue a término para crear un animal "con bloqueo". La progenie que tiene el ADN recombinado homólogamente en sus células germinales puede identificarse mediante técnicas estándares y utilizarse para criar animales cuyas células, en su totalidad, contengan el ADN recombinado homólogamente. Los animales "con bloqueo" pueden caracterizarse, por ejemplo, por su capacidad para defenderse contra determinadas afecciones patológicas y su desarrollo de afecciones patológicas debido a la ausencia del polipéptido TAT.

El ácido nucleico que codifica los polipéptidos TAT también se puede utilizar en la terapia génica. En las aplicaciones de terapia génica, los genes se introducen en las células con el fin de obtener la síntesis *in vivo* de un producto genético terapéuticamente efectivo para, por ejemplo, reemplazar un gen defectuoso. La "terapia génica" comprende tanto la terapia génica convencional, en la que se obtiene un efecto duradero mediante un único tratamiento, como la administración de agentes génicos terapéuticos, lo cual implica la administración única o reiterada de un ADN o ARNm terapéuticamente efectivo. Los ADN y ARN antisentido pueden utilizarse como agentes terapéuticos para bloquear la expresión de ciertos genes *in vivo*. Ya se ha demostrado que los oligonucléotidos antisentido cortos pueden importarse en las células donde actúen como inhibidores, a pesar de contar con concentraciones intracelulares bajas debido a que su absorción por parte de la membrana celular es restringida. (Zamecnik y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:4143-4146 [1986]). Es posible modificar los oligonucléotidos para aumentar su absorción, por ejemplo, sustituyendo sus grupos de fosfodiéster con carga negativa por grupos sin carga.

Existen diversas técnicas disponibles para introducir ácidos nucleicos en células viables. Las técnicas varían dependiendo de si el ácido nucleico se transfiere *in vitro* a células en cultivo o *in vivo* a células del huésped pretendido. Las técnicas adecuadas para transferir ácido nucleico a las células de mamíferos *in vitro* incluyen el uso de liposomas, electroporación, microinyección, fusión de células, DEAE-dextrano, el método de precipitación con fosfato de calcio, etc. Las técnicas actualmente preferentes para trasnferir genes *in vivo* incluyen la transfección con vectores virales (generalmente retrovirales) y la transfección con mediación de proteína-liposoma y revestimiento

viral (Dzau y col., Trends in Biotechnology 11, 205-210 [1993]). En algunas situaciones, es deseable proporcionar a la fuente del ácido nucleico un agente que actúe sobre las células objetivo, como por ejemplo, un anticuerpo específico para una proteína de membrana de la superficie celular o la propia célula objetivo, un ligando para un receptor de la célula objetivo, etc. Cuando se empleen liposomas, pueden utilizarse las proteínas que se unen a una proteína de membrana de la superficie celular asociada a la endocitosis para actuar y/o facilitar la absorción, como por ejemplo, proteínas de la cápside o fragmentos de las mismas con tropismo para una clase de célula en particular, anticuerpos para proteínas sometidas a un proceso de internalización en ciclos y proteínas que actúan en la localización intracelular y mejoran la vida media intracelular. La técnica de endocitosis con mediación de receptores se describe, por ejemplo, en Wu y col., J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987); y Wagner y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:3410-3414 (1990). Para revisar los protocolos de la marcación de genes y la terapia génica, véase Anderson y col., Science 256:808-813 (1992).

Las moléculas de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos TAT o fragmentos de los mismos descritas en la presente memoria descriptiva son útiles para identificar cromosomas. A este respecto, existe una necesidad continua de identificar nuevos marcadores cromosómicos, dado que actualmente, sobre la base de los datos reales sobre secuencias, hay disponibles relativamente pocos reagentes de marcación cromosómica. Cada molécula de ácidos nucleicos con un TAT de la presente invención puede usarse como marcador cromosómico.

Los polipéptidos TAT y las moléculas de ácidos nucleicos de la presente invención también pueden emplearse de forma diagnóstica para tipificar tejidos, pudiendo los polipéptidos TAT de la presente invención expresarse diferencialmente en un tejido en comparación con otro, preferentemente al comparar un tejido enfermo con uno normal de su misma clase. Las moléculas de ácidos nucleicos con un TAT podrán utilizarse para generar sondas para la PCR y los análisis "Northern", "Southern" y "Western".

La presente invención abarca métodos de exploración de compuestos para identificar aquéllos que imiten el polipéptido TAT (agonistas) o impidan sus efectos (antagonistas). Los ensayos de exploración para los candidatos fármacos antagonistas se diseñan para identificar compuestos que se unen o forman complejos con los polipéptidos TAT codificados por los genes identificados en la presente memoria descriptiva, o interfieren de cualquier otro modo en la interacción de los polipéptidos codificados con otras proteínas celulares, por ejemplo, inhibiendo la expresión del polipéptido TAT en las células. Dichos ensayos de exploración incluirán ensayos

258

capaces de establecer una exploración de alto rendimiento de bibliotecas de productos químicos, con lo cual serán particularmente adecuados para identificar candidatos fármacos de molécula pequeña.

Los ensayos pueden realizarse en diversos formatos, incluyendo ensayos de unión proteína-proteína, ensayos de exploración bioquímica, inmunoensayos y ensayos basados en células, que están bien caracterizados en la materia.

Todos los ensayos sobre antagonistas son comunes en el sentido de que pretenden poner en contacto al candidato fármaco con un polipéptido TAT codificado por un ácido nucleico identificado en la presente memoria descriptiva bajo condiciones, y durante un tiempo suficiente, que permitan a estos dos compuestos interactuar.

En ensayos de unión, la interacción consiste en la unión, y el complejo formado puede aislarse o detectarse en la mezcla de la reacción. En una realización en particular, el polipéptido TAT codificado por el gen identificado en la presente memoria descriptiva o el candidato fármaco se inmoviliza en una fase sólida, por ejemplo, una placa de microtitulación, mediante uniones covalentes o no covalentes. Por lo general, la unión no covalente se logra revistiendo la superficie sólida con una solución del polipéptido TAT y dejando secar la mezcla. Alternativamente, un anticuerpo inmovilizado, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, específico para el polipéptido TAT que se quiera inmovilizar, puede usarse para anclarlo a una superficie sólida. El ensayo se efectúa añadiendo el componente no inmovilizado, que puede marcarse con un marcador detectable, al componente inmovilizado, por ejemplo, la superficie revestida que contiene el componente anclado. Cuando la reacción ha terminado, los componentes que no han reaccionado se eliminan, por ejemplo, mediante un lavado, y los complejos anclados en la superficie sólida se detectan. Cuando el componente originalmente no inmovilizado porta un marcador detectable, la detección del marcador inmovilizado en la superficie indica que se formó el complejo. Cuando el componente originalmente no inmovilizado no porte un marcador detectable, la formación de complejos puede detectarse, por ejemplo, usando un anticuerpo marcado que se una de forma específica al complejo inmovilizado.

Si el candidato compuesto interactúa pero no se une a un polipéptido TAT particular codificado por un gen identificado en la presente memoria descriptiva, su interacción con ese polipéptido puede ensayarse a través de métodos bien conocidos para detectar interacciones proteína-proteína. Dichos ensayos incluyen enfoques tradicionales, como, por ejemplo, enlaces cruzados, coinmunoprecipitación y copurificación a través de gradientes o columnas cromatográficas. Además, las interacciones proteína-proteína pueden supervisando empleando un sistema genético basado en la levadura descrito por Fields y sus colaboradores (Fields y Song, Nature (London), 340:245-246 (1989); Chien y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:9578-9582

(1991)) y tal como detallan Chevray y Nathans, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 5789-5793 (1991). Muchos activadores de la transcripción, como la levadura GAL4, consisten en dos dominios modulares físicamente discretos, uno actuando como el dominio que se une al ADN y el otro funcionando como el dominio de activación de la transcripción. El sistema de expresión de la levadura descrito en las anteriores publicaciones (al cual se hace habitualmente referencia como el "sistema de dos híbridos") aprovecha esta propiedad, y emplea dos proteínas híbridas, una en que la proteína objetivo se fusiona con el dominio de la GAL4 que se une al ADN y otra en que las proteínas activadoras candidatas se fusionan con el dominio de activación. La expresión de un gen indicador de GAL1-*lac*Z bajo el control de un promotor activado por la GAL4 depende de la reconstitución de la actividad de la GAL4 a través de una interacción proteína-proteína. Las colonias que contienen polipéptidos que interactúan se detectan con un sustrato cromogénico para β-galactosidasa. Clontech comercializa un conjunto completo (MATCHMAKER™) para identificar interacciones proteína-proteína entre dos proteínas específicas usando la técnica de dos híbridos. Este sistema también puede ampliarse para mapear dominios de proteínas que intervengan en interacciones de proteínas específicas, así como señalar residuos de aminoácidos que sean cruciales para dichas interacciones.

Los compuestos que interfieren en la interacción de un gen que codifique un polipéptido TAT identificado en la presente memoria descriptiva y otros componentes intra o extracelulares pueden probarse de la siguiente manera: normalmente, se prepara una mezcla de reacción que contenga el producto del gen y el componente intra o extracelular bajo condiciones, y durante un tiempo suficiente, que permita la interacción y unión de los dos productos. Para probar la capacidad de un candidato compuesto para inhibir la unión, la reacción se lleva a cabo en ausencia y en presencia del compuesto de prueba. Además, se puede añadir un placebo a una tercera mezcla de reacción que sirva como control positivo. La unión (formación del complejo) entre el compuesto de prueba y el componente intra o extracelular presente en la mezcla se supervisa tal como se ha descrito anteriormente en la presente memoria descriptiva. La formación de un complejo en la(s) reacción(es) de control pero no en la mezcla de reacción que contenga el compuesto de prueba indica que éste interfiere en su interacción con su asociado de reacción.

Para ensayar con antagonistas, el polipéptido TAT se puede añadir a una célula junto con el compuesto del cual se quiera explorar una actividad en particular, y la capacidad del compuesto para inhibir la actividad de interés en presencia del polipéptido TAT indica que dicho compuesto es un antagonista de éste. Alternativamente, los antagonistas pueden detectarse combinando el polipéptido TAT y un antagonista potencial con receptores de polipéptidos TAT unidos a la

membrana o receptores recombinantes bajo condiciones apropiadas para un ensayo de inhibición competitivo. El polipéptido TAT puede marcarse, por ejemplo mediante radioactividad, de modo que la cantidad de moléculas de polipéptidos TAT unidas al receptor se puede usar para determinar la eficacia del antagonista potencial. El gen que codifica el receptor se puede identificar a través de numerosos métodos que los expertos en la materia conocen, por ejemplo, la selección de ligandos y la clasificación de FACS. Coligan y col., Current Protocols in Immun., 1(2): capítulo 5 (1991). Preferentemente, la clonación de la expresión se emplea donde el ARN poliadenilado se prepare a partir de una célula que responsa al polipéptido TAT y una biblioteca de ADNc creada a partir de este ARN se divida en grupos y se utilice para transfectar células COS u otras células que no respondan al polipéptido TAT. Las células transfectadas que se han desarrollado en portaobjetos de cristal se exponen al polipéptido TAT marcado. El polipéptido TAT puede marcarse a través de diversos medios, incluyendo la iodinación o la inclusión de un sitio de reconocimiento para una proteína quinasa específica para el sitio en cuestión. Tras la fijación e incubación, los portaobjetos se someten a un análisis autoradiográfico. Los grupos positivos se identifican, y los subgrupos se preparan y retransfectan usando proceso interactivo de subagrupamiento y reexploración, lo cual da lugar finalmente a un clon único que codifica el receptor putativo.

Como enfoque alternativo para identificar receptores, el polipéptido TAT marcado puede enlazarse por fotoafinidad a la membrana celular, o se pueden extraer preparaciones que expresen la molécula receptora. El material con enlaces cruzados se resuelve mediante PAGE y se expone a una película de rayos X. El complejo marcado que contiene el receptor puede eliminarse, resolverse en fragmentos de péptidos y someterse a un proceso de microsecuenciación de proteínas. La secuencia de aminoácidos obtenida a partir de la microsecuenciación se utilizaría para diseñar un grupo de sondas de oligonucleótidos degenerados para explorar una biblioteca de ADNc a fin de identificar el gen que codifica el receptor putativo.

En otro ensayo para antagonistas, las células de mamíferos o una preparación de membrana que expresen el receptor se incubarían con el polipéptido TAT marcado en presencia del compuesto candidato. En consecuencia, podría medirse la capacidad del compuesto para potenciar o bloquear esta interacción.

Ejemplos más específicos de antagonistas potenciales incluyen un oligonucleótido que se una a las fusiones de inmunoglobulina con un polipéptido TAT y, en particular, anticuerpos, incluyendo, sin limitación, anticuerpos poli y monoclonales y fragmentos de anticuerpos, anticuerpos de cadena única, anticuerpos anti-idiotípicos y versiones quiméricas o humanizadas de dichos anticuerpos o fragmentos, así como anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpos. Alternativamente, un

antagonista potencial puede ser una proteína estrechamente relacionada, por ejemplo, una forma mutada del polipéptido TAT que reconozca al receptor pero no tenga efecto alguno, inhibiendo, por tanto, de forma competitiva la acción del polipéptido TAT.

Otro antagonista potencial de un polipéptido TAT es una construcción de ARN o ADN antisentido preparada mediante tecnología antisentido, donde, por ejemplo, una molécula de ARN o ADN antisentido actúa para bloquear directamente la traducción de ARNm, hibridando con éste e impidiendo la traducción proteínica. La tecnología antisentido se puede emplear para controlar la expresión génica a través de la formación de una hélice triple o un ADN o ARN antisentido, basándose ambos métodos en la unión de un polinucleótido a un ADN o ARN. Por ejemplo, la porción codificadora 5' de la secuencia de polinucleótidos, que codifica los polipéptidos TAT maduros de la presente memoria descriptiva, se usa para diseñar un oligonucleótido de ARN antisentido con una longitud de entre 10 y 40 pares de bases. Se diseña un oligonucléotido de ADN para que sea complementario de una región del gen implicada en la transcripción (hélice triple – véase Lee y col., Nucl. Acids Res., 6:3073 (1979); Cooney y col., Science, 241: 456 (1988); Dervan y col., Science, 251:1360 (1991)), evitando por tanto la transcripción y producción del polipéptido TAT. El oligonucleótido de ARN antisentido hibrida con el ARNm *in vivo* y bloquea la traducción de la molécula de ARNm en el polipéptido TAT (antisentido - Okano, Neurochem., 56:560 (1991); Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression (CRC Press: Boca Ratón, FL, 1988). Los oligonucleótidos descritos anteriormente también pueden administrarse a las células, de modo que el ARN o ADN antisentido pueda expresarse *in vivo* para inhibir la producción del polipéptido TAT. Cuando se utilice ADN antisentido, los oligodesoxiribonucleótidos derivados del sitio de comienzo de la traducción, por ejemplo, entre las posiciones -10 y +10 de la secuencia de nucleótidos del gen objetivo, son preferentes.

Los antagonistas potenciales incluyen moléculas pequeñas que se unen al sitio activo, el sitio de unión a un receptor o el factor del crecimiento u otro sitio de unión relevante del polipéptido TAT, bloqueando por tanto la actividad biológica normal del polipéptido TAT. Los ejemplos de moléculas pequeñas incluyen, aunque sin limitarse a, moléculas pequeñas de péptidos o sustancias similares a éstos, preferentemente péptidos solubles, y compuestos sintéticos no peptídicos orgánicos o inorgánicos.

Las ribozimas son moléculas de ARN enzimáticas capaces de catalizar la escisión específica del ARN. Las ribozimas actúan por hibridación específica de la secuencia en cuestión con el ARN objetivo complementario, seguida por una escisión endonucleolítica. Los sitios específicos de escisión de la ribozima dentro de un objetivo de ARN potencial pueden identificarse mediante

técnicas conocidas. Para más detalles, véase, por ejemplo, Rossi, Current Biology, 4:469-471 (1994), y la publicación del PCT nº WO 97/33551 (publicada el 18 de septiembre de 1997).

Las moléculas de ácidos nucleicos en formación de hélice triple utilizadas para inhibir la transcripción deberían tener una sola hebra y estar compuestas por desoxinucleótidos. La composición base de estos oligonucleótidos se diseña de modo que fomente la formación de hélice triple a través de las normas Hoosteen de emparejamiento de bases, lo cual requiere generalmente extensiones considerables de purinas o pirimidinas en una hebra de un dúplex. Para más detalles, véase, por ejemplo, la publicación del PCT nº WO 97/33551, *supra*.

Estas moléculas pequeñas pueden identificarse mediante uno o más de los ensayos de exploración mencionados anteriormente en la presente memoria descriptiva y/o cualquier otra técnica de exploración bien conocida por los expertos en la materia.

Los ácidos nucleicos aislados que codifican polipéptidos TAT puede utilizarse en la presente memoria descriptiva para producir de forma recombinante un polipéptido TAT mediante técnicas bien conocidas en la materia y tal como se ha descrito en la presente memoria descriptiva. Por su parte, los polipéptidos TAT producidos pueden emplearse para generar anticuerpos anti-TAT mediante técnicas bien conocidas en la materia y tal como se ha descrito en la presente memoria descriptiva.

Los anticuerpos que se unen de forma específica a un polipéptido TAT identificados en la presente memoria descriptiva, así como otras moléculas identificadas mediante los ensayos de exploración detallados anteriormente en la presente memoria descriptiva, pueden administrarse para el tratamiento de diversos trastornos, incluyendo cáncer, en la forma de composiciones farmacéuticas.

Si el polipéptido TAT es intracelular, y se utilizan anticuerpos enteros como inhibidores, los anticuerpos internalizadores son preferentes. No obstante, las lipofecciones o liposomas se pueden utilizar también para administrar el anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo, en las células. Cuando se utilicen fragmentos de anticuerpo, el fragmento inhibidor más pequeño que se une de forma específica al dominio de unión de la proteína objetivo es preferente. Por ejemplo, tomando como referencia las secuencias de la región variable de un anticuerpo, las moléculas peptídicas pueden diseñarse para retener la capacidad de unión de la secuencia de la proteína objetivo. Estos péptidos pueden sintetizarse químicamente y/o producirse mediante la tecnología de ADN recombinante. Véase, *por ejemplo*, Marasco *y col.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993).

La formulación de la presente memoria descriptiva también contiene más de un compuesto activo, tal y como sea necesario para la indicación particular que se esté tratando, preferentemente

aquéllos con actividades complementarias que no se afecten de manera adversa entre sí. De forma alternativa, o adicionalmente, la composición puede comprender un agente que potencie su función, como, por ejemplo, un agente citotóxico, una citoquina, un agente quimioterapéutico o un agente inhibidor del crecimiento. Dichas moléculas están presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el fin que se pretende.

Los siguientes ejemplos se ofrecen únicamente con fines ilustrativos y de ningún modo se proponen limitar el alcance de la presente invención.

El contenido de todas las patentes y referencias bibliográficas citadas en la presente especificación se incorporan íntegramente en la presente memoria descriptiva a modo de referencia.

EJEMPLOS

Los reagentes comercializados a los cuales se hace referencia en los ejemplos se utilizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante, a menos que se indique lo contrario. La fuente de esas células identificadas en los siguientes ejemplos, y a lo largo de toda la especificación, por las cantidades de adquisiciones de la ATCC, es la American Type Culture Collection (Colección Americana de Cultivos Tipo), Manassas, VA.

EJEMPLO 1: Perfil de la expresión tisular mediante GeneExpress®

Se analizó una base de datos patentada que contiene información sobre la expresión génica (GeneExpress®, Gene Logic Inc., Gaithersburg, MD) en un intento de identificar polipéptidos (y los ácidos nucleicos que los codifican) cuya expresión estuviese significativa y detectablemente sobrerregulada en un tejido tumoral humano en particular de interés en comparación con otro(s) tumor(es) humano(s) y/o tejidos humanos normales. Específicamente, el análisis de la base de datos GeneExpress® se efectuó mediante aplicaciones de software disponibles a través de Gene Logic Inc., Gaithersburg, MD, especiales para su uso con la base de datos GeneExpress®, o patentadas, diseñadas y desarrolladas en Genentech, Inc., igualmente especiales para su uso con la base de datos GeneExpress®. La valoración de los resultados positivos en el análisis se basa en varios criterios, incluyendo, por ejemplo, la especifidad del tejido y el tumor y el nivel de expresión en tejidos normales esenciales y/o proliferativos. La(s) siguiente(s) molécula(s) exhibe(n) un perfil de expresión tisular que muestra una expresión tisular alta y una sobrerregulación de la expresión significativa y reproduciblemente detectable en un tumor o tumores humanos específicos en comparación con otro(s) tumor(es) humano(s) y/o tejidos humanos normales, y, de forma opcional, una expresión relativamente baja en tejidos humanos normales esenciales y/o proliferativos.

Usando el análisis de la expresión descrito anteriormente, se determinó que el ARNm que codifica el polipéptido TAT113 mostrado en la presente memoria descriptiva como SEQ ID NO:2 se sobreexpresa de forma significativa, reproducible y detectable en ciertas clases de tumores cancerosos humanos de colon y recto en comparación con los tejidos humanos normales de colon y recto correspondientes, respectivamente.

A. Colon

En un primer experimento, la expresión del TAT113 se analizó en un grupo de 237 muestras independientes de tejido humano normal de colon. Los resultados de estos análisis demostraron que el nivel de la expresión de ARNm en el TAT113 en todas las muestras de tejido humano normal de colon analizadas era extraordinariamente consistente y contaba con una distribución muy rigurosa, sin que ninguna de estas muestras experimentase un aumento superior al 200% de la expresión del TAT113 en comparación con el nivel medio de la expresión del TAT113 en la totalidad del grupo de muestras.

Con fines de comparación cuantitativa, también se analizó una variedad de muestras independientes y de diferentes clases de tejido de colon humano canceroso para valorar la expresión del TAT113. Los resultados obtenidos en estos análisis demostraron que el nivel de expresión del TAT113 en las muestras cancerosas era bastante variable, y una cantidad significativa de las muestras cancerosas experimentó un incremento al menos del 200% (llegando como máximo al 1600%) de la expresión del TAT113 en comparación con el nivel medio de la expresión del TAT113 en el grupo de muestras analizadas de tejido de colon normal. Más específicamente, se observó una sobreexpresión del TAT113 detectable y reproducible en las siguientes clases de cáncer de colon en comparación con un colon normal (las cantidades mostradas entre paréntesis para cada clase de cáncer representan la cantidad de muestras independientes que exhibieron un aumento al menos del 200% de la expresión del TAT113 en comparación con el nivel medio de la expresión del TAT113 en el grupo de muestras analizadas de tejido de colon normal/la cantidad total de muestras tumorales independientes analizadas): adenocarcinoma de colon con ubicación no especificada (4/9), adenocarcinoma del ciego y el colon derecho ascendente (25/35), adenocarcinoma del colon transversal (5/6) y adenocarcinoma del colon izquierdo descendente y el sigmoide (21/34). Se realizaron experimentos adicionales que confirmaron estos resultados.

B. Recto

En otro experimento, la expresión del TAT113 se analizó en un grupo de 46 muestras independientes de tejido humano normal de recto. Los resultados de estos análisis demostraron que el nivel de la expresión de ARNm en el TAT113 en todas las muestras de tejido humano normal de

recto analizadas era extraordinariamente consistente y contaba con una distribución muy rigurosa, sin que ninguna de estas muestras experimentase un aumento superior al 200% de la expresión del TAT113 en comparación con el nivel medio de la expresión del TAT113 en la totalidad del grupo de muestras.

Con fines de comparación cuantitativa, también se analizaron 25 muestras independientes de tejido de adenocarcinoma rectal humano para valorar la expresión del TAT113. Los resultados obtenidos en estos análisis demostraron que el nivel de expresión del TAT113 en las muestras cancerosas era bastante variable, y 15 de las 25 muestras probadas experimentó un incremento al menos del 200% (llegando como máximo al 1300%) de la expresión del TAT113 en comparación con el nivel medio de la expresión del TAT113 en el grupo de muestras analizadas de tejido de recto normal.

Dadas estas circunstancias, el polipéptido TAT113 mostrado en la presente memoria descriptiva como SEQ ID NO:2, y el ácido nucleico que lo codifica, son objetivos excelentes que pueden aprovecharse para determinar cuantitativa y cualitativamente el nivel de expresión del polipéptido TAT113 mostrado en la presente memoria descriptiva como SEQ ID NO:2, y el ARNm que lo codifica, en diversas muestras de tejido de mamíferos, permitiendo por tanto realizar comparaciones cuantitativas y cualitativas entre ellos. Así pues, el polipéptido TAT113 mostrado en la presente memoria descriptiva como SEQ ID NO:2, y el ácido nucleico que lo codifica, son moléculas cuyo perfil de expresión exclusivo puede aprovecharse para diagnosticar ciertas clases de tumores cancerosos en mamíferos tal como se ha descrito anteriormente. Además, dado que este anàlisis demuestra que el polipéptido TAT113 se sobreexpresa de forma significativa, reproducible y detectable en ciertos tumores humanos en comparación con sus tejidos humanos normales correspondientes, el polipéptido TAT113 sirve como excelente objetivo que puede aprovecharse para el tratamiento terapéutico de dichos tumores en mamíferos.

EJEMPLO 2: Análisis en micromatriz para detectar la sobrerregulación de polipéptidos TAT en tumores cancerosos

Las micromatrices de ácidos nucleicos, que a menudo contienen miles de secuencias génicas, son útiles para identificar genes expresados de forma diferencial en tejidos enfermos en comparación con sus equivalentes normales. Mediante micromatrices de ácidos nucléicos, se puede realizar la transcripción inversa y la marcación de muestras de ARNm de prueba y control procedentes de muestras histológicas de prueba y control para generar sondas de ADNc. A continuación, las sondas de ADNc se hibridan en una matriz de ácidos nucleicos inmovilizada en un soporte sólido. La matriz

se configura de forma que se conozcan la secuencia y posición de cada miembro de la matriz. Por ejemplo, se puede disponer en matrices en un soporte sólido una selección de genes conocidos por expresarse en ciertos estados de enfermedades. La hibridación de una sonda marcada con un miembro concreto de la matriz indica que la muestra de la que se derivó la sonda expresa ese gen. Si la muestra de hibridación de una sonda de una muestra de prueba (tejido enfermo) es mayor que la muestra de hibridación de una sonda de una muestra de control (tejido normal), entonces se identifican el gen o los genes que se sobreexpresan en el tejido enfermo. La implicación de este resultado es que una proteína sobreexpresada en un tejido enfermo es útil no sólo como marcador diagnóstico para la presencia del estado de enfermedad sino también como objetivo terapéutico para el tratamiento de dicho estado de enfermedad.

La metodología de hibridación de ácidos nucleicos y la tecnología de micromatrices son bien conocidas en la materia. En el presente ejemplo, la preparación específica de ácidos nucleicos para hibridación y sondas, los portaobjetos y las condiciones de hibridación se detallan en la solicitud de patente del PCT con número de serie PCT/US01/10482, presentada el 30 de marzo de 2001, la cual se incorpora en la presente memoria descriptiva a modo de referencia.

En el presente ejemplo, los tumores cancerosos derivados de diversos tejidos humanos se estudiaron para determinar la expresión génica sobrerregulada con relación a tumores cancersos de diferentes clases tisulares y/o tejidos humanos no cancerosos en un intento de identificar esos polipéptidos que se sobreexpresan en un tumor canceroso en particular. En ciertos experimentos, se obtuvo tejido tumoral canceroso humano y tejido tumoral humano no canceroso de la misma clase tisular (a menudo del mismo paciente) y se analizó para determinar la expresión de polipéptidos TAT. Adicionalmente, se obtuvo tejido tumoral canceroso humano de cualquiera de diversos tumores humanos diferentes y se comparó con una muestra de control epitelial "universal" que se preparó agrupando tejidos humanos no cancerosos de origen epitelial, incluyendo hígado, riñón y pulmón. El ARNm aislado de los tejidos epiteliales agrupados representa una mezcla de productos génicos expresados de diversos tejidos epiteliales diferentes, proporcionando por tanto un excelente control negativo con que comparar cuantitativamente los niveles de expresión génica en tumores de origen epitelial. Los experimentos de hibridación en micromatrices usando las muestras de control agrupadas generaron un trazo lineal en un análisis de 2 colores. La pendiente de la línea generada en un análisis de 2 colores se utilizó entonces para normalizar las proporciones de (prueba:detección del control) dentro de cada experimento. A continuación, se compararon las proporciones normalizadas de diversos experimentos y se usaron para identificar el agrupamiento de la expresión génica. Así, la muestra de "control universal" agrupada no sólo permitió determinaciones eficaces

de la expresión génica relativa en una comparación simple entre 2 muestras sino también comparaciones de múltiples muestras en varios experimentos.

En los presentes experimentos, las sondas de ácidos nucleicos derivadas de las secuencias de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos TAT descritas en la presente memoria descriptiva se utilizaron para la creación de la micromatriz, y el ARN de varios tejidos tumorales se empleó para la hibridación con ellas. Un valor basado en la relación proporción normalizada:proporción experimental se designó como "proporción de límite". Sólo los valores superiores a esta proporción de límite se determinaron como significativos. La importancia de las proporciones se estimó a partir de la cantidad de ruido o dispersión asociada a cada experimento, pero, habitualmente, se utilizó un límite de proporción de entre un 180 ó 200% del valor original, o superior, para identificar los genes candidatos relativamente sobreexpresados en muestras tumorales en comparación con el tejido normal correspondiente y/o el control universal epitelial normal agrupado. Las proporciones para los genes identificados de esta forma como relativamente sobreexpresados en muestras tumorales variaron entre un 200 y un 4.000% del valor original, o incluso más. Por comparación, en un experimento de control en que el mismo ARN se marcó con cada color y se hibridó consigo mismo, en prácticamente todos los genes con señales superiores al valor original, la proporción observada es significativamente inferior a un 180% de dicho valor original. Esto indica que el ruido experimental por encima de una proporción del 180% del valor original es extremadamente bajo, y un cambio observado que lleve la proporción a alcanzar ese umbral del 180% o superarlo es significativo y se espera que represente una diferencia real, detectable y reproducible en la expresión entre las muestras analizadas y comparadas.

Los resultados de estos experimentos demostraron que el ARNm que codifica el polipéptido TAT113 mostrado en la presente solicitud como SEQ ID NO:2 se sobreexpresa de forma significativa (es decir, al menos en un 200%) en más del 50% de las 75 muestras independientes de tumor de colon humano probadas al compararlas con el tejido de colon humano normal y la muestra de control epitelial agrupada. Estos datos también demuestran que la sobreexpresión observada es significativa, detectable y reproducible en múltiples muestras de tumor de colon humano al compararlas con las muestras de colon humano normales homólogas y la muestra de control epitelial humana agrupada. Tal como se ha descrito anteriormente, estos datos demuestran que el polipéptido TAT113 de la presente invención y el ácido nucleico que lo codifica son útiles no sólo como marcadores para diagnosticar la presencia de tumores humanos de colon sino que también sirven como objetivos terapéuticos potenciales para el tratamiento de esos tumores en humanos.

EJEMPLO 3: Análisis cuantitativo de la expresión de ARNm en un TAT

En este ensayo, se utilizó un ensayo de 5' nucleasa (por ejemplo, TaqMan®) y una PCR cuantitativa en tiempo real (por ejemplo, ABI Prizm 7700 Sequence Detection System® (Perkin Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA)) para encontrar genes que se sobreexpresen de forma significativa en un tumor canceroso en comparación con otros tumores cancerosos o un tejido normal no canceroso. La reacción del ensayo de 5' nucleasa es una técnica fluorescente basada en la PCR que aprovecha la actividad de 5' exonucleasa de la enzima Taq ADN polimerasa para supervisar la expresión génica en tiempo real. Se utilizan dos cebadores de oligonucleótidos (cuyas secuencias se basan en el gen o la secuencia EST de interés) para generar un amplicón típico de una reacción PCR. Un tercer oligonucleótido, o sonda, se diseña para detectar la secuencia de nucleótidos ubicada entre los dos cebadores de la PCR. The probe is non-extendible by Taq DNA polymerase enzyme, and is labeled with a reporter fluorescent dye and a quencher fluorescent dye.La enzima Taq ADN polimerasa no puede alargar la sonda, la cual se marca con un colorante fluorescente indicador y otro inhibidor. Cuando los dos colorantes están juntos como lo están en la sonda, el colorante inhibidor inhibe cualquier emisión inducida por láser del colorante indicador. Durante la reacción de amplificación de la PCR, la enzima Taq ADN polimerasa escinde la sonda de una forma que depende de la plantilla. Los fragmentos de sonda resultantes se disocian en solución, y la señal del colorante indicador liberado no sufre el efecto de inhibición del segundo fluoróforo. Una mólecula del colorante indicador se libera por cada nueva molécula sintetizada, y la detección del colorante indicador no inhibido ofrece la base para la interpretación cuantitativa y cualitativa de los datos. Este ensayo es bien conocido y se utiliza rutinariamente en la materia para identificar de forma cuantitativa las diferencias en la expresión génica entre dos muestras diferentes de tejido humano, véase, por ejemplo, Higuchi y col., Biotechnology 10:413-417 (1992); Livak y col., PCR Methods Appl., 4:357-362 (1995); Heid y col., Genome Res. 6:986-994 (1996); Pennica y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95(25):14717-14722 (1998); Pitti y col., Nature 396(6712):699-703 (1998) y Bieche y col., Int. J. Cancer 78:661-666 (1998). El procedimiento de la 5' nucleasa se lleva a cabo en un dispositivo de PCR cuantativa en tiempo real como el sistema de detección de secuencias ABI Prism 7700TM Sequence Detection. El sistema está compuesto por un termovariador, un láser, una cámara con dispositivo de carga acoplada (CCD) y un ordenador. El sistema amplifica las muestras en un formato de 96 pozos en un termovariador. Durante la amplificación, la señal fluorescente inducida por el láser se recoge en tiempo real a través de los cables de fibra óptica para todos los 96 pozos y se detecta en el CCD. El sistema incluye una aplicación de software para operar el instrumento y analizar los datos.

El material de inicio para la exploración fue ARNm aislado a partir de diversos tejidos cancerosos diferentes. El ARNm se cuantifica de forma precisa, por ejemplo, por un medio fluorométrico. Como control negativo, el ARN se aisló a partir de diversos tejidos normales de la misma clase tisular que los tejidos cancerosos probados. Con frecuencia, las muestras tumorales se comparan directamente con muestras normales "emparejadas" de la misma clase tisular, lo cual significa que el tumor y las muestras normales se obtuvieron del mismo individuo.

Los datos del ensayo de 5' nucleasa se expresan inicialmente como Ct, o el ciclo umbral. Esto se define como el ciclo en que la señal indicadora se acumula por encima del nivel original de fluorescencia. Los valores ΔCt se utilizan como medición cuantitativa de la cantidad relativa de copias de inicio de una secuencia objetivo en particular en una muestra de ácidos nucleicos al comparar los resultados del ARNm de un cáncer con los del ARNm humano normal. Dado que una unidad Ct corresponde a 1 ciclo de PCR o aproximadamente un aumento relativo del 200% con relación al valor normal, dos unidades corresponden a un aumento relativo del 400%, tres unidades corresponden a un aumento relativo del 800%, etcétera, es posible medir cuantitativa y cualitativamente el aumento relativo de la expresión del ARNm entre dos o más tejidos diferentes. A este respecto, se acepta en la materia que este ensayo es suficientemente sensible en su aspecto técnico para detectar de forma reproducible un aumento al menos del 200% de la expresión del ARNm en una muestra de tumor humano con relación a un control normal.

Usando esta técnica, se determinó que el ARNm que codifica el polipéptido TAT113 mostrado en la presente solicitud como SEQ ID NO:2 se sobreexpresa de forma significativa y reproducible (es decir, al menos en un 200%) en todas las 9 muestras independientes de tumor de colon humano al compararlo tanto con muestras de colon humano normal de diferentes donantes de tejido humano como con diversas muestras de tumor de color humano normal "emparejadas" derivadas del mismo donante de tejido humano que del que se derivaron las muestras tumorales. Por tanto, tal como se ha descrito anteriormente, estos datos demuestran que el polipéptido TAT113 de la presente invención y el ácido nucleico que lo codifica son útiles no sólo como marcadores para diagnosticar la presencia de tumores humanos de colon sino que también sirven como objetivos terapéuticos potenciales para el tratamiento de esos tumores en humanos.

EJEMPLO 4: Hibridación *in situ*

La hibridación *in situ* es una técnica potente y versátil para detectar y localizar las secuencias de ácidos nucleicos dentro de preparaciones celulares o tisulares. Puede resultar útil, por ejemplo, para identificar sitios de expresión génica, analizar la distribución tisular de la transcripción,

identificar y localizar una infección viral, seguir los cambios en la síntesis específica de ARNm y contribuir en el mapeado de cromosomas.

La hibridación *in situ* se realizó siguiendo una versión optimizada del protocolo establecido por Lu y Gillett, Cell Vision 1:169-176 (1994), empleando ribosondas marcadas con ^{33}P y generadas mediante PCR. En resumen, el proceso consistió en seccionar, desparafinar y desproteinizar en proteinasa K (20 g/ml) tejidos humanos fijados en formalina e impregnados en parafina durante 15 minutos a 37 °C, tras lo cual siguieron procesándose para la hibridación *in situ* tal como describen Lu y Gillett, *supra*. Una ribosonda antisentido marcada con [^{33}-P] UTP se generó a partir de un producto de PCR y se hibridó a 55 °C a lo largo de toda la noche. Los portaobjetos se sumergieron en emulsión de seguimiento nuclear Kodak NTB2 y se dejaron expuestos durante 4 semanas.

Síntesis de ribosondas de ^{33}P

6,0 µl (125 mCi) de ^{33}P-UTP (Amersham BF 1002, SA<2000 Ci/mmol) se secaron mediante vacío por velocidad. A cada tubo que contenía ^{33}P-UTP secado, se añadieron los siguientes ingredientes:

5 tampones de transcripción de 2,0 µl

1,0 µl de DTT (100 mM)

Mezcla de 2,0 µl de NTP (2,5 mM: 10 µ; cada una de 10 mM de GTP, CTP y ATP + 10 µl de H_2O)

1,0 µl de UTP (50 µM)

1,0 µl de Rnasina

1,0 µl de plantilla de ADN (1µg)

1,0 µl de H_2O

1,0 µl de polimerasa de ARN (para productos de PCR T3 = AS, T7 = S, normalmente)

Los tubos se incubaron a 37 °C durante una hora. Se añadió 1,0 µl de RQ1 DNasa, seguido de una incubación a 37 °C durante 15 minutos. Se añadieron 90 µl de TE (10 mM de Tris con pH 7,6/1 mM de EDTA con pH 8,0), y la mezcla se vertió con pipeta sobre papel DE81. La solución restante se cargó en una unidad de ultrafiltración Microcon-50 y se centrifugó usando el programa 10 (6 minutos). La unidad de filtración se invirtió en un segundo tubo y se centrifugó usando el programa 2 (3 minutos). Tras el centrifugado final de recuperación, se añadieron 100 µl de TE. 1 µl del producto final se vertió con pipeta sobre papel DE81 y se incluyó en 6 ml de Biofluor II.

La sonda se accionó con un gel de TBE/urea. 1-3 µl de la sonda o 5 µl de ARN Mrk III se añadieron a 3 µl de tampón de carga. Tras calentarla en un bloque calefactor a 95 °C durante 3 minutos, la sonda se colocó inmediatamente en hielo. Los pozos de gel se removieron con agua, la

muestra se cargó y el sistema se puso en marcha a 180-250 voltios durante 45 minutos. El gel se envolvió en plástico transparente adherente y se expuso a una película de XAR con una pantalla intensificadora en un congelador a -70 °C entre una hora y la noche entera.

Hibridación de ^{33}P

A. Tratamiento previo de secciones congeladas

Los portaobjetos se retiraron del congelador, se colocaron en bandejas de aluminio y se descongelaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Las bandejas se colocaron en un incubador a 55 °C durante 5 minutos a fin de reducir la condensación. Los portaobjetos se fijaron durante 10 minutos en una solución de paraformaldehído al 4% en hielo en la campana extractora y se lavaron en 0,5 SSC durante 5 minutos a temperatura ambiente (25 ml de 20 SSC + 975 ml de SQ H_2O). Tras la desproteinización en 0,5 μg/ml de proteinasa K durante 10 minutos a 37 °C (12,5 μl de reserva de 10 mg/ml en 250 ml de tampón de ARNsa previamente calentado libre de RNasa), las secciones se lavaron en 0,5 SSC durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las secciones se deshidrataron en soluciones de etanol al 70, 95 y 100% durante 2 minutos cada una.

B. Tratamiento previo de secciones impregnadas en parafina

Los portaobjetos se desparafinaron, se colocaron en SQ H_2O y se enjuagaron dos veces en 2 SSC a temperatura ambiente durante 5 minutos en cada ocasión. Las secciones se desproteinizaron en 20 μg/ml de proteinasa K (500 μl de 10 mg/ml en 250 ml de tampón de ARNsa libre de RNasa, a 37 °C durante 15 minutos) – embrión humano, u 8 unidades de proteinasa K (100 μl en 250 ml de tampón de Rnasa, a 37 °C durante 30 minutos) – tejidos en formalina. El posterior enjuague en 0,5 SSC y la deshidratación se realizaron tal como se ha descrito anteriormente.

C. Hibridación previa

Los portaobjetos se extendieron en una caja de plástico, alineados con tampón Box (4 SSC, formamida al 50%) – papel de filtro saturado.

D. Hibridación

Una sonda de 1,0 x 10^6 cpm y 1,0 μl de ARNt (reserva de 50 mg/ml) por portaobjetos se calentaron a 95 °C durante 3 minutos. Los portaobjetos se enfriaron en hielo, y se añadieron 48 μl de tampón de hibridación por portaobjetos. Tras la mezcla en el vórtice, se añadieron 50 μl de una mezcla de ^{33}P a 50 μl de hibridación previa en portaobjetos. Los portaobjetos se incubaron a lo largo de toda la noche a 55 °C.

E. Lavados

El lavado se realizó en dos ocasiones durante 10 minutos con 2 SSC y EDTA a temperatura ambiente (400 ml de 20 SSC + 16 ml de 0,25 M de EDTA, V_f=4L), seguido de un tratamiento con

RNasaA a 37 °C durante 30 minutos (500 μl de 10 mg/ml en 250 ml de tampón de Rnasa = 20 μg/ml). Los portaobjetos se lavaron 2 veces durante 10 minutos cada una de ellas con 2 SSC y EDTA a temperatura ambiente. Las condiciones de rigor del lavado fueron las siguientes: 2 horas a 55 °C, 0,1 SSC, EDTA (20 ml de 20 SSC + 16 ml de EDTA, V_f=4L).

F. Oligonucleótidos

El análisis *in situ* se realizó en diversas secuencias de ADN detalladas en la presente memoria descriptiva. Los oligonucleótidos empleados para estos análisis se obtuvieron para que fuesen complementarios de los ácidos nucleicos (o los complementos de los mismos) tal como se muestra en las figuras que acompañan al texto.

G. Resultados

Los análisis de hibridación *in situ* se realizaron en el ácido nucleico que codifica el polipéptido TAT113 mostrado en la presente memoria descriptiva como SEQ ID NO:2. Los resultados de estos análisis mostraron una expresión elevada del gen del TAT113 en 10 de 22 muestras independientes de cáncer primario de colon humano y 6 de 9 muestras independientes de cáncer de colon metastásico analizadas. Por el contrario, no se observó una expresión detectable (o significativamente inferior) del TAT113 en todas las muestras analizadas de tejido de colon normal.

EJEMPLO 5: Verificación y análisis de la expresión diferencial de polipéptidos TAT mediante GEPIS

Los polipéptidos TAT que puedan haberse identificado como antígenos de tumores, tal como se describe en uno o más de los anteriores Ejemplos, se analizaron y verificaron de la siguiente manera: Se buscó en una base de datos de ADN de señalizadores de secuencias expresadas (EST) (LIFESEQ®, Incyte Pharmaceuticals, Palo Alto, CA), y se identificaron las secuencias EST interesantes mediante GEPIS. El perfil de la expresión génica *in silico* (GEPIS) es una herramienta bioinformática desarrollada en Genentech, Inc. que caracteriza los genes de interés para nuevos objetivos terapéuticos contra el cáncer. El GEPIS aprovecha las grandes cantidades de secuencias EST y la información disponible en bibliotecas para determinar los perfiles de expresión génica. El GEPIS es capaz de determinar el perfil de la expresión de un gen sobre la base de su correlación proporcional con la cantidad de veces que aparezca en las bases de datos sobre EST, y funciona integrando LIFESEQ®, una base de datos relacionales sobre EST, con la información patentada de Genentech de una forma rigurosa y estadísticamente significativa. En este ejemplo, el GEPIS se utiliza para identificar e intervalidar antígenos de tumores nuevos, aunque puede configurarse para realizar análisis muy específicos o tareas de exploración amplia. Para la exploración inicial, el

GEPIS se usa para identificar secuencias EST en la base de datos LIFESEQ® que se correlacionan en la expresión en un tejido o tejidos en particular de interés (a menudo un tejido tumoral de interés). A continuación, las secuencias EST identificadas en esta exploración inicial (o secuencias consenso obtenidas al alinear múltiples secuencias EST relacionadas y superpuestas obtenidas de la exploración inicial) se sometieron a una exploración destinada a identificar la presencia de al menos un dominio transmembrana en la proteína codificada. Por último, el GEPIS se empleó para generar un perfil de expresión tisular completo para las diversas secuencias de interés. Usando esta clase de herramientas bioinformáticas de exploración, se identificaron varios polipéptidos TAT (y las moléculas de ácidos nucleicos que los codifican) que se sobreexpresaban de forma significativa en una clase particular de cáncer o ciertos cánceres en comparación con otros cánceres y/o tejidos no cancerosos normales. La valoración de los resultados positivos obtenidos a través del GEPIS se basa en varios criterios, incluyendo, por ejemplo, la especifidad del tumor y el nivel de expresión en tejidos normales esenciales y/o proliferativos.

Usando el análisis de expresión GEPIS descrito anteriormente, se determinó que el ARNm que codifica el polipéptido TAT113 mostrado en la presente memoria descriptiva como SEQ ID NO:2 se sobreexpresa de forma significativa, reproducible y detectable en muestras de tumor humano de colon en comparación con el tejido de colon normal correspondiente. Como tal, el polipéptido TAT113 mostrado en la presente memoria descriptiva como SEQ ID NO:2, y el ácido nucleico que lo codifica, son objetivos excelentes que pueden aprovecharse para determinar cuantitativa y cualitativamente el nivel de expresión del polipéptido TAT113 mostrado en la presente memoria descriptiva como SEQ ID NO:2, y el ARNm que lo codifica, en diversas muestras de tejido de mamíferos, permitiendo por tanto realizar comparaciones cuantitativas y cualitativas entre ellos. Por tanto, el polipéptido TAT113 mostrado en la presente memoria descriptiva como SEQ ID NO:2 y el ácido nucleico que lo codifica son objetivos excelentes que pueden aprovecharse para diagnosticar un tumor en mamíferos. Además, dado que este anàlisis demuestra que el polipéptido TAT113 se sobreexpresa de forma significativa, reproducible y detectable en ciertos tumores humanos en comparación con sus tejidos humanos normales correspondientes, el polipéptido TAT113 sirve como excelente objetivo que puede aprovecharse para el tratamiento terapéutico de dichos tumores en mamíferos.

EJEMPLO 6: Preparación de anticuerpos que se unen a un TAT113

Las técnicas para producir anticuerpos monoclonales son conocidas en la materia y se describen, por ejemplo en Goding, supra. Los inmunogenes que pueden emplearse incluyen

polipéptidos TAT purificados, proteínas de fusión que contengan polipéptidos TAT y células que expresen en su superficie polipéptidos TAT recombinantes. El experto en la materia puede seleccionar el inmunogén sin excesiva experimentación.

Los ratones, como los Balb/c, se inmunizan con el inmunogén de un TAT emulsionado en adyuvante de Freund completo y se inyectan por vía subcutánea o intraperitoneal en una cantidad entre 1 y 100 microgramos. Como alternativa, el inmunogén se emulsiona en adyuvante MPL-TDM (Ribi Immunochemical Research, Hamilton, MT) y se inyecta en las almohadillas plantares traseras del animal. Los ratones inmunizados se refuerzan posteriormente a los 10-12 días con inmunogén adicional emulsionado en el adyuvante seleccionado. A partir de entonces, y durante varias semanas, los ratones también pueden reforzarse con inyecciones adicionales de inmunización. Pueden obtenerse muestras de suero periódicamente de los ratones mediante hemorragia retro-orbital para realizar ensayos ELISA a fin de detectar anticuerpos anti-TAT.

Después de haberse detectado una titulación adecuada de anticuerpo, los animales "positivos" para los anticuerpos pueden recibir una inyección intravenosa final del TAT. Tres o cuatro días después, los ratones se sacrifican y se cultivan células del bazo. Las células del bazo se fusionan a continuación (utilizando polietilenglicol al 35%) con una línea celular seleccionada de mieloma murino, como P3X63AgU.1, disponible en la ATCC, nº CRL 1597. Las fusiones generan células de hibridoma que pueden colocarse después en placas de cultivo de tejido de 96 pozos con medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timinida) para inhibir la proliferación de células no fusionadas, híbridos de mieloma e híbridos de células del bazo.

Las células de hibridoma se exploran en un ensayo ELISA para determinar la reactividad contra el TAT. La determinación de células de hibridoma "positivas" que secreten los anticuerpos monoclonales contra el TAT deseados es conocida en la materia.

Las células de hibridoma positivas pueden inyectarse por vía intraperitoneal en ratones Balb/c singeneicos a fin de producir ascitos que contengan los anticuerpos monoclonales anti-TAT. Como alternativa, las células de hibridoma pueden desarrollarse en matraces o frascos rotativos para cultivos tisulares. La purificación de los anticuerpos monoclonales producidos en los ascitos puede lograrse utilizando precipitación en sulfato de amonio, seguida de cromatografía de exclusión en gel. Como alternativa, puede utilizarse cromatografía de afinidad basada en la unión del anticuerpo a la proteína A o G.

Empleando la técnica descrita anteriormente, se han generado 12 líneas celulares de hibridoma separadas y distintas, cada una de las cuales produce anticuerpos monoclonales que se unen al polipéptido TAT113 mostrado como SEQ ID NO:2. En la presente memoria descriptiva, se

hace referencia a estas 12 líneas celulares de hibridoma como 12E5.1.1 (que produce el anticuerpo monoclonal 12E5), 6G10.1.1 (que produce el anticuerpo monoclonal 6G10), 17C12.7.8 (que produce el anticuerpo monoclonal 17C12), 1B5.1.3 (que produce el anticuerpo monoclonal 1B5), 6H10.3.11 (que produce el anticuerpo monoclonal 6H10), 17H5.25.1 (que produce el anticuerpo monoclonal 17H5), 15B6.4.1 (que produce el anticuerpo monoclonal 15B6), 11A12.3.2 (que produce el anticuerpo monoclonal 11A12), 13A7.1.8 (que produce el anticuerpo monoclonal 13A7), 4D1.1.2.1 (que produce el anticuerpo monoclonal 4D1), 14A3.1.1 (que produce el anticuerpo monoclonal 14A3) y 10F11.11.11.11 (que produce el anticuerpo monoclonal 10F11). Se ha demostrado que los anticuerpos monoclonales producidos por estas 12 líneas de hibridoma se unen al polipéptido TAT113 mostrado como SEQ ID NO:2 usando técnicas bien conocidas que se emplean de forma rutinaria como el "Western blot", el análisis ELISA, el análisis de clasificación FACS de células que expresen el polipéptido TAT113 y/o el análisis inmunohistoquímico. De las 12 líneas de hibridoma que producen los anticuerpos monoclonales funcionales ant-TAT113, dos (clones de hibridoma 12E5.1.1 y 6G10.1.1) se han depositado bajo los términos del Tratado de Budapest en la American Tissue Type Collection (Colección Americana de Cultivos Tipo), Manassas, VA, tal como se describe más adelante con mayor detalle.

EJEMPLO 7: Análisis de unión competitiva y mapeado de epítopos

Los epítopos del TAT113 que están unidos por los anticuerpos monoclonales descritos se determinaron mediante análisis de unión competitiva estándar (Fendly y col., Cancer Research 50:1550-1558 (1990)). Se realizaron estudios de bloqueo cruzado en anticuerpos mediante fluorescencia directa en células PC3 intactas diseñadas para expresar TAT113 usando la máquina de exploración PANDEX™ Screen Machine a fin de cuantificar la fluorescencia. Cada anticuerpo monoclonal se conjugó con isotiocianato de fluoresceína (FITC), usando procedimientos establecidos (Wofsy y col., Selected Methods in Cellular Immunology, página 287, Mishel and Schiigi (eds.) San Francisco: W.J. Freeman Co. (1980)). Las monocapas confluyentes de células PC3 que expresaban un TAT113 se tripsinizaron, se lavaron en una ocasión y se suspendieron de nuevo a 1,75 x 10^6 células/ml en PBS frío que contenía albúmina sérica bovina al 0,5% (BSA) y NaN_3 al 0,1%. Se añadió una concentración final de partículas de látex al 1% (IDC, Portland, OR) para reducir la coagulación de las membranas de las placas de PANDEX™. Se añadieron células en suspensión, 20 μl, y 20 μl de anticuerpos monoclonales purificados (entre 100 μg/ml y 0,1 μg/ml) a los pozos de las placas de PANDEX™ y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Una dilución predeterminada de anticuerpos monoclonales marcados por FITC en 20 μl se añadió a cada pozo, se

incubó durante 30 minutos, se lavó y la fluorescencia se cuantificó mediante la máquina de exploración PANDEX™ Screen Machine. Se consideró que los anticuerpos monoclonales compartían un epítopo si cada uno de ellos bloqueaba la unión del otro en un 40% o más en comparación con un control de anticuerpos monoclonales irrelevantes y a la misma concentración de anticuerpos. En este experimento, los anticuerpos monoclonales 12E5, 17C12, 1B5, 6H10, 17H5, 15B6, 11A12, 13A7, 4D1, 14A3 y 10F11 se asignaron a los epítopos del TAT113 B, A, D, E, F, A, B, A, A, A y C, respectivamente. Utilizando este ensayo, cualquier experto corriente en la materia puede identificar otros anticuerpos monoclonales que se unen al mismo epítopo que los descritos anteriormentes.

EJEMPLO 8: Preparación de anticuerpos conjugados con toxinas que se unen a un TAT113

El uso de conjugados anticuerpo-fármaco (ADC), es decir, inmunoconjugados, para la administración local de agentes citotóxicos o citostáticos, es decir, los fármacos que se utilizan para matar o inhibir células tumorales en el tratamiento del cáncer (Payne (2003) Cancer Cell 3:207-212; Syrigos y Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614; Niculescu-Duvaz y Springer (1997) Adv. Drug Del. Rev. 26: 151 -172; patente de EE. UU. nº 4.975.278), permite administrar de forma dirigida la porción del fármaco a tumores y da lugar a la acumulación intracelular en éstos, donde la administración sistémica de estos agentes farmacológicos no conjugados puede resultar en niveles inaceptables de toxicidad tanto para las células normales como las tumorales que se intentan eliminar (Baldwin y col., (1986) Lancet (Mar. 15, 1986) páginas 603-05; Thorpe (1985) "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review" en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera y col. (eds.), páginas 475-506). Se busca entonces la máxima eficacia con la mínima toxicidad. Los esfuerzos para diseñar y refinar los ADC se han centrado en la selectividad de los anticuerpos monoclonales (Acsm), así como las propiedades para liberar y enlazarse con fármacos. Tanto los anticuerpos monoclonales como los policlonales se han descrito como útiles en estas estrategias (Rowland y col., (1986) Cancer Immunol. Immunother., 21:183-87). Algunos medicamentos empleados en estos métodos incluyen la daunomicina, la doxorrubicina, el metotrexato y la vindesina (Rowland y col., (1986) supra). Entre las toxinas empleadas en los conjugados anticuerpo-toxina se encuentran las toxinas bacterianas como la toxina de la difteria, las toxinas vegetales como la ricina, las toxinas de molécula pequeña como la geldanamicina (Mandler y col., (2000) J. of the Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581; Mandler y col. (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028; Mandler y col. (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791), maitansinoides (patente europea nº 1391213; Liu y col., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci.

USA 93:8618-8623) y caliqueamicina (Lode y col. (1998) Cancer Res. 58:2928; Hinman y col. (1993) Cancer Res. 53:3336-3342).

Las técnicas para producir conjugados anticuerpo-fármaco mediante el enlace de toxinas con anticuerpos purificados son bien conocidas y se emplean rutinariamente en la materia. Por ejemplo, la conjugación de un anticuerpo monoclonal purificado con la toxina DM1 puede conseguirse tal como se indica a continuación. Se realiza una derivación del anticuerpo purificado con N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato para introducir los grupos de ditiopiridilo. El anticuerpo (376,0 mg, 8 mg/ml) en 44,7 ml de 50 mM de tampón de fosfato de potasio (pH 6,5) que contiene 50 mM de cloruro de sodio y 1 mM de EDTA se trata con SPP (5,3 equivalentes molares en 2,3 ml de etanol). Después de la incubación durante 90 horas en argón a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtra en gel a través de una columna Sephadex G25 equilibrada con 35 mM de citrato de sodio, 154 mM de cloruro sódico y 2 mM de EDTA. Posteriormente, las fracciones que contienen anticuerpos se agrupan y ensayan. Los anticuerpos SPP-Py (337,0 mg con grupos de 2-tiopiridina liberables) se diluyen con los mencionados 35 mM de tampón de citrato de sodio, pH 6,5, a una concentración final de 2,5 mg/ml. Luego se agrega DM1 (1,7 equivalentes, 16,1 moles) en 3,0 mM de dimetilacetamida (DMA, 3% v/v en la mezcla de reacción final) a la solución del anticuerpo. Se deja que la reacción prosiga su curso a temperatura ambiente en argón durante 20 horas. La reacción se carga en una columna Sephacryl S300 de filtración en gel (5,0 cm x 90,0 cm, 1,77 l) equilibrada con 35 mM de citrato de sodio y 154 mM de NaCl, pH 6,5. La tasa de flujo es de 5,0 ml/min, y se toman 65 fracciones (de 20,0 ml cada una). Las fracciones se agrupan y ensayan, determinándose la cantidad de moléculas del fármaco DM1 enlazadas por molécula de anticuerpo (p') a través de la medición de la absorción a 252 nm y 280 nm.

Con fines ilustrativos, la conjugación de un anticuerpo monoclonal purificado con la toxina DM1 también puede conseguirse tal como se indica a continuación. Se realiza una derivación del anticuerpo purificado con (Succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (SMCC, Pierce Biotechnology, Inc) para introducir el enlazador SMCC. El anticuerpo se trata a 20 mg/ml en 50 mM de fosfato de potasio/50 mM de cloruro sódico/2 mM de EDTA, pH 6,5 con 7,5 equivalentes molares de SMCC (20 mM en DMSO, 6,7 mg/ml). Después de mezclar durante 2 horas en argón a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se filtra a través de una columna Sephadex G25 equilibrada con 50 mM de fosfato de potasio/50 mM de cloruro sódico/2 mM de EDTA, pH 6,5. Las fracciones que contienen anticuerpos se agrupan y ensayan. Entonces, el anticuerpo SMCC se diluye con 50 mM de fosfato de potasio/50 mM de cloruro sódico/2 mM de EDTA, pH 6,5 a una concentración final de 10 mg/ml, y se hace reaccionar con 10 mM de solución de DM1 (1,7

equivalentes asumiendo 5 SMCC/anticuerpo, 7,37 mg/ml) en dimetilacetamida. Se mezcla la reacción a temperatura ambiente en argón durante 16,5 horas. Luego se filtra la mezcla de reacción de la conjugación a través de una columna Sephadex G25 de filtración en gel (1,5 x 4,9 cm) con 1 PBS a un pH de 6,5. La proporción DM1/anticuerpo (p) se mide posteriormente mediante la absorción a 252 nm y 280 nm.

Los fármacos citotóxicos se han conjugado típicamente con anticuerpos a través de los frecuentemente numerosos residuos de lisina del anticuerpo. También se ha conseguido la conjugación a través de grupos tiol presentes o introducidos mediante ingeniería en el anticuerpo de interés. Por ejemplo, se han introducido residuos de cisteína en proteínas mediante técnicas de ingeniería genética a fir de formar sitios de unión covalente para ligandos (Better y col. (1994) J. Biol. Chem. 13:9644-9650; Bernhard y col. (1994) Bioconjugate Chem. 5:126-132; Greenwood y col. (1994) Therapeutic Immunology 1:247-255; Tu y col. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci USA 96:4862-4867; Kanno y col. (2000) J. of Biotechnology, 76:207-214; Chmura y col. (2001) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 98(15):8480-8484; patente de EE.UU. nº 6.248.564). Una vez ya existe un residuo de cisteína libre en el anticuerpo de interés, las toxinas pueden enlazarse con ese sitio. Como ejemplo, los reagentes enlazadores de fármacos maleimidocaproil-monometil auristatina E (MMAE), es decir, MC-MMAE, maleimidocaproil-monometil auristatina F (MMAF), es decir, MC-MMAF, MC-val-cit-PAB-MMAE o MC-val-cit-PAB-MMAF, disueltos en DMSO, se diluyen en acetonitrilo y agua a una concentración conocida y se añaden a un anticuerpo derivado de la cisteína enfriado en una solución salina tamponada de fosfato (PBS). Después de aproximadamente una hora, se agrega un exceso de maleimido para inhibir la reacción y cubrir cualquier grupo tiol del anticuerpo que no haya reaccionado. La mezcla de reacción se concentra mediante ultrafiltración centrífuga, y el anticuerpo conjugado con la toxina se purifica y se desalina por elución con resina G25 en PBS, se filtra a través de filtros de 0,2 m en condiciones estériles y se congela para su almacenamiento.

Además, una cisteína libre de un anticuerpo seleccionado puede modificarse por el reagente bis-maleimido BM(PEO)4 (Pierce Chemical), dejando un grupo maleimido sin reaccionar en la superficie del anticuerpo. Esto puede lograrse disolviendo BM(PEO)4 en una mezcla de 50% de etanol/agua a una concentración de 10 mM, agregando un exceso molar multiplicado por diez a una solución que contenga anticuerpos en una solución salina tamponada de fosfato a una concentración de aproximadamente 1,6 mg/ml (10 micromolar) y permitiendo que reaccione durante 1 hora. El exceso de BM(PEO)4 se elimina por filtración en gel en 30 mM de citrato, pH 6, con 150 mM de tampón de NaCl. Un DM1 con un exceso molar multiplicado aproximadamente por 10 se disuelve

en dimetil acetamida (DMA) y se agrega al intermediario anticuerpo-BMPEO. Asimismo, puede emplearse dimetil formamida (DMF) para disolver el reagente de la porción del fármaco. La mezcla de reacción se deja reaccionar en una PBS a lo largo de toda noche antes de aplicar la filtración en gel o diálisis a fin de eliminar el fármaco que no haya reaccionado. La filtración en gel en las columnas S200 en PBS se utiliza para eliminar los agregados de alto peso molecular y suministrar conjugados anticuerpo purificado-BMPEO-DM1.

Utilizando técnicas bien conocidas y rutinariamente empleadas descritas en la presente memoria descriptiva y cualquier otra parte, se conjugó un anticuerpo monoclonal anti-TAT 12E5 (preparado tal como se describe en el anterior Ejemplo 6 y depositado en la ATCC tal como se describe más adelante) con MC-val-cit-PAB-MMAE. El anticuerpo conjugado con una toxina se purificó y, en la presente memoria descriptiva, se le hace referencia como "12E5-MMAE".

EJEMPLO 9: Ensayos de eliminación de células *in vitro*

Pueden obtenerse células de mamíferos que expresen el polipéptido TAT de interés usando vectores de expresión y técnicas de clonación estándares. Alternativamente, muchas líneas celulares tumorales que expresan polipéptidos TAT de interés están públicamente disponibles, por ejemplo, a través de la ATCC y se pueden identificar de forma rutinaria mediante análisis ELISA o FACS estándar. Los anticuerpos monoclonales anti-polipéptidos TAT (y derivados de los mismos conjugados con toxinas) pueden entonces obtenerse en ensayos para determinar la capacidad del anticuerpo para eliminar células que expresen polipéptidos TAT *in vitro*.

Con relación específica a la presente invención, se creó mediante ingeniería una línea celular derivada de PC3 que expresa de forma estable el polipéptido TAT113 en la superficie de sus células (llamadas en la presente memoria descriptiva PC3-gD-MDP) usando técnicas estándar, y se confirmó la expresión del polipéptido TAT113 por parte de las células PC3-gD-MDP utilizando análisis estándar de clasificación celular FACS, ELISA e inmunohistoquímicos. La capacidad del anticuerpo monoclonal conjugado con MMAE, 12E5-MMAE, para causar la muerte de las células PC3-gD-MDP se determinó usando un ensayo *in vitro* de eliminación de células mediante el siguiente protocolo (Boletín Técnico de Promega Corp. TB288; Mendoza y col., (2002) Cancer Res. 62:5485-5488):

1. Una alícuota de 50 μl de cultivo celular que contenga alrededor de 10^4 células (ya sean PC3-gD-MDP o PC3 sin transfección que no expresen un TAT113) en medio de crecimiento se deposita en cada pozo de una placa de paredes opacas y 96 pozos. Se disponen pozos de control adicionales que contienen 50 μl de medio de crecimiento sin células.

2. Los anticuerpos 12E5-MMAE, o un anticuerpo monoclonal anti-interleucina-8 conjugado con MMAE que no se una a un TAT113, se añaden a cada pozo en un volumen de 50 µl y a diversas concentraciones que oscilan entre 0,0001 y 100 µg/ml, mientras que las placas se incuban a 37 °C CO_2 al 5% durante 3 ó 5 días.

3. Las placas se equilibran a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos.

4. Se añade un volumen del reagente de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo de Promega Corp. igual al volumen del medio de cultivo celular presente en cada pozo, y las placas se agitan durante 2 minutos en un agitador orbital a fin de inducir la lisis celular.

5. Las placas se incuban a temperatura ambiente durante 10 minutos para estabilizar la señal de luminiscencia.

6. La luminiscencia se registra en un luminómetro con Tropix Winglow Programand en unidades RLU (unidades de luminiscencia relativa).

Los resultados obtenidos en el ensayo anteriormente descrito demuestran que el anticuerpo 12E5-MMAE es capaz de inducir la muerte de células que expresen el polipéptido TAT113 de una forma que depende del anticuerpo. Más específicamente, ni el 12E5-MMAE ni el IL-8-MMAE inducen un nivel significativo de muerte de células PC3 sin transfectar a concentraciones de anticuerpos de 1 µg/ml e inferiores. A concentraciones de anticuerpos superiores a 1 µg/ml, la cantidad de células PC3 sin transfectar muertas aumenta linealmente con la concentración de anticuerpos y lo hace de una forma que no depende del anticuerpo. Por tanto, parece que la muerte de células PC3 sin transfectar a concentraciones de anticuerpos superiores a 1 µg/ml es un resultado no específico del aumento de los niveles de la toxina MMAE presente en la mezcla de reacción y no es una función de la especificidad de unión del anticuerpo empleado. No obstante, con relación a las células PC3-gD-MDP que expresan de forma estable el polipéptido TAT113, si bien el IL-8-MMAE induce la muerte celular con un patrón idéntico a la capacidad de ese anticuerpo para eliminar células PC3 sin transfectar, el 12E5-MMAE induce un nivel significativo de eliminación celular a concentraciones de anticuerpos tan bajas como de 0,001 µg/ml. De hecho, a una concentración de anticuerpos de 1 µg/ml (donde el anticuerpo IL-8-MMAE no específico para un TAT113 no exhibe un nivel significativo de eliminación celular), el 12E5-MMAE prácticamente mata todas las células PC3-gD-MDP. Como tales, estos datos demuestran que el anticuerpo monoclonal 12E5 se une al polipéptido TAT113 ya que se expresa en la superficie celular y es capaz de inducir la muerte de esas células a las cuales se une.

En un segundo experimento, el ensayo anteriormente descrito se empleó para determinar la capacidad del anticuerpo monoclonal 12E5-MMAE para matar *in vitro* células COLO205 derivadas

de cáncer de colon (células que los solicitantes han demostrado mediante análisis de clasificación celular FACS que expresan el polipéptido TAT113). En concordancia con los resultados presentados anteriormente para las líneas celulares derivadas de PC3, el IL-8-MMAE no comienza a exhibir un nivel significativo de eliminación de células COLO205 hasta que la concentración de anticuerpos es superior a 1 μg/ml, y dicho nivel aumenta linealmente con la concentración de anticuerpos de una forma que no depende del anticuerpo. Sin embargo, el anticuerpo monoclonal 12E5-MMAE comienza a inducir un nivel significativo de muerte de células COLO205 a concentraciones de anticuerpos tan bajas como de 0,1 μg/ml. De hecho, a una concentración de anticuerpos de 1 μg/ml (donde el anticuerpo IL-8-MMAE no específico para un TAT113 no exhibe un nivel significativo de eliminación celular), se observa un nivel muy significativo de eliminación de células COLO205 inducido por el 12E5-MMAE. Como tales, estos datos demuestran de nuevo que el anticuerpo monoclonal 12E5 se une al polipéptido TAT113 ya que se expresa en la superficie celular y es capaz de inducir la muerte de esas células a las cuales se une.

EJEMPLO 10: Ensayo de eliminación de células tumorales *in vivo*

A fin de probar la eficacia de los anticuerpos monoclonales anti-polipéptidos TAT conjugados con toxinas o sin conjugar con relación a la capacidad para inducir la muerte de células tumorales *in vivo*, se puede emplear el siguiente protocolo.

En primer lugar, se debe inocular a un grupo de ratones atímicos desnudos, por vía subcutánea en la zona de la ijada, una dosis de 5×10^6 células promotoras del tumor que expresa el polipéptido TAT. Cuando los tumores alcancen un volumen tumoral medio de entre 100 y 200 mm^3, los ratones quedarán agrupados a partes iguales en cinco grupos y se tratarán de la siguiente manera:

Grupo 1 – vehículo de control de PBS administrado una vez por semana durante 4 semanas;

Grupo 2 – anticuerpo de control no específico administrado a 1 mg/kg, una vez a la semana durante 4 semanas;

Grupo 3 – anticuerpo de control no específico administrado a 3 mg/kg, una vez a la semana durante 4 semanas;

Grupo 4 – anticuerpo anti-polipéptidos TAT específico administrado a 1 mg/kg, una vez a la semana durante 4 semanas;

Grupo 5 – anticuerpo anti-polipéptidos TAT específico administrado a 3 mg/kg, una vez a la semana durante 4 semanas.

El volumen tumoral medio puede entonces determinarse en los ratones de cada grupo de tratamiento a intervalos periódicos, y también puede determinarse la eficacia de los anticuerpos.

EJEMPLO 11: Uso de un TAT como sonda de hibridación

El siguiente método describo el uso de una secuencia de nucleótidos que codifica un TAT como sonda de hibridación para, por ejemplo, diagnosticar la presencia de un tumor en un mamífero.

El ADN que comprende la secuencia codificadora de longitud completa o un TAT maduro, tal como se detalla en la presente memoria descriptiva, puede emplearse también como sonda para explorar los ADN homólogos (como los que codifican las variantes de un TAT que se producen de forma natural) en bibliotecas de ADNc o genómicas de tejido humano.

La hibridación y el lavado de los filtros que contienen cualquiera de las bibliotecas de ADN se realizan bajo las siguientes condiciones de alta rigurosidad. La hibridación de la sonda derivada de un TAT radiomarcado con los filtros se efectúa en una solución de formamida al 50%, 5 SSC, SDS al 0,1%, pirofosfato de sodio al 0,1%, 50 mM de fosfato de sodio, pH 6,8, 2 porciones de solución de Denhardt y sulfato de dextrano al 10% a 42 °C durante 20 horas. El lavado de los filtros se lleva a cabo en una solución acuosa de 0,1 SSC y SDS al 0,1% a 42 °C.

Los ADN que tienen una identidad de secuencia deseada de los ADN que codifican un TAT de secuencia nativa y longitud completa pueden entonces identificarse mediante técnicas estándar conocidas en la materia.

EJEMPLO 12: Expresión de un TAT en *E. coli*

Este ejemplo ilustra la preparación de una forma no glicosilada de un TAT mediante expresión recombinante en *E. coli*.

La secuencia de ADN que codifica el TAT se amplifica inicialmente utilizando cebadores de la PCR seleccionados. Los cebadores deberían contener sitios de enzimas de restricción que se correspondan con los sitios de enzimas de restricción en el vector de expresión seleccionado. Se pueden emplear diversos vectores de expresión. Un ejemplo de un vector apropiado es pBR322 (derivado de *E. coli*; véase Bolivar y col., Gene, 2:95 (1977)), que contiene genes para resistencia a ampicilina y tetraciclina. El vector se digiere mediante una enzima de restricción y se desfosforila. Las secuencias amplificadas mediante PCR se ligan entonces al vector. El vector incluirá, preferentemente, secuencias que codifiquen un gen de resistencia a antibióticos, un promotor trp, un líder polihis (incluidos los seis primeros codones STII, la secuencia polihis y el sitio de escisión de la enteroquinasa), la región codificadora de un TAT, el terminador de la transcripción lambda y un gen argU.

La mezcla del ligado se utiliza, entonces, para transformar una cepa seleccionada de *E. coli* utilizando los métodos descritos en Sambrook y col., supra. Los transformadores se identifican por su capacidad para cultivarse en placas LB y se seleccionan, entonces, colonias resistentes a antibióticos. El ADN del plásmido se puede aislar y confirmar mediante análisis de restricción y secuenciación de ADN.

Se pueden cultivar, durante toda la noche, los clones seleccionados en un medio de cultivo líquido, como caldo de LB enriquecido con antibióticos. Este cultivo se puede utilizar a continuación para inocular un cultivo de escala más amplia. Entonces, se cultivan las células hasta que alcancen la densidad óptica deseada, durante la cual se activa el promotor de expresión.

Tras cultivar las células durante varias horas más, éstas se pueden recoger mediante centrifugación. El pellet de células obtenido mediante centrifugación se puede solubilizar utilizando diversos agentes conocidos en la materia, y la proteína solubilizada del TAT se puede purificar, entonces, utilizando una columna quelante de metales en condiciones que permiten una estrecha unión de la proteína.

El TAT se puede expresar en *E. coli* en una forma señalizada con poli-His, utilizando el procedimiento que se describe a continuación. El ADN que codifica el TAT se amplifica inicialmente utilizando cebadores de la PCR seleccionados. Los cebadores contendrán sitios de enzimas de restricción que se correspondan con los sitios de enzimas de restricción en el vector de expresión seleccionado, y otras secuencias útiles que proporcionen un inicio de la traducción eficaz y seguro, una purificación rápida en una columna quelante de metales y la extracción proteolítica con enteroquinasa. Las secuencias señalizadas con poli-His y amplificadas mediante PCR se ligan, entonces, a un vector de expresión, que se utiliza para transformar un huésped *E. coli* basado en la cepa 52 (W3110 fuhA(tonA) lon galE rpoHts(htpRts) clpP(lacIq). Los transformadores se cultivan primero en LB que contenga 50 mg/ml de carbenicilina a 30 °C con agitación hasta alcanzar una O.D.600 de 3-5. A continuación, se diluyen los cultivos entre 50 y 100 veces en un medio de cultivo CRAP (preparado mediante la mezcla de 3,57 g de $(NH_4)_2SO_4$, 0,71 g de citrato sódico 2H2O, 1,07 g de KCl, 5,36 g de extracto de levadura Difco, 5,36 g de hicasa SF de Sheffield en 500 ml de agua, así como 110 mM de MPOS, pH 7,3, glucosa al 0,55% (p/v) y 7 mM de $MgSO_4$) y se cultivan durante aproximadamente 20-30 horas a 30 °C con agitación. Se retiran muestras para verificar la expresión mediante análisis SDS-PAGE, y el cultivo en masa se centrifuga para obtener los pellets de células. Éstos se congelan hasta que se purifican y se repliegan.

La pasta de *E. coli* obtenida de fermentaciones de entre 0,5 y 1 l (pellets de 6-10 g) se vuelve a suspender en 10 volúmenes (w/v) en 7 M de guanidina y un tampón de 20 mM de Tris con pH 8.

Se añade sulfito sódico y tetrationato sódico sólido para conseguir concentraciones finales de 0,1 y 0,02 M, respectivamente, y la solución se agita a lo largo de toda la noche a 4 °C. Este paso da como resultado una proteína desnaturalizada con todos los residuos de cisteína bloqueados por sulfitolización. La solución se centrifuga 40.000 rpm en una ultracentrífuga Beckman durante 30 minutos. El sobrenadante se diluye con 3-5 volúmenes de tampón en columna quelante de metales (6 M de guanidina, 20 mM de Tris, pH 7,4) y se filtra a través de filtros de 0,22 micrones para clarificación. El extracto clarificado se carga en una columna quelante de metales Ni-NTA de Quiagen de 5 ml equilibrada en el tampón en columna quelante de metales. La columna se lava con un tampón adicional que contiene 50 mM de imidazola (Calbiochem, Utrol grade), pH 7,4. La proteína se eluye con un tampón que contiene 250 mM de imidazola. Las fracciones que contienen la proteína deseada se agrupan y almacenan a 4 °C. La concentración de proteínas se calcula por su absorción a 280 nm usando el coeficiente calculado de extinción sobre la base de su secuencia de aminoácidos.

Las proteínas se repliegan mediante dilución lenta de la muestra en un tampón recién preparado para realizar repliegues, formado por: 20 mM Tris, pH 8.6, 0.3 M NaCl, 2.5 M urea, 5 mM cysteine, 20 mM glycine and 1 mM EDTA.20 mM de Tris, pH 8,6, 0,3 M de NaCl, 2,5 M de urea, 5 mM de cisteína, 20 mM de glicina y 1 mM de EDTA. Se seleccionan los volúmenes que se plieguen de nuevo para que la concentración final de proteínas sea de entre 50 y 100 microgramos/ml. La solución de repliegue se agita suavemente a 4 °C durante 12-36 horas. La adición de TFA inhibe la reacción de repliegue a una concentración final del 0,4% (pH de aproximadamente 3). Antes de seguir purificando más la proteína, la solución se filtra a través de un filtro de 0,22 micrones y se añade acetonitrilo a una concentración final de entre un 2 y un 10%. La proteína replegada se somete a cromatografía en una columna de fase inversa Poros R1/H, utilizando un tampón móvil de 0,1% de TFA con elución con un gradiente de entre un 10 y un 80% de acetonitrilo. Se analizan en geles de poliacrilamida con SDS las partes alicuotas de las fracciones que absorban A280, y se agrupan las fracciones que contengan proteínas replegadas homogéneas. Por lo general, las especies correctamente replegadas de la mayoría de las proteínas se eluyen a las concentraciones más bajas de acetonitrilo, puesto que dichas especies son las más compactas con sus interiores hidrófobos protegidos de la interacción con la resina de fase inversa. Las especies agregadas se suelen eluir a concentraciones más elevadas de acetonitrilo. Además de resolver las formas mal plegadas de proteínas de la forma deseada, el paso de la fase inversa también elimina las endotoxinas de las muestras. Las fracciones que contienen el polipéptido TAT plegado deseado se agrupan, y el acetonitrilo se elimina mediante un suave chorro de nitrógeno dirigido hacia la

solución. Las proteínas se formulan en 20 mM de Hepes, pH 6,8 con 0,14 M de cloruro sódico y un 4% de manitol mediante diálisis o filtración en gel, utilizando resinas G25 Superfine (Pharmacia) equilibradas en el tampón de la formulación y con filtración estéril.

EJEMPLO 13: Expresión de un TAT en células de mamíferos

Este ejemplo ilustra la preparación de una forma potencialmente glicosilada de un TAT mediante expresión recombinante en células de mamíferos.

El vector pRK5 (véase la patente europea nº 307.247, publicada el 15 de marzo de 1989) se emplea como vector de expresión. Opcionalmente, el ADN del TAT se liga a pRK5 con enzimas de restricción seleccionadas para permitir la inserción del ADN del TAT utilizando métodos de ligado como el descrito en Sambrook y col., supra. El vector resultante se llama pRK5-TAT.

En una realización, las células huésped seleccionadas pueden ser células 293. Las células 293 humanas (ATCC CCL 1573) se desarrollan para confluir en placas de cultivo tisular en medios de cultivo como DMEM enriquecido con suero fetal de ternero y, opcionalmente, nutrientes y/o antibióticos. Se mezclan alrededor de 10 μg de ADN de pRK5-TAT con alrededor de 1 μg del ADN que codifica el gen VA ARN [Thimmappaya y col., Cell, 31:543 (1982)] y se disuelven en 500 μg de 1 mM de Tris-HCl, 0,1 mM de EDTA y 0,227 M de $CaCl_2$. A esta mezcla se añaden, gota a gota, 500 μl de 50 mM de HEPES (pH 7,35), 280 mM de NaCl, 1,5 mM de $NaPO_4$ y se deja que se forme un precipitado durante 10 minutos a 25 °C. El precipitado se suspende y se añade a las células 293 y se deja reposar duante unas cuatro horas a 37 °C. Se aspira el medio de cultivo y se añaden 2 ml de glicerol al 20% en PBS durante 30 segundos. A continuación, se lavan las células 293 con un medio de cultivo libre de suero, se añade un nuevo medio de cultivo y las células se incuban durante unos 5 días.

Aproximadamente 24 horas después de las transfecciones, se extrae el medio de cultivo y se sustituye por un medio de cultivo sólo o uno que contenga 200 μCi/ml de ^{35}S-cisteína y 200 μCi/ml de ^{35}S-metionina. Después de 12 horas de incubación, el medio condicionado se recoge, se concentra en un filtro rotatorio y se carga en un gel con SDS al 15%. El gel procesado puede secarse y exponerse para que forme una película durante un período de tiempo seleccionado a fin de revelar la presencia del polipéptido TAT. Los cultivos que contienen células transfectadas pueden someterse a una nueva incubación (en un medio de cultivo libre de suero) y el medio de cultivo se analiza mediante bioensayos seleccionados.

En una técnica alternativa, el TAT puede introducirse en células 293 utilizando de forma transitoria el método de sulfato de dextrano descrito por Somparyrac y col., Proc. Natl. Acad. Sci.,

12:7575 (1981). Las células 293 se desarrollan hasta su densidad máxima en un matraz giratorio y se añaden 700 μg de ADN de pRK5-TAT. Las células se concentran primero desde el matraz giratorio mediante centrifugación y se lavan con PBS. El precipitado ADN-dextrano se incuba en el pellet de células durante 4 horas. Las células se tratan con glicerol al 20% durante 90 segundos, se lavan con un medio de cultivo tisular y se introducen de nuevo en el matraz giratorio que contiene medio de cultivo tisular, 5 μg/ml de insulina bovina y 0,1 μg/ml de transferrina bovina. Después de unos 4 días, los medios condicionados se centrifugan y filtran para extraer células y los desechos. La muestra que contiene el TAT expresado se puede entonces concentrar y purificar mediante cualquier método seleccionado, como diálisis y/o cromatografía en columna.

En otra realización, el TAT se puede expresar en células CHO. El pRK5-TAT se puede transfectar en células CHO utilizando reagentes conocidos como $CaPO_4$ o DEAE-dextrano. Tal como se ha descrito anteriormente, los cultivos celulares se pueden incubar y el medio se puede sustituir por medio de cultivo sólo o uno que contenga un radiomarcador como ^{35}S-metionina. Tras determinar la presencia del polipéptido TAT, el medio de cultivo puede ser sustituido por un medio de cultivo sin suero. Preferentemente, los cultivos se incuban durante unos 6 días y, luego, se recoge el medio condicionado. El medio que contiene el TAT expresado se puede entonces concentrar y purificar utilizando cualquier método seleccionado.

El TAT señalizado con epítopos puede expresarse también en células huésped CHO. El TAT se puede subclonar a partir del vector pRK5. El subclón insertado puede someterse a una PCR para fusionarse en la estructura con un señalizador del epítopo seleccionado, como un señalizador poli-his en un vector de expresión de Baculovirus. El TAT señalizado con poli-his insertado se puede subclonar entonces en un vector dirigido por SV40 que contenga un marcador de selección como DHFR para la selección de clones estables. Por último, las células CHO se pueden transfectar (tal como se ha descrito anteriormente) con el vector dirigido por SV40. Se puede llevar a cabo la marcación, tal como se ha descrito anteriormente, para verificar la expresión. El medio de cultivo que contenga el TAT señalizado con poli-His expresado se puede entonces concentrar y purificar mediante cualquier método seleccionado, como cromatografía de afinidad con Ni^{2+}-quelato.

El TAT también se puede expresar en células CHO y/o COS mediante un procedimiento de expresión transitoria o en células CHO mediante otro procedimiento de expresión estable.

La expresión estable en células CHO se realiza utilizando el procedimiento que se indica a continuación. Las proteínas se expresan como una construcción de IgG (inmunoadhesina), en que las secuencias codificadoras para las formas solubles (por ejemplo, los dominios extracelulares) de las

proteínas respectivas se fusionan con una secuencia de la región constante de IgG1 que contiene los dominios bisagra, CH2 y CH2 y/o es una forma señalizada con poli-His.

Tras la amplificación mediante PCR, los ADN respectivos se subclonan en un vector de expresión de CHO utilizando técnicas estándar como se describe en Ausubel y col., Current Protocols of Molecular Biology, Unidad 3.16, John Wiley and Sons (1997). Los vectores de expresión de CHO se construyen para que tengan sitios de restricción compatibles 5' y 3' del ADN de interés, con el fin de permitir la entrada y salida cómoda de los ADNc. La expresión usada por el vector en células CHO es la descrita en Lucas y col., Nucl. Acids Res. 24:9 (1774-1779 (1996), y utiliza el promotor temprano/potenciador de SV40 para dirigir la expresión del ADNc de interés y la dihidrofolato reductasa (DHFR). La expresión de la DHFR permite la selección de un mantenimiento estable del plásmido tras la transfección.

Se introducen 12 microgramos del ADN del plásmido deseado en aproximadamente 10 millones de células CHO utilizando reagentes para transfección comercializados como SUPERFECTt® (Quiagen), DOSPER® o FUGENE® (Boehringer Mannheim). Las células se cultivan como se describe en Lucas y col., supra. Se congelan aproximadamente 3 x 10^7 células en una ampolla para su posterior cultivo y producción tal como se describe a continuación.

Las ampollas que contienen el ADN del plásmido se descongelan colocándolas en un baño de agua y se mezclan mediante agitación en un vórtice. El contenido se transfiere con pipeta a un tubo de centrifugado que contiene 10 ml de medio de cultivo y se centrifuga a 1.000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se aspira, y las células se suspenden de nuevo en 10 ml de medio selectivo (0,2 µm de PS20 filtrado con 0,2 µm de suero fetal bovino diafiltrado al 5%). Luego, las células se separan en partes alícuotas en un matraz rotatorio de 100 ml que contenga 90 ml de medio selectivo. Tras 1-2 días, las células se transfieren a un matraz rotatorio de 250 ml lleno de 150 ml de medio de cultivo selectivo y se incuban a 37 °C. Después de otros 2-3 días, se siembran matraces rotatorios de 250, 500 y 2.000 ml con 3 x 10^5 células/ml. El medio celular se cambia por un medio nuevo mediante centrifugación y resuspensión en el medio de producción. Aunque se puede utilizar cualquier medio CHO apropiado, se puede utilizar en realidad un medio de producción descrito en la patente de EE.UU. nº 5.122.469, publicada el 16 de junio de 1992. Se siembra un matraz rotatorio de producción de 3 ml con 1,2 x 10^6 células/ml. El día 0, se determina el pH de las células. El día 1, se toman muestras del matraz rotatorio y se inicia la extracción con aire filtrado. El día 2, se toman muestras del matraz, se modifica la temperatura a 33 °C y se toman 30 ml de 500 gr/l de glucosa y 0,6 ml de antiespuma al 10% (por ejemplo, emulsión de polidimetilsiloxano al 35%, emulsión homologada para uso médico Dow Corning 365). Durante todo el proceso de producción, se va

R88

ajustando el pH según sea necesario para mantenerlo en torno a 7,2. Después de 10 días, o hasta que la viabilidad caiga por debajo del 70%, el cultivo celular se recoge mediante centrifugación y se filtra a través de un filtro de 0,22 μm. El producto resultante de la filtración se almacenó a 4 °C o se cargó inmediatamente en columnas para su purificación.

Para las construcciones señalizadas con poli-His, las proteínas se purifican utilizando una columna Ni-NTA (Qiagen). Antes de la purificación, se añade imidazola al medio condicionado a una concentración de 5 mM. El medio condicionado se bombea en una columna Ni-NTA de 6 ml equilibrada en un tampón de 20 mM de Hepes, pH 7,4, que contiene 0,3 M de NaCl y 5 mM de imidazola a una tasa de flujo de 4-5 ml/min a 4 °C. Tras la carga, se lava la columna con tampón de equilibrio adicional y se eluye la proteína con tampón de equilibrio que contiene 0,25 M de imidazola. La proteína altamente purificada se desaliniza entonces en un tampón de almacenamiento que contiene 10 mM de Hepes, 0,14 M de NaCl y manitol al 4%, pH 6,8, con una columna G25 Superfine (Pharmacia) de 25 ml y se almacena a -80 °C.

Las construcciones de inmunoadhesina (que contienen Fc) se purifican del medio condicionado tal como se indica a continuación. El medio condicionado se bombea en una columna con 5 ml de Proteína A (Pharmacia) que se ha equilibrado en un tampón de 20 mM de fosfato de sodio, pH 6,8. Tras la carga, la columna se lava a fondo con un tampón de equilibrio antes de la elución con 100 mM de ácido cítrico, pH 3,5. La proteína eluída se neutraliza inmediatamente recogiendo fracciones de 1 ml en tubos que contienen 275 μL de un tampón de 1 M de Tris, pH 9. La proteína altamente purificada se desaliniza a continuación en un tampón de almacenamiento como se ha descrito anteriormente para las proteínas señalizadas con poli-His. La homogeneidad se evalúa mediante geles de poliacrilamida en SDS y mediante secuenciación de aminoácidos en el extremo N-terminal por degradación de Edman.

EJEMPLO 14: Expresión de un TAT en levadura

El método siguiente describe la expresión recombinante de un TAT en levadura.

En primer lugar, se forman los vectores de expresión de la levadura para la producción intracelular o secreción de un TAT a partir del promotor de ADH2/GAPDH. El ADN que codifica el TAT y el promotor se insertan en sitios adecuados de enzimas de restricción en el plásmido seleccionado a fin de dirigir la expresión intracelular del TAT. Para la secreción, el ADN que codifica el TAT puede clonarse en el plásmido seleccionado, junto con el ADN que codifica el promotor de ADH2/GAPDH, un péptido de señal de un TAT nativo u otros péptidos de señal de

mamíferos, o, por ejemplo, un factor alfa de la levadura o una secuencia líder/de señal de secreción de la invertasa y secuencias enlazadoras (si fuesen necesarias) para la expresión del TAT.

Las células de levadura, como la cepa de levadura AB110, pueden entonces transformarse con los plásmidos de expresión descritos anteriormente y cultivarse en un medio de fermentación seleccionado. Los sobrenadantes de levadura transformados pueden analizarse por precipitación con ácido tricloroacético al 10% y separación mediante SDS-PAGE, seguido de una tinción de los geles con tinte azul de Coomassie.

El TAT recombinante puede aislarse y purificarse posteriormente retirando las células de levadura del medio de fermentación mediante centrifugación y después concentrando el medio a través de filtros con cartucho seleccionados. El concentrado que contiene el TAT puede purificarse aún más usando resinas de cromatografía en columna seleccionadas.

EJEMPLO 15: Expresión de un TAT en células de insectos infectadas con Baculovirus

El método siguiente describe la expresión recombinante de un TAT en células de insectos infectadas con Baculovirus.

La secuencia codificadora para el TAT se fusiona en la zona ascendente de un señalizador de epítopos incluido en el vector de expresión de un baculovirus. Estos señalizadores de epítopos incluyen señalizadores poli-his y de inmunoglobulina (como las regiones Fc de la IgG). Se pueden emplear diversos plásmidos, incluyendo los derivados de plásmidos comercializados como pVL1393 (Novagen). En resumen, la secuencia que codifica el TAT o la porción deseada de la secuencia codificadora del TAT, como la secuencia que codifica un dominio extracelular de una proteína transmembrana o la que codifica la proteína madura si ésta es extracelular, se amplifica mediante PCR con cebadores complementarios de las regiones 5' y 3'. El cebador de la posición 5' puede incorporar sitios laterales de enzimas de restricción (seleccionadas). El producto se digiere entonces con esas enzimas de restricción seleccionadas y se subclona en el vector de expresión.

El baculovirus recombinante se genera cotransfectando el plásmido anterior y el ADN del virus BACULOGOLD™ (Pharmingen) en células (ATCC CRL 1711) de *Spodoptera frugiperda* ("Sf9") usando lipofectina (comercializada por GIBCO-BRL). Después de 4 ó 5 días de incubación a 28 °C, los virus liberados se recogen y se utilizan para realizar más amplificaciones. La infección viral y la expresión proteínica se llevan a cabo tal como describen O'Reilley y col., Baculovirus expression vectors: A Laboratory Manual, Oxford: Oxford University Press (1994).

El TAT señalizado con poli-His expresado puede entonces purificarse, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad con Ni^{2+}-quelato tal como se indica a continuación. Los

extractos se preparan a partir de células Sf9 infectadas con virus recombinante tal como describen Rupert y col., Nature, 362:175-179 (1993). En resumen, las células Sf9 se lavan, se vuelven a suspender en tampón de sonicación (25 mL de Hepes, pH 7,9; 12,5 mM de $MgCl_2$; 0,1 mM de EDTA; glicerol al 10%; NP-40 al 0,1%; 0,4 M de KCl) y se sonican dos veces en hielo durante 20 segundos. Los sonicados se aclaran por centrifugación, y el sobrenadante se diluye 50 veces en un tampón de carga (50 mM de fosfato, 300 mM de NaCl, glicerol al 10%, pH 7,8) y se filtra a través de un filtro de 0,45 µm. Se prepara una columna de Ni^{2+}-NTA agarosa (comercializada por Qiagen) con un volumen de poso de 5 ml, se lava con 25 ml de agua y se equilibra con 25 ml de un tampón de carga. El extracto celular filtrado se carga en la columna a razón de 0,5 ml por minuto. La columna se lava con un tampón de carga para alcanzar el valor de referencia inicial A_{280}, en cuyo punto comienza la recogida de fracciones. A continuación, la columna se lava en un tampón de lavado secundario (50 mM de fosfato; 300 mM de NaCl, glicerol al 10%, pH 6,0), que eluye la proteína unida de forma no específica. Tras alcanzar de nuevo el valor de referencia inicial A_{280}, la columna se desarrolla con un gradiente de entre 0 y 500 mM de imidazola en el tampón de lavado secundario. Se recogen fracciones de 1 ml y se analizan mediante SDS-PAGE y tinción de plata o "Western blot" con alcalina fosfatasa conjugada con Ni^{2+}-NTA (Qiagen). Las fracciones que contienen el TAT eluido señalizado con His_{10} se agrupan y dializan con el tampón de carga.

Alternativamente, la purificación del TAT señalizado con IgG (o Fc) se puede realizar usando técnicas conocidas de cromatografía, incluyendo por ejemplo cromatografía en columnas de proteína A o G.

EJEMPLO 16: Purificación de polipéptidos TAT usando anticuerpos específicos

Los polipéptidos TAT nativos o recombinantes pueden purificarse mediante diversas técnicas estándar en la materia de purificación proteínica. Por ejemplo, un polipéptido pro-TAT, un polipéptido TAT maduro o un polipéptido pre-TAT puede purificarse por cromatografía de inmunoafinidad usando anticuerpos específicos para el polipéptido TAT de interés. En general, se construye una columna de inmunoafinidad emparejando de forma covalente el anticuerpo anti-polipéptido TAT con una resina cromatográfica activada.

Se preparan inmunoglobulinas policlonales a partir de sueros inmunes bien por precipitación con sulfato de amonio o purificación en proteína A inmovilizada (Pharmacia LKB Biotechnology, Piscataway, N.J.). De forma similar, se preparan anticuerpos monoclonales a partir de fluido de ascitos de ratones por precipitación con sulfato de amonio o cromatografía en proteína A inmovilizada. Se añade de forma covalente inmunoglobulina parcialmente purificada a una resina

cromatográfica como SEPHAROSE™ activada con CnBr (Pharmacia LKB Biotechnology). El anticuerpo se empareja con la resina, ésta se bloquea y la resina derivada se lava de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Dicha columna de inmunoafinidad se utiliza en la purificación de un polipéptido TAT preparando una fracción de células que contengan el polipéptido TAT en una forma soluble. Esta preparación se deriva por solubilización de toda la célula o una fracción subcelular obtenida a través de centrifugación diferencial mediante la adición de detergente o por otros métodos bien conocidos en la materia. Alternativamente, el polipéptido TAT soluble que contiene una secuencia de señal puede secretarse en cantidades útiles en el medio donde se desarrollan las células.

Se traspasa a la columna de inmunoafinidad una preparación soluble que contiene el polipéptido TAT, y la columna se lava en condiciones que permitan la absorción preferencial del polipéptido TAT (*por ejemplo*, tampones de alta potencia iónica en presencia de detergente). Entonces, la columna se eluye en condiciones que interrumpan la unión del anticuerpo y el polipéptido TAT (*por ejemplo*, un tampón con un pH bajo, aproximadamente de 2-3, o una concentración alta de un caotropo como un ión de urea o tiocianato), y el polipéptido TAT se recoge.

Depósito de materiales

Los siguientes materiales se han depositado en la American Type Culture Collection (Colección Americana de Cultivos Tipo), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, EE.UU. (ATCC):

Tabla 7

Material depósito	Nº de depósito en la ATCC	Fechade
Línea celular de hibridoma 12E5.1.1	PTA-6625	3 de marzo de 2005
Línea celular de hibridoma 6G10.1.1	PTA-6623	3 de marzo de 2005

Estos depósitos se realizaron de acuerdo con las disposiciones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento internacional del depósito de microorganismos para el procedimiento en materia de patentes y las regulaciones del mismo (Tratado de Budapest). Esto asegura el mantenimiento de un cultivo viable del depósito durante 30 años a partir de la fecha de depósito. La ATCC pondrá a disposición los depósitos según los términos del Tratado de Budapest y con sujeción a un acuerdo entre Genentech, Inc. y la ATCC, que garantiza la disponibilidad permanente e ilimitada al público de la progenie del cultivo del depósito una vez concedida la patente de EE.UU. pertinente o una vez que se haga pública cualquier solicitud de patente de EE.UU. o extranjera, lo que ocurra primero, y asegura la disponibilidad de la progenie a la persona que determine el Comisionado de Patentes y

Marcas Registradas de EE.UU. para que tenga derecho a la misma, en función del artículo 122 del Título 35 del Código de EE.UU. (35 USC § 122) y las normas del Comisionado de acuerdo con lo anterior (incluyendo el artículo 1.14 del Título 37 del Código de Normas Federales (37 CFR § 1.14), con especial referencia a 886 OG 638).

El cesionario de la presente solicitud ha acordado que, en caso de que un cultivo de los materiales en depósito muera, se pierda o se destruya mientras se cultiva en condiciones adecuadas, los materiales se reemplazarán de inmediato por otros iguales una vez notificados los hechos. La disponibilidad de los materiales depositados no debe interpretarse como una licencia para practicar la invención contraviniendo los derechos otorgados por la autoridad de cualquier gobierno, de acuerdo con sus leyes de patentes.

Se considera que lo expuesto hasta el momento en la presente memoria descriptiva es suficiente para permitir que un experto en la materia practique la invención. La presente invención no tiene un ámbito de aplicación limitado por la construcción depositada, dado que el objetivo de la realización depositada es ilustrar determinados aspectos de la invención y cualquier construcción funcionalmente equivalente está dentro del ámbito de aplicación de esta invención. El depósito de material de la presente memoria descriptiva no constituye reconocimiento alguno de que la descripción escrita contenida en la misma no sea suficiente para permitir la práctica de cualquier aspecto de la invención, incluyendo el mejor modo de la misma, ni se interpretará de forma que limite el ámbito de aplicación de las reivindicaciones para las ilustraciones específicas que representa. De hecho, varias modificaciones de la invención, además de las mostradas y descritas en la presente memoria descriptiva, serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior y se encuentran dentro del ámbito de aplicación de las reivindicaciones incluidas más adelante.

CAPITULO
REIVINDICATORIO
PRESENTADO EN FASE
NACIONAL

LAS REIVINDICACIONES SON:

1. Ácido nucleico aislado que comprende:

(a) una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO:2;

(b) una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO:2, careciendo de su péptido de señal asociado;

(c) una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio extracelular del polipéptido mostrado como SEQ ID NO:2;

(d) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1;

(e) la región codificadora de longitud completa de la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:1; o

(f) el complemento de (a), (b), (c), (d) o (e).

2. Un vector de expresión que comprende el ácido nucleico de la Reivindicación 1.

3. El vector de expresión de la Reivindicación 2, donde dicho ácido nucleico se enlaza de forma operable para controlar secuencias reconocidas por una célula huésped transformada con el vector.

4. Una célula huésped que contiene el vector de expresión de la Reivindicación 2.

5. La célula huésped de la Reivindación 4, que es de CHO, *E. coli* o levadura.

6. Un proceso para producir un polipéptido que consiste en cultivar la célula huésped de la Reivindicación 4 bajo condiciones adecuadas para la expresión de dicho polipéptido y recuperar a éste del cultivo celular.

FIGURA 1

GGCGTGGGAGCTGCCTAGGCCGGGCCCTGCCAGGGAGCAAGTCTGCATCGCAGAGGCC
AGGGCAGAGTGGCTCCTCACAGCCTGAAGCTCATCCTTCTGCACGGGCCAGCCAGGCC
AGCACAGAGGCACCAGGGCAGCAGTGCACACAGGTCCCCGGGGACCCCACC**ATG**TGG
AGCGGATGGTGGCTGTGGCCCCTTGTGGCCGTCTGCACTGCAGACTTCTTTCGGGACGA
GGCAGAGAGGATCATGAGGGACTCCCCTGTCATTGATGGGCACAATGACCTCCCCTGG
CAGCTGCTGGATATGTTCAACAACCGGCTGCAGGACGAGAGGGCCAACCTGACCACCT
TGGCCGGCACACACACCAACATCCCCAAGCTGAGGGCCGGCTTTGTGGGAGGCCAGTT
CTGGTCCGTGTACACGCCCTGCGACACCCAGAACAAAGACGCCGTGCGGAGGACGCTG
GAGCAGATGGACGTGGTCCACCGCATGTGCCGGATGTACCCGGAGACCTTCCTGTATGT
CACCAGCAGTGCAGGCATTCGGCAGGCCTTCCGGGAAGGGAAGGTGGCCAGCCTGATC
GGCGTGGAGGGCGGCCACTCCATTGACAGCAGTTTGGGCGTCCTGCGGGCACTCTATCA
GCTGGGCATGCGGTACCTGACCCTCACCCACAGCTGCAACACGCCCTGGGCTGACAACT
GGCTGGTGGACACGGGAGACAGCGAGCCCCAGAGCCAAGGCTTGTCACCCTTTGGGCA
GCGTGTGGTGAAGGAGCTGAACCGTCTGGGGGTCCTCATCGACTTGGCTCACGTGTCTG
TGGCCACCATGAAGGCCACCCTGCAGCTGTCCAGAGCCCCGGTCATCTTCAGCCACTCC
TCGGCCTACAGCGTGTGCGCAAGCCGGCGCAACGTGCCTGACGACGTCCTGAGGCTGG
TGAAACAGACAGACAGCCTGGTGATGGTGAACTTCTACAACAATTACATTTCCTGCACC
AACAAGGCCAACCTGTCCCAAGTGGCCGACCATCTGGATCACATCAAGGAGGTGGCAG
GAGCCAGAGCCGTGGGTTTTGGTGGGGACTTTGATGGTGTTCCAAGGGTCCCTGAGGGG
CTGGAGGACGTCTCCAAGTATCCAGACCTGATCGCTGAGCTGCTCAGGAGGAACTGGA
CGGAGGCGGAGGTCAAGGGCGCACTGGCTGACAACCTGCTGAGGGTCTTCCAGGCTGT
GGAACAGGCCAGCAACCTCACACAGGCTCCCGAGGAGGAGCCCATCCCGCTGGACCAG
CTGGGTGGCTCCTGCAGGACCCATTACGGCTACTCCTCTGGGGCTTCCAGCCTCCATCG
CCACTGGGGGCTCCTGCTGGCCTCCCTCGCTCCCCTGGTCCTCTGTCTGTCTCTCCTG**TG**
AAACCTGGGAGACCAGAGTCCCCTTTAGGGTTCCCGGAGCTCCGGGAAGACCCGCCCA
TCCCAGGACTCCAGATGCCAGGAGCCCTGCTGCCCACATGCAAGGACCAGCATCTCCTG
AGAGGACGCCTGGGCTTACCTGGGGGGCAGGATGCCTGGGGACAGTTCAGGACACACA
CACAGTAGGCCCGCAATAAAAGCAACACCCCTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

298

FIGURA 2

MWSGWWLWPLVAVCTADFFRDEAERIMRDSPVIDGHNDLPWQLLDMFNNRLQDERANLT
TLAGTHTNIPKLRAGFVGGQFWSVYTPCDTQNKDAVRRTLEQMDVVHRMCRMYPETFLY
VTSSAGIRQAFREGKVASLIGVEGGHSIDSSLGVLRALYQLGMRYLTLTHSCNTPWADNWL
VDTGDSEPQSQGLSPFGQRVVKELNRLGVLIDLAHVSVATMKATLQLSRAPVIFSHSSAYSV
CASRRNVPDDVLRLVKQTDSLVMVNFYNNYISCTNKANLSQVADHLDHIKEVAGARAVGF
GGDFDGVPRVPEGLEDVSKYPDLIAELLRRNWTEAEVKGALADNLLRVFQAVEQASNLTQ
APEEEPIPLDQLGGSCRTHYGYSSGASSLHRHWGLLLASLAPLVLCLSLL

Secuencia de señal.
aminoácidos 1-16

Dominio transmembrana.
aminoácidos 392-410

Sitios de N-glicosilación.
aminoácidos 57-60, 279-282, 332-335, 358-361

Sitio de fosforilación de la tirosina quinasa.
aminoácidos 110-118

Sitios de N-miristoilación.
aminoácidos 63-68, 78-83, 124-129, 139-144, 151-156, 375-380, 395-400

Patrón de cremallera de leucina.
aminoácidos 390-411

Sitio activo de la dipeptidasa renal.
aminoácidos 140-162

Homología de la dipeptidasa renal.
aminoácidos 1-411

Listado de secuencias

<110> GENENTECH, INC.
DOWD, PATRICK
FRANTZ, GRETCHEN
POLAKIS, PAUL
SMITH, VICTORIA
SPENCER, SUSAN D.
WU, THOMAS D.
ZHANG, ZEMIN

<120> Composiciones y métodos para el diagnóstico y tratamiento del tumor

<130> P5001R1P2 PCT

<140> PCT/US2006/013501
<141> 2006-04-05

<150> US 11/102,501
<151> 2005-04-08

<160> 2

<210> 1
<211> 1633
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 1
ggcgtgggag ctgcctaggc cgggccctgc cagggagcaa gtctgcatcg 50

cagaggccag ggcagagtgg ctcctcacag cctgaagctc atccttctgc 100

acgggccagc caggccagca cagaggcacc agggcagcag tgcacacagg 150

tccccgggga ccccaccatg tggagcggat ggtggctgtg gccccttgtg 200

gccgtctgca ctgcagactt ctttcgggac gaggcagaga ggatcatgag 250

ggactcccct gtcattgatg ggcacaatga cctcccctgg cagctgctgg 300

atatgttcaa caaccggctg caggacgaga gggccaacct gaccaccttg 350

gccggcacac acaccaacat ccccaagctg agggccggct ttgtgggagg 400

ccagttctgg tccgtgtaca cgccctgcga cacccagaac aaagacgccg 450

tgcggaggac gctggagcag atggacgtgg tccaccgcat gtgccggatg 500

tacccggaga ccttcctgta tgtcaccagc agtgcaggca ttcggcaggc 550

cttccgggaa gggaaggtgg ccagcctgat cggcgtggag ggcggccact 600

ccattgacag cagtttgggc gtcctgcggg cactctatca gctgggcatg 650

cggtacctga ccctcaccca cagctgcaac acgccctggg ctgacaactg 700

gctggtggac acgggagaca gcgagcccca gagccaaggc ttgtcaccct 750

ttgggcagcg tgtggtgaag gagctgaacc gtctgggggt cctcatcgac 800

ttggctcacg tgtctgtggc caccatgaag gccaccctgc agctgtccag 850

agccccggtc atcttcagcc actcctcggc ctacagcgtg tgcgcaagcc 900

ggcgcaacgt gcctgacgac gtcctgaggc tggtgaaaca gacagacagc 950

ctggtgatgg tgaacttcta caacaattac atttcctgca ccaacaaggc 1000

caacctgtcc caagtggccg accatctgga tcacatcaag gaggtggcag 1050

gagccagagc cgtgggtttt ggtggggact ttgatggtgt tccaagggtc 1100

cctgaggggc tggaggacgt ctccaagtat ccagacctga tcgctgagct 1150

gctcaggagg aactggacgg aggcggaggt caagggcgca ctggctgaca 1200

acctgctgag ggtcttccag gctgtggaac aggccagcaa cctcacacag 1250

gctcccgagg aggagcccat cccgctggac cagctgggtg gctcctgcag 1300

gacccattac ggctactcct ctggggcttc cagcctccat cgccactggg 1350

ggctcctgct ggcctccctc gctcccctgg tcctctgtct gtctctcctg 1400

tgaaacctgg gagaccagag tccccttag ggttcccgga gctccgggaa 1450

gacccgccca tcccaggact ccagatgcca ggagccctgc tgcccacatg 1500

caaggaccag catctcctga gaggacgcct gggcttacct ggggggcagg 1550

atgcctgggg acagttcagg acacacacac agtaggcccg caataaaagc 1600

aacacccctt caaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 1633

<210> 2
<211> 411
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Met	Trp	Ser	Gly	Trp	Trp	Leu	Trp	Pro	Leu	Val	Ala	Val	Cys	Thr	
1				5				10						15	
Ala	Asp	Phe	Phe	Arg	Asp	Glu	Ala	Glu	Arg	Ile	Met	Arg	Asp	Ser	
				20				25						30	
Pro	Val	Ile	Asp	Gly	His	Asn	Asp	Leu	Pro	Trp	Gln	Leu	Leu	Asp	
				35				40						45	
Met	Phe	Asn	Asn	Arg	Leu	Gln	Asp	Glu	Arg	Ala	Asn	Leu	Thr	Thr	
				50				55						60	

```
Leu Ala Gly Thr His Thr Asn Ile Pro Lys Leu Arg Ala Gly Phe
                65                  70                  75

Val Gly Gly Gln Phe Trp Ser Val Tyr Thr Pro Cys Asp Thr Gln
                80                  85                  90

Asn Lys Asp Ala Val Arg Arg Thr Leu Glu Gln Met Asp Val Val
                95                 100                 105

His Arg Met Cys Arg Met Tyr Pro Glu Thr Phe Leu Tyr Val Thr
               110                 115                 120

Ser Ser Ala Gly Ile Arg Gln Ala Phe Arg Glu Gly Lys Val Ala
               125                 130                 135

Ser Leu Ile Gly Val Glu Gly Gly His Ser Ile Asp Ser Ser Leu
               140                 145                 150

Gly Val Leu Arg Ala Leu Tyr Gln Leu Gly Met Arg Tyr Leu Thr
               155                 160                 165

Leu Thr His Ser Cys Asn Thr Pro Trp Ala Asp Asn Trp Leu Val
               170                 175                 180

Asp Thr Gly Asp Ser Glu Pro Gln Ser Gln Gly Leu Ser Pro Phe
               185                 190                 195

Gly Gln Arg Val Val Lys Glu Leu Asn Arg Leu Gly Val Leu Ile
               200                 205                 210

Asp Leu Ala His Val Ser Val Ala Thr Met Lys Ala Thr Leu Gln
               215                 220                 225

Leu Ser Arg Ala Pro Val Ile Phe Ser His Ser Ser Ala Tyr Ser
               230                 235                 240

Val Cys Ala Ser Arg Arg Asn Val Pro Asp Asp Val Leu Arg Leu
               245                 250                 255

Val Lys Gln Thr Asp Ser Leu Val Met Val Asn Phe Tyr Asn Asn
               260                 265                 270

Tyr Ile Ser Cys Thr Asn Lys Ala Asn Leu Ser Gln Val Ala Asp
               275                 280                 285

His Leu Asp His Ile Lys Glu Val Ala Gly Ala Arg Ala Val Gly
               290                 295                 300

Phe Gly Gly Asp Phe Asp Gly Val Pro Arg Val Pro Glu Gly Leu
               305                 310                 315

Glu Asp Val Ser Lys Tyr Pro Asp Leu Ile Ala Glu Leu Leu Arg
               320                 325                 330

Arg Asn Trp Thr Glu Ala Glu Val Lys Gly Ala Leu Ala Asp Asn
               335                 340                 345
```

```
Leu Leu Arg Val Phe Gln Ala Val Glu Gln Ala Ser Asn Leu Thr
                350                 355                 360

Gln Ala Pro Glu Glu Glu Pro Ile Pro Leu Asp Gln Leu Gly Gly
                365                 370                 375

Ser Cys Arg Thr His Tyr Gly Tyr Ser Ser Gly Ala Ser Ser Leu
                380                 385                 390

His Arg His Trp Gly Leu Leu Leu Ala Ser Leu Ala Pro Leu Val
                395                 400                 405

Leu Cys Leu Ser Leu Leu
                410
```

300

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 07-104186- -00000-0000

Fecha: 2007-10-04 16:19:38 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 300

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION [x]✓ MODELO DE UTILIDAD [ ]

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente [x]1 ✓
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [x]1 ✓
- Descripción de la invención [x]92 ✓
- Dibujos de ser estos pertinentes [X]295
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [x]2 ✓

COMPLETA [x] INCOMPLETA [ ]

DISEÑO INDUSTRIAL [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial [ ]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

ESQUEMA DE TRAZADO [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado [ ]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- Representación gráfica del esquema trazado [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

Claudia M Neiva Cortes.
Firma Responsable

Fecha_____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia