

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 421 558**

51 Int. Cl.:

C12N 15/13 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2005 E 05823959 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2013 EP 1833968**

54 Título: **Anticuerpos específicos de cáncer y proteínas de superficie celular**

30 Prioridad:

21.12.2004 US 637448 P

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

03.09.2013

73 Titular/es:

**VIVENTIA BIOTECHNOLOGIES INC. (100.0%)
7895 Tranmere Drive, Suite 204
Mississauga, ON L5S 1V9 , CA**

72 Inventor/es:

**GLOVER, NICHOLAS, R.;
MACDONALD, GLEN;
ENTWISTLE, JOYCELYN;
CIZEAU, JEANNICK y
CHAHAL, FRANCINA, C.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 421 558 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos específicos de cáncer y proteínas de superficie celular.

Campo de la invención

5 La invención se refiere a proteínas de unión específicas de cáncer humano y todos los usos de las mismas. En particular, la invención se refiere a anticuerpos o fragmentos de anticuerpos específicos para antígenos o moléculas en células cancerosas y a inmunoconjugados que comprenden las proteínas de unión de la invención, y a procedimientos de uso de los mismos. La invención también se refiere a un nuevo antígeno asociado con cáncer y a usos del mismo.

Antecedentes de la invención

10 Se calcula que en el año 2000 unos 22 millones de personas padecieron cáncer en todo el mundo y 6,2 millones de muertes se atribuyeron a este tipo de enfermedad. Cada año, se producen más de 10 millones de nuevos casos y se espera que este cálculo aumente un 50 % durante los próximos 15 años ((WHO, World Cancer Report. Bernard W. Stewart y Paul Kleihues, eds. IARC Press, Lyon, 2003). Los tratamientos actuales contra el cáncer están limitados a cirugía invasiva, radioterapia y quimioterapia, todos ellos producen efectos secundarios posiblemente graves, toxicidad inespecífica y/o cambios traumáticos de aspecto corporal y/o de calidad de vida. El cáncer puede volverse resistente a la quimioterapia reduciendo opciones de tratamiento adicionales y la probabilidad de éxito. El pronóstico de algunos cánceres es peor que el de otros y algunos casi siempre son letales. Además, algunos cánceres con una tasa de éxito de tratamiento relativamente alta continúan siendo importantes causantes de muerte debido a sus altas tasas de incidencia.

20 Una de las causas de la insuficiencia de los tratamientos actuales contra el cáncer es su ausencia de selectividad por tejidos y células afectados. La resección quirúrgica siempre implica la extirpación de tejido aparentemente normal como un "margen de seguridad" que puede aumentar la morbilidad y el riesgo de complicaciones. Casi siempre se extirpa algo del tejido sano que puede entremezclarse con las células tumorales y que posiblemente puede mantener o restablecer la función del órgano o tejido afectado. La radiación y quimioterapia destruirá o dañará muchas células normales debido a su modo de acción inespecífico. Esto puede dar como resultado graves efectos secundarios tales como náuseas graves, pérdida de peso y disminución de vitalidad, alopecia, etc., así como aumento del riesgo del desarrollo de cáncer secundario en edades más avanzadas. Un tratamiento con mayor selectividad por las células cancerosas dejaría indemnes a las células normales mejorando de esta manera los resultados, el perfil de los efectos secundarios y la calidad de vida.

35 La selectividad del tratamiento contra el cáncer puede mejorarse usando anticuerpos que son específicos para moléculas presentes solo o en la mayoría de las células cancerosas. Dichos anticuerpos pueden usarse para modular el sistema inmunitario y potenciar el reconocimiento y la destrucción del cáncer por el sistema inmunitario del propio paciente. También pueden bloquear o modificar la función de la molécula diana y, por tanto, de las células cancerosas. También pueden usarse para dirigir fármacos, genes, toxinas u otras moléculas importantes desde el punto de vista médico contra células cancerosas. Dichos complejos anticuerpo-fármaco normalmente se denominan inmunotoxinas o inmunoconjugados y en los últimos años se han sometido a ensayo diversos de estos compuestos [Kreitman RJ (1999) Immunotoxins in cancer therapy. *Curr Opin Immunol* 11:570-578; Kreitman RJ (2000) Immunotoxins. *Expert Opin Pharmacother* 1:1117-1129; Wahl RL (1994) Experimental radioimmunotherapy. A brief overview. *Cancer* 73:989-992; Grossbard ML, Fidijs P (1995) Prospects for immunotoxin therapy of non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Immunol Immunopathol* 76:107-114; Jurcic JG, Caron PC, Scheinberg DA (1995) Monoclonal antibody therapy of leukemia and lymphoma. *Adv Pharmacol* 33:287-314; Lewis JP, DeNardo GL, DeNardo SJ (1995) Radioimmunotherapy of lymphoma: a UC Davis experience. *Hybridoma* 14:115-120; Uckun FM, Reaman GH (1995) Immunotoxins for treatment of leukemia and lymphoma. *Leuk Lymphoma* 18:195-201; Kreitman RJ, Wilson WH, Bergeron K, Raggio M, Stetler-Stevenson M, FitzGerald DJ, Pastan I (2001) Efficacy of the anti-CD22 recombinant immunotoxin BL22 in chemotherapy-resistant hairy-cell leukemia. *N Engl J Med* 345:241-247]. La mayoría de los anticuerpos hasta ahora ensayados se han suscitado contra marcadores de cáncer conocidos en forma de anticuerpos monoclonales de ratón, algunas veces "humanizados" mediante modificación genética molecular. Desgraciadamente, sus dianas también están normalmente presentes en subconjuntos de células normales produciendo aún de esta manera algunos efectos inespecíficos. Adicionalmente, estos anticuerpos son básicamente proteínas de ratón que el sistema inmunitario del paciente humano ha reconocido como proteínas extrañas. La reacción inmunitaria consiguiente y la respuesta de los anticuerpos pueden dar como resultado una pérdida de eficacia o a efectos secundarios.

55 Los autores de la invención han usado una estrategia diferente en el desarrollo de anticuerpos para el tratamiento contra el cáncer. En lugar de inmunizar animales experimentales con células cancerosas o con marcadores aislados de células cancerosas, han seleccionado únicamente aquellos marcadores reconocidos por el sistema inmunitario del propio paciente o, en otras palabras, que el sistema inmunitario ha reconocido como una molécula extraña. Esto implica que los marcadores o los antígenos están a menudo sustancialmente ausentes en las células normales y,

por tanto, se reduce adicionalmente el riesgo de toxicidad inespecífica. Se generaron bibliotecas de hibridoma de linfocitos derivados de pacientes con cáncer y los anticuerpos que secretaron se ensayaron con respecto a la unión a células normales y tumorales. Únicamente se conservaron los anticuerpos que mostraron alta selectividad por las células cancerosas para evaluación y desarrollo posterior como un agente terapéutico o de diagnóstico contra el cáncer. Uno anticuerpo de este tipo altamente selectivo es el objeto de esta solicitud de patente. Además de ser selectivo, este anticuerpo es totalmente compatible con el sistema inmunitario del paciente ya que es una proteína totalmente humana. El anticuerpo de la invención puede usarse para usos de diagnóstico o terapéuticos o como una base para modificar genéticamente otras moléculas de unión para el antígeno diana. El anticuerpo de la invención también puede usarse para identificar el antígeno diana. El antígeno puede entonces usarse para diseñar nuevos tratamientos o diagnósticos del cáncer.

La estructura básica de una molécula de anticuerpo consiste en cuatro cadenas de proteína, dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Estas cadenas están interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera y una región constante de cadena ligera. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada y una región constante de cadena pesada. Las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera pueden adicionalmente subdividirse en regiones marco conservadas y en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Cada cadena ligera y región variable de cadena pesada está compuesta de tres CDR y cuatro regiones marco conservadas.

El transportador de glucosa 8 (GLUT8) es un miembro de la familia de proteínas GLUT y se sabe que tiene actividad transportadora de azúcar. GLUT8 está codificado por el gen *slc2a8*, que se encuentra en el cromosoma humano 9. GLUT8 tiene una longitud de 477 aminoácidos. Es una proteína transmembrana de tipo II de ~ 50 kDa. Tiene 12 regiones transmembrana. Tiene un bucle extracelular corto entre TM1 y TM2 y un bucle extracelular largo entre TM9 y TM10. A pesar de tener diversas regiones transmembrana, GLUT8 se localiza intracelularmente probablemente debido a un motivo di-leucina N-terminal (Ibberson y col. JBC 275: 4607 a 4612, 2000; Moadel y col, Cancer Res. 65 :698-702, 2005). La translocación a la membrana se ha observado en células de ratón después de tratamiento con insulina (Carayannopoulos y col, PNAS 97:7313-18, 2000) o en células de rata después de choque hipóxico o tratamiento con insulina (documento US 09/886.954 [2002/0038464]). En seres humanos, no se ha descrito la localización en la membrana y no se ha identificado ningún estímulo que induzca la translocación (Widmer y col., Endocrinology 146:4727-36, 2005).

La nomenclatura de la familia GLUT/SLC2A se ha publicado en: Amer.J.Physiol.Endocrinol, Metab. 282: E974-76, 2002. El nombre de GLUT8 se ha usado en el pasado para describir lo que se conoce ahora como GLUT12- como se indica en ese documento. El motivo di-leucina N-terminal se ha encontrado en todas las secuencias GLUT8 de mamíferos (véase, Zhao y col, Biochimica et Biophysica Acta 1680:103-113, 2004 observándose en bovinos, seres humanos, rata y ratón).

El documento WO01/04145 desvela polipéptidos GLUTX1, GLUTX2 y GLUTX3 y polinucleótidos que codifican los mismos. El documento WO98/55623 desvela una proteína de unión a ribosoma derivada de *Bougainvillea spectabilis*, un conjugado que comprende la misma, y usos de la proteína y el conjugado en controles de células tumorales. Lisinski, I. y col. (2001) Biochem. J. 358:517-522 describen el direccionamiento de GLUT6 (anteriormente GLUT9) y GLUT8 en adipocitos de rata, y muestran que la mutación dirigida de los motivos di-leucina N-terminal constituye la expresión de las proteínas en la membrana plasmática.

Sumario de la invención

Los autores de la presente invención han preparado anticuerpos específicos contra el cáncer humano que se unen a diversos tipos de células cancerosas, incluyendo cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, melanoma, cáncer de hígado, cáncer de colon, cáncer de cuello uterino, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de vejiga, cáncer de estómago, cáncer pancreático y cáncer endometrial. Cabe destacar, que los anticuerpos no se unen significativamente a tejido normal lo cual hace que sean candidatos adecuados para terapias y diagnósticos del cáncer.

Los autores de la invención han clonado y secuenciado los anticuerpos y han determinado la secuencia de las regiones variables de la cadena pesada y ligera del anticuerpo y las regiones 1,2 y 3 determinantes de la complementariedad. Las regiones 1,2 y 3 determinantes de la complementariedad de la cadena ligera aislada comprenden las secuencias de aminoácidos RASQDISNYLA (SEC ID N°: 1), AASSLHS (SEC ID N°: 2) y LQYSTYPIT (SEC ID N°: 3), respectivamente; y las regiones 1, 2 y 3 determinantes de la complementariedad de la cadena pesada aislada comprende las secuencias de aminoácidos NYAMS (SEC ID N°: 4), AITPSGGSTNYADSVKG (SEC ID N°: 5) y VPYRSTWYPLY (SEC ID N°: 6), respectivamente.

La presente solicitud también describe secuencias de ácido nucleico aisladas que codifican regiones 1,2 y 3 determinantes de la complementariedad de cadena ligera, que comprenden las secuencias de aminoácidos RASQDISNYLA (SEC ID N°: 1), AASSLHS (SEC ID N°: 2) y LQYSTYPIT (SEC ID N°: 3), respectivamente; y secuencias de ácido nucleico aisladas que codifican regiones 1,2 y 3 determinantes de la complementariedad de cadena pesada, que comprenden las secuencias de aminoácidos (SEC ID N°: 4), AITPSGGSTNYADSVKG (SEC ID N°: 5) y VPYRSTWYPLY (SEC ID N°: 6), respectivamente.

También describen regiones variables de cadena ligera aisladas que comprenden las regiones 1, 2 y 3 determinantes de la complementariedad de cadena ligera 1, 2 y/o 3 de la invención (SEC ID N° :1-3), y regiones variables de cadena pesada aisladas que comprenden las regiones 1,2 y 3 determinantes de la complementariedad de cadena pesada de la invención (SEC ID N°: 4-6). La región variable de cadena ligera puede comprender la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1 (SEC ID N°: 7). La región variable de cadena pesada puede comprender la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2 (SEC ID N°: 9).

También se describe una secuencia de ácido nucleico aislado que codifica la región variable de cadena ligera de la invención, y una secuencia de ácido nucleico aislado que codifica la región variable de cadena pesada como se ha descrito anteriormente. En una realización, la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de ácido nucleico mostrada en la Figura 1 (SEC ID N°: 8). En una realización, la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de ácido nucleico mostrada en la Figura 2 (SEC ID N°: 10).

Un aspecto de la presente invención es una proteína de unión, preferentemente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, que comprende las regiones determinantes de la complementariedad de cadena ligera SEC ID N°: 1-3 o variantes funcionales de las mismas y las regiones determinantes de la complementariedad de cadena pesada SEC ID N°: 4-6, o variantes funcionales de las mismas, y puede unirse a una variante asociada a cáncer del transportador de glucosa 8 expresada sobre la superficie de células cancerosas que comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las SEC ID N°:11-13 como se describe a continuación.

Los autores de la invención también han identificado el antígeno al cual se unen las proteínas de unión de la invención. Por consiguiente, la presente solicitud describe proteínas de unión que se unen: al transportador de glucosa 8 (GLUT8) o a variantes del mismo; a una proteína que comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las SEC ID N°:11-20, preferentemente las SEC ID N°:11-13; o a una variante asociada a cáncer de GLUT8 que se expresa sobre la superficie de células cancerosas que comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las SEC ID N°: 11-13.

Un aspecto adicional de la invención proporciona una proteína aislada que comprende una variante asociada con cáncer de GLUT8 expresada sobre la superficie de células cancerosas, que comprende la secuencia de aminoácidos definida mediante una cualquiera de las SEC ID N°: 11, 12 o 13, o variantes funcionales de las mismas. Estas variantes asociadas con cáncer de GLUT8 tienen una modificación en el motivo di-leucina N-terminal, en el que el motivo di-leucina N-terminal se ha modificado por di-alanina.

Además, la invención proporciona composiciones que comprenden las proteínas de unión de la invención, tales como anticuerpos y fragmentos de anticuerpo, con un excipiente, vehículo, tampón o estabilizador farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto de la invención es un inmunoconjugado que comprende (1) una proteína de unión de la invención, preferentemente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a un antígeno del transportador de glucosa 8 expresado sobre la superficie de una célula cancerosa, fijado a (2) una molécula efectora. En el presente documento también se describe un inmunoconjugado que comprende (1) una proteína de unión de la invención, preferentemente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se une a un antígeno o molécula que internaliza una célula cancerosa, fijado a (2) una molécula efectora. En una realización preferida, la molécula efectora es (i) un marcador, que puede generar una señal detectable, directa o indirectamente, o (ii) un agente terapéutico contra el cáncer, que es citotóxico, citostático o de otra manera impide o reduce la capacidad de las células cancerosas para dividirse y/o metastatizarse. Preferentemente, el agente terapéutico contra el cáncer es una toxina o una citotoxina.

La invención también proporciona composiciones que comprenden el inmunoconjugado de la invención y usos del inmunoconjugado para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención del cáncer y con fines de diagnóstico. Además, la presente solicitud describe procedimientos de tratamiento o prevención del cáncer usando el inmunoconjugado de la invención y kits relacionados.

Otro aspecto de la invención es un procedimiento para detectar o controlar el cáncer en un sujeto que comprende las etapas de:

(1) poner en contacto una muestra de ensayo, extraída de dicho sujeto, con una proteína de unión de la invención y que se une específicamente a un antígeno en la célula cancerosa para producir un complejo antígeno-proteína de unión;

(2) medir la cantidad de complejo antígeno-proteína de unión en la muestra de ensayo; y

(3) comparar la cantidad de complejo antígeno-proteína de unión en la muestra de ensayo con un control.

Otro aspecto de la invención es un agente de diagnóstico que comprende (1) la proteína de unión de la invención, fijada a (2) un marcador, que puede generar una señal detectable, directa o indirectamente.

La presente solicitud describe una proteína aislada que puede unirse específicamente con una de las proteínas de unión de la invención, secuencias de ácido nucleico y sus usos.

Los autores de la invención han identificado el antígeno al cual se unen las proteínas de unión de la invención. La invención incluye una proteína aislada que comprende el nuevo antígeno asociado a cáncer, que es una variante de GLUT8 que se expresa sobre la superficie de las células cancerosas, que comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las SEC ID N°: 11-13 o una variante funcional de las mismas. La invención también incluye el uso de la proteína aislada de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento, prevención y/o diagnóstico del cáncer.

Como se describe en el presente documento, la variante asociada con cáncer de GLUT8 expresada en la superficie de células cancerosas, comprende las secuencias de aminoácidos definida por una cualquiera de las SEC ID N°: 11, 12 o 13 o variantes funcionales de las mismas. Estas variantes asociadas con cáncer de GLUT8 tienen una modificación en el motivo di-leucina N-terminal, en el que el motivo di-leucina N-terminal se ha modificado por di-alanina.

La invención también incluye procedimientos de detección o control del cáncer en un sujeto que padece o que se sospecha que padece cáncer, que comprende detectar una variante asociada con cáncer de GLUT8 expresada en la superficie de células cancerosas que comprende: la secuencia de aminoácidos definida mediante una cualquiera de las SEC ID N°: 11, 12 o 13, o variantes funcionales de las mismas, en una célula en la muestra, en la que se indica cáncer, si en la célula se detecta la variante asociada con cáncer de GLUT8

La presente solicitud también describe procedimientos de detección o control del cáncer en un sujeto que padece o que se sospecha que padece cáncer, que comprende detectar la expresión de una variante de GLUT8 asociada a cáncer en la célula en la muestra, en la que se indica cáncer si en la célula se detecta la expresión de la variante asociada con cáncer de GLUT8.

La presente solicitud también describe un procedimiento de tratamiento o prevención del cáncer en un sujeto modulando la función o expresión de GLUT8 en la célula cancerosa.

La invención también incluye el uso de la variante asociada con cáncer de GLUT8 expresada sobre la superficie de células cancerosas que comprende la secuencia de la SEC ID N°: 11, 12 o 13 o variantes o fragmentos funcionales de las mismas en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención del cáncer en un sujeto. Además, la invención incluye composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad eficaz de una variante asociada con cáncer de GLUT8 expresada sobre la superficie de células cancerosas que comprende la secuencia de la SEC ID N°: 11, 12 o 13 o variantes funcionales o fragmentos de las mismas, secuencias de ácido nucleico que codifican la variante asociada con cáncer de GLUT8 o fragmentos de la misma y/o vectores de expresión recombinantes que comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican la variante asociada con cáncer de GLUT8 o fragmentos de la misma.

A partir de la siguiente descripción detallada serán evidentes otras características y ventajas de la presente invención. Sin embargo, debe entenderse que aunque la descripción detallada y los ejemplos específicos indiquen realizaciones preferidas de la invención solo se proporcionan a modo de ilustración.

Breve descripción de los dibujos

La invención se describirá ahora en relación a los dibujos en los que:

La Figura 1 es la secuencia de ácidos nucleicos (SEC ID N°: 8) y de aminoácidos (SEC ID N°: 7) de la región variable de cadena ligera de VB1-050.

La Figura 2 es la secuencia de ácidos nucleicos (SEC ID N°: 10) y de aminoácidos (SEC ID N°: 9) de la región variable de cadena pesada de VB1-050.

La Figura 3 demuestra la unión del anticuerpo a la superficie celular después de incubar células A-375 a diferentes temperaturas, determinada por citometría de flujo. Marcaje con fluorescencia de células A-375 después de la incubación de suspensiones celulares a 4 °C: 4B5 (1) y VB1-050 (2). Marcaje con fluorescencia de células A-375 después del calentamiento de las células unidas a anticuerpos a 37 °C: VB1-050 durante 60 minutos (3), durante 120 minutos (4).

La Figura 4 muestra la evaluación por microscopía confocal de la internalización de VB1-050. Se incubaron células A-375 con el anticuerpo a 4°C, se lavaron y se calentaron a 37 °C durante 60 minutos. Las células se fijaron, se permeabilizaron y se marcaron con anticuerpo secundario marcado con fluorescencia. El marcaje con fluorescencia de células A-375 después de la incubación de VB1-050 a 4 °C durante 60 minutos, mostró una distribución superficial circunferencial del marcaje, aumento (60X x 4) (A). Después de la incubación de las células unidas al anticuerpo a 37 °C durante 60 minutos, las células mostraron una fuerte tinción intracelular por el anticuerpo internalizado, aumento (60X x 4) (B).

La Figura 5 muestra un gel de agarosa de la reacción PCR. El ADN se detectó usando bromuro de etidio con una lámpara UV. **A)** Los plásmidos PeIB-V_{H845}-C_H-F-de-bouganin/psV73 y PeIB(-S)-V_{H050}-C_H-F-de-bouganin/pSV73 se digirieron con *Eco* RI y *Pvu*II y se cargaron en los carriles 1 y 3, respectivamente. El

símbolo indica el inserto EcoRI- PelB-PvuII con la secuencia líder peptídica que se ligó a PelB(-S)-V_{H050}-C_H-F-de-bouganin/pSV73 previamente digerido (indicado con la flecha) para crear el PelB-V_{H050}-C_H-F-de-bouganin/pSV73. **B**) Los plásmidos PelB(-S)-V_{L050}-C_L/pSV73 y Spel-de-bouganin-PelB-V_{L845}-C_L/pSV73 se digirieron con EcoRV y *Xho* I y se cargaron en los carriles 2-3 y 4-5, respectivamente. El inserto y el vector indicados con el símbolo • y la flecha, respectivamente, se usaron para crear el plásmido Spel-de-bouganin-PelB-V_{L845}-C_L/pSV73 que posteriormente se insertó en el plásmido 3302. **C**) El plásmido Spel-de-bouganin-PelB-V_{L845}-C_L/3302 y **D**) el inserto PelB-V_{H050}-C_H-F-de-bouganin, digeridos con *Eco* RI y *Spe*I (indicado con la flecha y el símbolo ·, respectivamente) y cargados en el carril 2 se ligaron para crear VB6-050/3302.

La Figura 6 muestra una transferencia de Western de VB6-050. Se cargó un sobrenadante representativo de VB6-845 (carril 1) y VB6-050 (carril 2) en condiciones no reductoras sobre un gel de SDS-PAGE y se inmunotransfirió con un anticuerpo anti-cadena ligera kappa humana conjugado con HRP (1/1000). Los carriles 3 y 4 corresponden al sobrenadante de un cultivo no inducido y a la escalera, respectivamente. El carril 5 es el sobrenadante de VB6-845 previamente ensayado como positivo sobre transferencia de Western.

La Figura 7 muestra una transferencia Western de una purificación representativa de VB6-050 del sobrenadante E104. **A**) Las muestras, 16 µl, tomadas a diferentes etapas del proceso de purificación se inmunotransfirieron usando un anticuerpo anti-cadena ligera kappa humana conjugado con HRP. Las flechas indican el producto intacto. Carril 1: sobrenadante de cultivo; carril 2: infiltrado del sobrenadante concentrado; carril 3: sobrenadante concentrado diluido a 1/10; carril 4: infiltrado del sobrenadante concentrado diafiltrado; carril 5: sobrenadante concentrado diafiltrado a 1/10; carril 6: flujo a través de la columna CM-sepharose; carril 7: lavado de la columna CM-sepharose; carril 8: eluato de la columna CM-sepharose o material de partida Ni-sepharose; carril 9: flujo a través de la columna quelante de Ni; carriles 10, 11 y 12: diferentes etapas de lavado de la columna quelante de Ni; carril 13: eluato de la sepharose-quelante de Ni o material de partida SEC-200; carril 14: grupo de las fracciones 26-28 de SEC-200; carril 15: escalera y VB6-845 como un control. **B**) tinción con Coomassie de VB6-050. Carril 1: material de partida SEC-200; carril 2: fracción 27; carril 3: VB6-845 purificado; carril 4: escalera.

La Figura 8 muestra la curva de titulación de VB6-050. Se incubaron células SKBR-3, A-375 y SK-OV-3 con diversas concentraciones de VB6-050 y la fluorescencia media se obtuvo por citometría de flujo. El Factor de Aumento de la Fluorescencia Media (FM) se calculó usando la siguiente fórmula, Factor de Aumento de FM = FM medida a cada concentración/FM medida con PBS.

La Figura 9 muestra la citotoxicidad *in vitro* de VB6-050. Ensayo con MTS de VB6-050 con células MB-435S positivas a antígeno (círculo blanco) y células Daudi negativas a antígeno (círculo negro). Células sembradas a 1.000 células por pocillo, se incubaron con las proteínas Fab-de-bouganina purificadas. Después de 5 días de incubación, se midió la viabilidad celular y se determinó la CI₅₀.

La Figura 10 muestra los perfiles de fraccionamiento de HepG2, MCF-7, Panc-1 y C-33A en un sistema PF-2D. Perfil comparativo de las diferencias en la expresión del antígeno entre dos líneas celulares positivas y negativas. Esta figura representa un archivo cromatográfico de 10 a 25 minutos. Se observa una visión clara de las diferencias de los antígenos por separado en ambas líneas celulares positivas. MCF-7 y HepG2 mostraron dos picos de elución a los 15 y 18 minutos, lo que indica niveles moderados de hidrofobicidad. Panc-1 y C-33A no mostraron picos correspondientes. Se observó un pico a los 12 minutos en todas las líneas celulares.

La Figura 11 muestra las exploraciones TOF-MS de péptidos obtenidas a partir de la línea celular HepG2, para detectar la presencia de todos los iones peptídicos en la muestra. Cincuenta y tres exploraciones a 1200-1400V en el intervalo de 100-1200 uma en un nanopulverizador estático dieron como resultado la recuperación de un número significativo de péptidos, que al analizarlo se obtuvo una proteína ID como Transportador de Glucosa 8.

La Figura 12 muestra las exploraciones TOF-MS de péptidos obtenidos a partir de la línea celular Panc-1, para detectar la presencia de todos los iones peptídicos en la muestra. Treinta exploraciones a 1200-1400 V en el intervalo de 100-1200 uma en un nanopulverizador estático dieron como resultado la recuperación de un número significativo de péptidos, que al analizarlo se obtuvo una proteína ID como IgG.

La Figura 13 muestra las exploraciones TOF-MS de péptidos obtenidos a partir de la línea celular MCF-7, para detectar la presencia de todos los iones peptídicos en la muestra. Veintisiete exploraciones a 1200-1400 V en el intervalo de 100-1200 uma en un nanopulverizador estático dio como resultado la recuperación de un número significativo de péptidos, que al analizarlo se obtuvo una proteína ID como Transportador de Glucosa 8.

La Figura 14 muestra las exploraciones TOF-MS de péptidos obtenidos a partir de la línea celular C-33A, para detectar la presencia de todos los iones peptídicos en la muestra. Treinta exploraciones a 1200-1400 V en el intervalo de 100-1200 uma en un nanopulverizador estático dieron como resultado la recuperación

de un número significativo de péptidos que al analizarlo se obtuvo una proteína ID como IgG.

La Figura 15 muestra la cobertura de secuencia de péptidos recuperado del análisis de espectrometría de masas como se indica en la Tabla 8. Se recuperó un total de 8 péptidos a partir de una digestión trípica en solución y se obtuvo una cobertura de la proteína del 34 %. Las secuencias subrayadas representan las secuencias peptídicas recuperadas y las secuencias en negrita muestran las secuencias variantes de aminoácidos.

La Figura 16 muestra los resultados de la identificación genética de masa peptídica para los péptidos recuperados a partir de VB1-050Ag. Las puntuaciones de las proteínas mayores de 64 se consideraron significativas. Las únicas proteínas ID significativas observadas señalaban a un antígeno, conocido como Transportador de Glucosa 8.

La Figura 17 muestra que el antígeno identificado, transportador de glucosa 8, tiene una puntuación significativa de 83. Debido a la naturaleza del servidor de la base de datos y a la similitud/homología de las proteínas relacionadas, todas las isoformas de esta proteína se consideraron como aciertos. La fragmentación MS/MS e identidad de péptidos confirma que el antígeno es el transportador de glucosa 8.

La Figura 18 muestra la fragmentación iónica MS/MS del péptido neutro Mr. 1401,54, que aparece como una molécula triplemente cargada (466,60000, 3 +). La secuencia peptídica coincide exactamente con la del péptido del transportador de glucosa 8.

La Figura 19 muestra la fragmentación iónica MS/MS del péptido neutro Mr. 1.070,785, que aparece como una molécula doblemente cargada (536,40000, 2 +). La secuencia peptídica coincide exactamente con la del transportador de glucosa 8.

La Figura 20 muestra la fragmentación iónica MS/MS del péptido neutro Mr. 1997,9992, que aparece como una molécula triplemente cargada (667,098230, 3 +). La secuencia peptídica mostró cambios en aminoácidos en las posiciones 7, 10, 12, 13, 14, 15 y 18; en comparación con el péptido homólogo del transportador de glucosa 8.

La Figura 21 muestra la fragmentación iónica MS/MS del péptido neutro Mr. 1176,3547, que aparece como una molécula doblemente cargada (589,100000, 2 +). La secuencia peptídica mostró cambios en aminoácidos en las posiciones 7, 10, 12, 13, 14 y 15; en comparación con el péptido homólogo del transportador de glucosa 8.

Descripción detallada de la invención

(A) Definiciones

La expresión “administrado por vía sistémica” como se usa en el presente documento significa que el inmunoconjugado y/u otros agentes terapéuticos contra el cancer pueden administrarse por vía sistémica de una manera conveniente tal como por inyección (subcutánea, intravenosa, intramuscular, etc.), administración oral, por inhalación, administración transdérmica o aplicación tópica (tal como una crema o pomada tópica etc.), aplicaciones de supositorio, o mediante un implante. Un implante puede ser de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como las membranas elásticas, o fibras. Los supositorios generalmente contienen principios activos en el intervalo del 0,5 % al 10 % en peso.

El término “aminoácido” incluye todos los aminoácidos de origen natural así como aminoácidos modificados.

El término “anticuerpo” como se usa en el presente documento pretende incluir anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y anticuerpos quiméricos. El anticuerpo puede ser de fuentes recombinantes y/o producirse en animales transgénicos. La expresión “fragmento de anticuerpo” como se usa en el presente documento pretende incluir fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, dsFv, ds-scFv, dímeros, minicuerpos, diacuerpos y multímeros de los mismos y fragmentos de anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos pueden fragmentarse usando técnicas convencionales. Por ejemplo, pueden generarse fragmentos F(ab')₂ tratando el anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab')₂ resultante puede tratarse para reducir puentes disulfuro para producir fragmentos Fab'. La digestión con papaína puede conducir a la formación de fragmentos Fab, Fab' y F(ab')₂, scFv, dsFv, ds-scFv, dímeros, minicuerpos, diacuerpos, fragmentos de anticuerpos biespecíficos y otros fragmentos también pueden sintetizarse mediante técnicas recombinantes.

La expresión “anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención” como se usa en el presente documento comprende las regiones determinantes de la complementariedad de cadena ligera de la invención (es decir, una o más de las SEC ID N°: 1-3) y la región determinante de la complementariedad de cadena pesada de la invención (es decir, una o más de las SEC ID N°: 4-6) o variantes funcionales de las secuencias de tal manera que el anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede unirse a la célula cancerosa sin unirse sustancialmente a células normales. Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención también incluyen anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se unen al transportador de glucosa 8 (GLUT8) o a sus variantes que comprenden una cualquiera de las

secuencias de aminoácidos de las SEC ID N°: 11-13.

La expresión “condiciones de hibridación al menos moderadamente rigurosas” significa que se seleccionan condiciones que promover la hibridación selectiva entre dos moléculas de ácido nucleico complementarias en solución. La hibridación puede producirse en toda o en una parte de una molécula de la secuencia de ácido nucleico. Normalmente, la parte que se hibrida tiene una longitud de al menos 15 (por ejemplo 20, 25, 30, 40 o 50) nucleótidos. Los expertos en la técnica reconocerán que la estabilidad de un dúplex de ácido nucleico, o híbridos, la determina la T_f , que en tampones que contienen sodio está en función de la concentración iónica del sodio y la temperatura ($T_f = 81,5 \text{ °C} - 16,6 (\text{Log}_{10} [\text{Na}^+]) + 0,41 (\%(\text{G}+\text{C}) - 600/l)$ o ecuación similar). Por consiguiente, los parámetros en las condiciones de lavado que determinan la estabilidad de los híbridos son la concentración iónica del sodio y la temperatura. Para identificar moléculas que sean similares, pero no idénticas, para una molécula de ácido nucleico conocida, puede suponerse que un emparejamiento erróneo del 1 % se produce a aproximadamente una disminución de 1 °C en la T_f , por ejemplo si se buscan moléculas de ácido nucleico que tengan una identidad >95 %, la temperatura de lavado final se reducirá aproximadamente 5 °C. Basándose en estas consideraciones los expertos en la técnica serán capaces de seleccionar fácilmente las condiciones de hibridación apropiadas. En realizaciones preferidas, se seleccionan condiciones de hibridación rigurosas. A modo de ejemplo, para conseguir una hibridación rigurosa pueden emplearse las siguientes condiciones: hibridación en cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) 5x/ solución de Denhardt 5x/SDS al 1,0 % a una T_f de - 5°C basándose en la ecuación anterior, seguido de un lavado en SSC 0,2x/SDS al 0,1 % a 60 °C. Las condiciones de hibridación moderadamente rigurosas incluyen una etapa de lavado en SSC 3x a 42 °C. Sin embargo, se entiende que usando tampones, sales y temperaturas alternativos pueden conseguirse condiciones rigurosas equivalentes. Puede encontrarse una guía adicional con respecto a condiciones de hibridación en: Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y., 2002, y en: Sambrook y col., Molecular Cloning: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

La expresión “proteína de unión” como se usa en el presente documento se refiere a proteínas que se unen específicamente a otra sustancia. En una realización, las proteínas de unión son anticuerpos o fragmentos de anticuerpos.

La expresión “proteínas de unión de la invención” como se usa en el presente documento se refiere a proteínas de unión que comprenden las CDR que tienen las secuencias de las SEC ID N°: 1-6, o variantes funcionales de las mismas, en las que la proteína de unión puede unirse a una variante asociada con cáncer del transportador de glucosa 8 expresada sobre la superficie de células cancerosas que comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las SEC ID N°: 11-13 e incluye anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de la invención.

La expresión “forma biológicamente compatible adecuada para administración *in vivo*” se refiere a una forma de la sustancia que va a administrarse en la que los efectos terapéuticos sobrepasan los efectos tóxicos.

El término “cáncer” como se usa en el presente documento incluye cualquier cáncer al que puede unirse una proteína de unión de la invención, preferentemente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención.

La expresión “variante asociada a cáncer del transportador de glucosa 8” como se usa en el presente documento se refiere a una nueva variante del transportador de glucosa 8 que se expresa sobre la superficie de células cancerosas. En una realización de la invención, una variante asociada a cáncer de GLUT8 tiene la misma función que la de GLUT8 como un transportador de azúcar, pero una diferente localización en la célula. Por ejemplo, la variante asociada a cáncer de GLUT8 tiene la misma función que la de GLUT8, como un transportador de azúcar, pero se localiza en la superficie de la célula. En otra realización, la variante asociada a cáncer del transportador de glucosa 8 es una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos definida por la SEC ID N°: 11. En una realización adicional, la variante asociada a cáncer del transportador de glucosa 8 es una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos definida por la SEC ID N°: 12. En una realización adicional, la variante asociada a cáncer del transportador de glucosa 8 es una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos definida por la SEC ID N°: 13. En otra realización de la invención, la variante asociada a cáncer de la GLUT8 comprende GLUT8 que tiene una modificación en el motivo di-leucina N-terminal. En realización adicional de la invención, el motivo di-leucina N-terminal se ha modificado por di-alanina.

Una “sustitución de aminoácidos conservativa”, como se usa en el presente documento, es una sustitución en la que un resto de aminoácido se sustituye por otro resto de aminoácido sin anular las propiedades deseadas de la proteína.

En el procedimiento puede usarse un control. El término “control” como se usa en el presente documento se refiere a una muestra procedente de un sujeto o un grupo de sujetos que se sabe que padecen cáncer o que no padecen cáncer.

La expresión “sistema de liberación controlada” como se usa significa el inmunoconjugado y/u otro agente terapéutico contra el cáncer de la invención que puede administrarse de una manera controlada. Por ejemplo, una microbomba puede administrar dosis controladas directamente en el área del tumor, regulando por tanto con precisión la sincronización y la concentración de la composición farmacéutica (véase, por ejemplo Goodson, 1984, in Medical Applications of Controlled Release, vol. 2, páginas 115-138).

La expresión “derivado de un péptido” se refiere a un péptido que tiene uno o más restos químicamente derivatizados por reacción de un grupo lateral funcional. Dichas moléculas derivatizadas incluyen, por ejemplo, las moléculas en las que los grupos amino libres se han derivatizado para formar clorhidratos de amina, grupos p-tolueno sulfonilo, grupos carbobenzoxi, grupos t-butiloxicarbonilo, grupos cloroacetilo o grupos formilo. Los grupos carboxilo libres pueden derivatizarse para formar sales, metil y etil ésteres u otros tipos de ésteres o hidrazidas. Los grupos hidroxilo libres pueden derivatizarse para formar derivados O-acilo o derivados O-alquilo. El nitrógeno imidazol de la histidina puede derivatizarse para formar N-im-bencilhistidina. También se incluyen como derivados los péptidos que contienen uno o más derivados de aminoácidos de origen natural de los veinte aminoácidos convencionales. Por ejemplo: la 4-hidroxiprolina puede sustituirse por prolina; la 5-hidroxilisina puede sustituirse por lisina; la 3-metilhistidina puede sustituirse por histidina; la homoserina puede sustituirse por serina; y la ornitina puede sustituirse por lisina.

La frase “detectar o controlar cáncer” se refiere a un procedimiento o un proceso para determinar si un sujeto padece o no cáncer o el grado de cáncer. Además, las proteínas de unión de la invención pueden usarse para detectar o controlar la aparición o avance de la enfermedad.

La expresión “administración directa” como se usa en el presente documento significa que el inmunconjugado y/u otros agentes terapéuticos contra el cáncer pueden administrarse, sin limitación, por vía intratumoral, intravascular y peritumoral. Por ejemplo, el monoconjugado puede administrarse mediante una o más inyecciones directas en el tumor, mediante perfusión continua o discontinua en el tumor, introduciendo un depósito del inmunconjugado, introduciendo un aparato de liberación retardada en el tumor, introduciendo una formulación de liberación retardada en el tumor y/o por aplicación directa sobre el tumor. Por modo de administración “en el tumor”, se incluye la introducción del inmunconjugado y/u otro agente terapéutico contra el cáncer en el área del tumor o en los vasos sanguíneos o linfáticos que fluye de modo sustancial directamente en el área del tumor.

Como se usa en el presente documento, la frase “cantidad eficaz” significa una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante periodos de tiempo necesarios para conseguir el resultado deseado. Las cantidades eficaces de un inmunconjugado pueden variar de acuerdo con factores tales como la patología, la edad, el sexo y el peso del animal. El régimen de dosificación puede ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, diariamente pueden administrarse diversas dosis divididas o la dosis puede reducirse proporcionalmente según indiquen los requisitos de la situación terapéutica.

El “transportador de glucosa 8” (GLUT8) es una proteína codificada por el gen *slc2a8*, que se encuentra en el cromosoma humano 9. Es un miembro de clase III de la familia de proteínas GLUT y se sabe que tiene actividad transportadora de azúcar. GLUT8 tiene una longitud de 477 aminoácidos. Es una proteína transmembrana de tipo II de ~50 kDa. Tiene 12 regiones transmembrana. Tiene un bucle pequeño supuestamente extracelular entre TM1 y TM2 y un bucle extracelular largo entre TM9 y TM10. El término incluye variantes de GLUT8. (Nomenclatura de la familia GLUT/SLC2A: Amer. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 282: E974-76, 2002.)

La expresión “región determinante de la complementariedad de cadena pesada”, como se usa en el presente documento, se refiere a regiones de hipervariabilidad dentro de la región variable de cadena pesada de una molécula de anticuerpo. La región variable de cadena pesada tiene tres regiones determinantes de la complementariedad denominadas región 1 determinante de la complementariedad de cadena pesada, región 2 determinante de la complementariedad de cadena pesada y región 3 determinante de la complementariedad de cadena pesada desde el extremo amino al extremo carboxilo.

La expresión “región variable de cadena pesada”, como se usa en el presente documento, se refiere a la región variable de una cadena pesada.

La expresión “inmunconjugado de la invención” como se usa en el presente documento comprende (1) una proteína de unión, preferentemente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención, fijado a (2) una molécula efectora. La molécula efectora puede ser cualquier molécula que se desee administrar a la célula cancerosa, incluyendo, pero sin limitación, (i) un marcador, que puede generar una señal detectable, directa o indirectamente, o (ii) un agente terapéutico contra el cáncer, tal como una toxina que es citotóxica, citostática o, de otra manera, impide o reduce la posibilidad de que las células cancerosas se dividan y/o se metastaticen.

La expresión “secuencias de ácido nucleico aislado” como se usa en el presente documento se refiere a un ácido nucleico sustancialmente libre de material celular o de medio de cultivo cuando se produce por técnicas de ADN recombinante, o precursores químicos, u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. Un ácido nucleico aislado también está sustancialmente libre de secuencias que flanquean naturalmente el ácido nucleico (es decir secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) a partir del cual deriva el ácido nucleico. La expresión “ácido nucleico” pretende incluir ADN y ARN y estos pueden ser mono o bicatenarios.

La expresión “proteínas aisladas” se refiere a una proteína sustancialmente libre de material celular o de medio de cultivo cuando se produce por técnicas de ADN recombinante, o precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. Incluye las regiones 1, 2 y 3 de complementariedad de cadena ligera de la invención, las regiones 1, 2 y 3 de complementariedad de cadena pesada de la invención, las regiones variables de

cadena ligera de la invención, las regiones variables de cadena pesada de la invención, las proteínas de unión de la invención y los antígenos a los que se unen las proteínas de unión de la invención.

5 La expresión "región determinante de la complementariedad de cadena ligera" como se usa en el presente documento se refiere a regiones de hipervariabilidad dentro de la región variable de cadena ligera de una molécula de anticuerpo. Las regiones variables de cadena ligera tienen tres regiones determinantes de la complementariedad denominadas región 1 determinante de la complementariedad de cadena ligera, región 2 determinante de la complementariedad de cadena ligera y región 3 determinante de la complementariedad de cadena ligera desde el extremo amino al extremo carboxilo.

10 La expresión "región variable de cadena ligera", como se usa en el presente documento, se refiere a la región variable de una cadena ligera.

La frase "modificación en el motivo di-leucina N-terminal" en GLUT8 se refiere a un cambio en el motivo di-leucina N-terminal que afecta a la localización de GLUT8 de tal manera que GLUT8 se expresa en la superficie de la célula, preferentemente una célula cancerosa. En una realización de la invención, el motivo di-leucina N-terminal se cambia por una di-alanina.

15 La expresión "bouganina modificada", como se usa en el presente documento, significa una bouganina modificada que tiene una propensión reducida para activar una respuesta inmunitaria como se escribe en la PCT/CA2005/000410 y en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 11.084,080. En un ejemplo, la bouganina modificada tiene la secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 29):

YNTVSFNLGEAYEYPTFIQDLRNLAKGTPVCQLPVTLQTIADDKRFV

20 LVDITTTSKKTVKVAIDVTDVYVVG YQDKWDGKDRAVFLDKVPTVAT

SKLFPGVNTRVTLTFDGSYQKLVNAAKADRKALELGVNKLEFSIEAIH

GKTINGQEAAKFFLIVIQMVSEARFKYETEVDRGLYGSFKPNFKVL

NLENNWGDISDAIHKSSPQCTTINPALQLISPSNDPWWVVKVSIQSPD

MGILKFKKSSK.

25 La expresión "secuencia de ácido nucleico" como se usa en el presente documento se refiere a una secuencia de monómeros de nucleósido o nucleótido que consta de bases de origen natural, glúcidos y enlaces interglucídicos (estructurales). El término también incluye secuencias modificadas o sustituidas que comprenden monómeros de origen no natural o partes de los mismos. Las secuencias de ácido nucleico de la presente invención pueden ser secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN) o secuencias de ácido ribonucleico (ARN) y pueden incluir bases de origen natural que incluyen adenina, guanina, citosina, timidina y uracilo. Las secuencias también pueden contener bases modificadas. Como ejemplos de dichas bases modificadas se incluyen aza y deaza adenina, guanina, citosina, timidina y uracilo; y xantina e hipoxantina.

30

El término "muestra" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier muestra de fluido, célula o tejido procedente de un sujeto que puede someterse a ensayo con respecto al cáncer.

35 La expresión "identidad de secuencia", como se usa en el presente documento, se refiere al porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias polipeptídicas. Para determinar el porcentaje de identidad entre dos secuencias polipeptídicas, las secuencias de aminoácidos de las dos secuencias se alinean, preferentemente usando el algoritmo Clustal W algorithm (Thompson, JD, Higgins DG, Gibson TJ, 1994, Nucleic Acids Res. 22 (22): 4673-4680), junto con la matriz de puntuación BLOSUM 62 (Henikoff S. and Henikoff J.G., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919) y una penalización por apertura de hueco de 10 y una penalización por extensión de hueco de 0,1, de tal manera que se obtenga un emparejamiento de orden superior entre dos secuencias en el que al menos el 50 % de la longitud total de una de las secuencias está implicado en el alineamiento. Otro procedimiento que puede usarse para alinear secuencias es el procedimiento de alineamiento de Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol., 1970, 48: 443), revisado por Smith y Waterman (Adv. Appl. Math., 1981, 2: 482) de tal manera que entre las dos secuencias se obtenga el emparejamiento de orden superior y se determine el número de aminoácidos idénticos entre las dos secuencias. Generalmente, en la técnica se reconocen otros procedimientos para calcular el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos e incluyen, por ejemplo los procedimientos descritos por Carillo y Lipton (SIAM J. Applied Math., 1988, 48: 1073) y los descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, e.d. Oxford University Press, Nueva York, 1988, Biocomputing: Informatics and Genomics Projects. Generalmente, se emplearán programas informatizados para realizar dichos cálculos. En cuanto a esto, programas informatizados que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, GCG (Devereux y col., Nucleic Acids Res., 1984, 12: 387) BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul y col., J. Molec. Biol., 1990: 215: 403).

40

45

50

La expresión "motivo di-leucina N-terminal" se refiere al motivo di-leucina N-terminal en GLUT8 que está implicado en la localización de la proteína en el compartimento intracelular de la célula. En una realización de la invención, el

motivo di-leucina está en las posiciones 12 a 13 de GLUT8.

La expresión “sujeto” como se usa en el presente documento se refiere a cualquier miembro del reino animal, preferentemente a un mamífero, más preferentemente a un ser humano. En una realización preferida, el sujeto padece cáncer o se sospecha que padece cáncer.

5 Como se usa en el presente documento, la frase “tratamiento contra el cáncer” se refiere a inhibir la replicación de células cancerosas, a inhibir la propagación del cáncer (metástasis), a inhibir el crecimiento tumoral, a reducir el número de células cancerosas o el crecimiento tumoral, a disminuir el grado de malignidad del cáncer (por ejemplo, diferenciación aumentada) o a mejorar los síntomas relacionados con el cáncer.

10 El término “variante” como se usa en el presente documento incluye modificaciones o equivalentes químicos de las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de la presente invención que realiza sustancialmente la misma función que la de las proteínas o moléculas de ácido nucleico de la invención, sustancialmente de la misma manera. Por ejemplo, como variantes de las proteínas de la invención se incluyen, sin limitación, sustituciones de aminoácidos conservativas. Las variantes de las proteínas de la invención también incluyen adiciones y deleciones en las proteínas de la invención. Además, como secuencias peptídicas variantes y secuencias de nucleótidos variantes se incluyen análogos y sus derivados.

(B) Proteínas y ácidos nucleicos de la invención

(i) regiones determinantes de la complementariedad de cadena ligera y pesada y regiones variables de cadena ligera y pesada

20 La presente solicitud describe una región 1 determinante de la complementariedad de cadena ligera 1 aislada que comprende la secuencia de aminoácidos RASQDISNYLA (SEC ID N°: 1); una región 2 determinante de la complementariedad de cadena ligera aislada que comprende la secuencia de aminoácidos AASSLHS (SEC ID N°: 2); y una región 3 determinante de la complementariedad de cadena ligera aislada que comprende la secuencia de aminoácidos LQYSTYPIT (SEC ID N°: 3).

25 La presente solicitud también describe una región 1 determinante de la complementariedad de cadena pesada aislada que comprende la secuencia de aminoácidos NYAMS (SEC ID N°: 4); una región 2 determinante de la complementariedad de cadena pesada aislada que comprende la secuencia de aminoácidos AITPSGGSTNYADSVKG (SEC ID N°: 5); y una región 3 determinante de la complementariedad de cadena pesada aislada que comprende la secuencia de aminoácidos VPYRSTWYPLY (SEC ID N°:6).

30 Por consiguiente, las regiones 1, 2 y 3 determinantes de la complementariedad de cadena ligera aisladas comprenden las secuencias de aminoácidos RASQDISNYLA (SEC ID N°: 1), AASSLHS (SEC ID N°: 2) y LQYSTYPIT (SEC ID N°: 3), respectivamente; y las regiones 1, 2 y 3 determinantes de la complementariedad de cadena pesada aisladas comprenden las secuencias de aminoácidos NYAMS (SEC ID N°: 4), AITPSGGSTNYADSVKG (SEC ID N°: 5) y VPYRSTWYPLY (SEC ID N°: 6), respectivamente.

35 La presente solicitud también describe variantes de las secuencias CDR que pueden unirse al mismo epítipo o antígeno reconocido por las secuencias CDR desveladas anteriormente.

40 La presente solicitud también describe regiones variables de cadena ligera aisladas que comprenden regiones 1, 2 y/o 3 determinantes de la complementariedad de cadena ligera de la invención (SEC ID N°: 1-3); y regiones variables de cadena pesada que comprenden las regiones 1, 2 y/o 3 determinantes de la complementariedad de cadena pesada de la invención (SEC ID N°: 4-6). En una realización la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1 (SEC ID N°: 7) y la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 2 (SEC ID N°: 9).

La presente solicitud también describe variantes de las regiones variables de cadena ligera aisladas y regiones variables de cadena pesada que pueden unirse al mismo epítipo o antígeno reconocido por las regiones variables de cadena ligera aisladas y regiones variables de cadena pesada aisladas desveladas anteriormente.

45 Un experto en la materia apreciará que se contemplan variantes de las secuencias de aminoácidos de las SEC ID N°: 1-6, 7 y 9, incluyendo equivalentes químicos de las secuencias desveladas por la presente invención. Dichos equivalentes incluyen proteínas que realizan sustancialmente la misma función que la de las proteínas específicas desveladas en el presente documento sustancialmente de la misma manera. Una variante funcional de una secuencia CDR podrá unirse al antígeno o al epítipo reconocidos por la secuencia CDR nativa. Por ejemplo, los equivalentes incluyen, sin limitación, sustituciones de aminoácidos conservativas.

55 En una realización, las secuencias de aminoácidos variantes de las regiones 1, 2 y 3 determinantes de la complementariedad de cadena ligera y las regiones 1, 2 y 3 determinantes de la complementariedad de cadena pesada tienen una identidad de secuencia de al menos 50 %, preferentemente al menos 60 %, más preferentemente al menos 70 %, más preferentemente al menos 80 % e incluso más preferentemente al menos 90 %, con las SEC ID N°: 1-6, respectivamente.

En otra realización, las secuencias de aminoácidos variantes de la región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada tienen una identidad de secuencia de al menos 50 %, preferentemente al menos 60 %, más preferentemente al menos 70 %, más preferentemente al menos 80 % e incluso más preferentemente al menos 90 % con las SEC ID N°: 7 y 9, respectivamente.

- 5 La presente solicitud también describe una secuencia de ácido nucleico aislado que codifica la región variable de cadena ligera de la invención, y una secuencia de ácido nucleico aislado que codifica la región variable de cadena pesada de la invención. En una realización, la región variable de cadena ligera comprende la secuencia de ácido nucleico mostrada en la Figura 1 (SEC ID N°: 8). En otra realización, la región variable de cadena pesada comprende la secuencia de ácido nucleico mostrada en la Figura 2 (SEC ID N°: 10). La presente solicitud también
10 contempla variantes de las secuencias de ácido nucleico que codifican la región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, las variantes incluyen secuencias de nucleótidos que se hibridan con las secuencias de ácido nucleico que codifican la región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada, como se ha descrito anteriormente, en condiciones de hibridación al menos moderadamente rigurosas.
- 15 La presente solicitud también describe secuencias de ácido nucleico aislado que codifican regiones 1, 2 y/o 3 determinantes de la complementariedad de cadena ligera, que comprenden las secuencias de aminoácidos RASQDISNYLA (SEC ID N°: 1), AASSLHS (SEC ID N°: 2) y LQYSTYPIT (SEC ID N°: 3), respectivamente; y secuencias de ácido nucleico aislado que codifican regiones 1, 2 y/o 3 determinantes de la complementariedad de
20 cadena pesada, que comprenden las secuencias de aminoácidos NYAMS (SEC ID N°: 4), AITPSGGSTNYADSVKG (SEC ID N°: 5) y VPYRSTWYPLY (SEC ID N°: 6), respectivamente. La presente solicitud también describe una secuencia de ácido nucleico aislado que codifica la región variable de cadena ligera mostrada en la Figura 1 (SEC ID N°: 7), y una secuencia de ácido nucleico aislado que codifica la región variable de cadena pesada mostrada en la Figura 2 (SEC ID N°: 9).

25 La presente solicitud también describe secuencias de ácido nucleico aislado que codifican variantes de las secuencias CDR y secuencias de región variable como se ha indicado anteriormente.

Las secuencias de ácido nucleico variantes incluyen secuencias de ácido nucleico que se hibridan con las secuencias de ácido nucleico que codifican las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEC ID N°: 1-6, 7 y 9 y variantes de las mismas en condiciones de hibridación al menos moderadamente rigurosas.

(ii) Proteínas de unión

30 Otro aspecto de la invención se refiere a una proteína de unión, preferentemente a un anticuerpo o a un fragmento de anticuerpo, que comprende las regiones determinantes de la complementariedad de cadena ligera de las SEC ID N°: 1-3 y la región determinante de la complementariedad de cadena pesada de las SEC ID N°: 4-6 o variantes funcionales de las mismas. Generalmente, en el presente documento, dicha proteína de unión puede denominarse "proteína de unión de la invención" o preferentemente "anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención".

35 En una realización, la proteína de unión, preferentemente un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, comprende las regiones 1, 2 y 3 determinantes de la complementariedad de cadena ligera, que comprenden las secuencias de aminoácidos RASQDISNYLA (SEC ID N°: 1), AASSLHS (SEC ID N°: 2) y LQYSTYPIT (SEC ID N°: 3), respectivamente; y las regiones 1, 2 y 3 determinantes de la complementariedad de cadena pesada que comprenden las secuencias de aminoácidos YAMS (SEC ID N°: 4), AITPSGGSTNYADSVKG (SEC ID N°: 5) y
40 VPYRSTWYPLY (SEC ID N°: 6), respectivamente. La invención también proporciona una proteína de unión, preferentemente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, que comprende la región variable de cadena ligera mostrada en la Figura 1 (SEC ID N°: 7) y/o la región variable de cadena ligera mostrada en la Figura 2 (SEC ID N°: 9).

45 Un experto en la materia apreciará que la invención incluye variantes de las proteínas de unión específicas desveladas anteriormente, que incluyen equivalentes químicos con respecto a las secuencias desveladas anteriormente que realizan sustancialmente la misma función que la de las proteínas de unión desveladas anteriormente sustancialmente de la misma manera. Una variante funcional de una proteína de unión podrá unirse al mismo antígeno que el de las proteínas de unión desveladas anteriormente. Las proteínas de unión de la presente invención se unen a una variante asociada con cáncer del transportador de glucosa 8 expresada en la superficie de
50 las células cancerosas que comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las SEC ID N°: 11-13.

Los autores de la invención han descubierto una nueva variante de GLUT8 que se expresa en células cancerosas. Por consiguiente, la invención incluye una proteína de unión que es específica para una variante asociada con cáncer del transportador de glucosa 8 expresada en la superficie de células cancerosas que comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos definidas por las SEC ID N°: 11-13 o una variante de las mismas. La
55 variante asociada a cáncer de GLUT8 puede comprender GLUT8 que tiene una modificación en el motivo di-leucina N-terminal, tal como el motivo di-leucina N-terminal que se ha modificado por di-alanina.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo comprende toda o una parte de una región constante de cadena pesada, tal como una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgE, IgM o IgD.

Preferentemente, la región constante de cadena pesada es una región constante de cadena pesada de IgG1. Además, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede comprender toda o una parte de una región constante de cadena ligera kappa o una región constante de cadena ligera lambda. Preferentemente, la región constante de la cadena ligera es una región constante de cadena ligera kappa.

- 5 Para producir anticuerpos monoclonales humanos, las células productoras de anticuerpos (linfocitos) pueden extraerse de un ser humano que padece cáncer y fusionarse con células de mieloma por procedimientos convencionales de fusión de células somáticas inmortalizando estas células y proporcionando células de hibridoma. Dichas técnicas son bien conocidas en la materia (por ejemplo, la técnica del hibridoma originalmente desarrollada por Kohler y Milstein (Nature 256: 495-497 (1975)) así como otras técnicas tales como la técnica de hibridoma de linfocitos T humanos (Kozbor y col., Immunol. Today 4: 72 (1983)), la técnica de hibridoma del EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole y col., Methods Enzymol, 121: 140-67 (1986)), y la exploración de bibliotecas combinatorias de anticuerpos Huse y col., Science 246: 1275 (1989)). Las células de hibridoma pueden explorarse inmunquímicamente para la producción de anticuerpos específicamente reactivos con células cancerosas y pueden aislarse anticuerpos monoclonales.
- 10
- 15 También pueden generarse anticuerpos, o fragmentos de anticuerpo, específicos, reactivos contra antígenos o moléculas particulares, tales como antígenos o moléculas en una célula cancerosa, explorando bibliotecas de expresión que codifican genes de inmunoglobulina, o partes de los mismos, expresados en bacterias con componentes de superficie celular. Por ejemplo, usando fagotecas de expresión, pueden expresarse fragmentos Fab completos, regiones VH y regiones FV en bacterias (véase, por ejemplo, Ward y col., Nature 341: 544-546 (1989); Huse y col., Science 246: 1275-1281 (1989); y McCafferty y col., Nature 348: 552-554 (1990)).
- 20

La presente invención incluye todos los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo que se unen al mismo antígeno que los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la invención. Un experto en la técnica apreciará que pueden usarse ensayos de unión para encontrar otros anticuerpos o fragmentos de anticuerpo con las mismas especificidades de unión que las de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de la invención. Como se ilustra a continuación, puede usarse un ensayo de unión de competencia para encontrar dichos otros anticuerpos.

25

Antes de realizar un ensayo de competencia usando citometría de flujo, se determina la concentración mínima del anticuerpo de la invención (Ab1) que proporciona unión máxima contra un número fijo de células cancerosas (por ejemplo, células A-375 para VB1-050). Se recoge un total de 10^6 células de cultivos con crecimiento exponencial y se incuban con diversas concentraciones de anticuerpo durante 1 hora a 4 °C. Las células se recogen y se incuban con un anticuerpo de detección adecuado durante 1 hora más a 4 °C. Después de lavar, las células se analizan por citometría de flujo. Para cada anticuerpo de ensayo, se genera una curva de saturación a partir de los datos representando gráficamente la fluorescencia media frente a la concentración de anticuerpo.

30

Para el ensayo de competencia, se preparan células cancerosas como se ha indicado anteriormente y se tratan por duplicado con una concentración fija de anticuerpo (Ab1). La concentración fija es la concentración mínima del anticuerpo que genera unión máxima frente a un número fijo de células cancerosas como se ha determinado anteriormente. Inmediatamente después de la adición del Ab1, a cada tubo se añaden diversas concentraciones del posible anticuerpo Ab2 inhibidor y la mezcla se incuba durante 1 hora a 4 °C. Se calculan tanto el porcentaje de inhibición como el cambio sobre la fluorescencia media máxima restando la fluorescencia de fondo (PBS-FCS al 5 %) de la lectura de la fluorescencia media de cada muestra de ensayo (Ab1 + Ab2). Después, el resultado se divide entre la fluorescencia media de Ab1 solo (unión máxima) menos la de fondo (véase más adelante). El resultado del porcentaje de inhibición se obtiene multiplicando por 100. La media de las repeticiones junto con sus respectivos errores típicos se representan gráficamente contra la concentración de anticuerpo. Para calcular el porcentaje de inhibición se usa la siguiente fórmula:

35

40

$$PI = [(FM_{(Ab1+Ab2)} - FM_{Fondo}) / (FM_{Ab1} - FM_{Fondo})] \times 100$$

45 en la que PI = Porcentaje de Inhibición; $FM_{(Ab1+Ab2)}$ = Fluorescencia Media medida para la mezcla Ab1 + Ab2; y FM_{Fondo} = Fluorescencia Media de fondo con PBS-FCS al 5 %.

Por consiguiente, la invención proporciona una proteína de unión capaz de unirse a un antígeno del transportador de glucosa 8 sobre la superficie de una célula cancerosa en el que la proteína de unión puede identificarse mediante un procedimiento que comprende:

- 50 (1) incubar un número fijo de células cancerosas con una concentración mínima de una proteína de unión de la invención, preferentemente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (Ab1) que genera unión mínima contra el número fijo de células cancerosas y medir la fluorescencia media de Ab1 (FM_{Ab1});
- (2) ensayar dos o más concentraciones de una proteína de unión de ensayo (Ab2) añadiendo el Ab2 al Ab1 y a las células cancerosas y medir la fluorescencia media ($FM_{(Ab1+Ab2)}$);
- 55 (3) medir la fluorescencia media de fondo (FM_{Fondo});
- (4) calcular el PI, en el que

$$PI = [(FM_{(Ab1+Ab2)} - FM_{Fondo}) / (FM_{Ab1} - FM_{Fondo})] \times 100;$$

y

(5) comparar el PI con un valor PI control;

en el que, un PI que tiene una diferencia estadísticamente significativa de la del PI control indica que la proteína de unión de ensayo es capaz de unirse al antígeno en la célula cancerosa.

Un experto en la técnica apreciará que pueden usarse técnicas de maduración por afinidad modificando las proteínas de unión o los inmunconjugados de la invención aumentando su afinidad por su antígeno, transportador de glucosa 8 o variantes de los mismos.

Para potenciar la afinidad de unión de un anticuerpo se usan rutinariamente dos estrategias. Una estrategia utiliza la resolución de la estructura cristalina del complejo Ab-Ag para identificar los restos clave implicados en la unión al antígeno (Davies D.R., Cohen G.H. 1996. Interactions of protein antigens with antibodies. Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 7-12). Posteriormente, estos restos pueden mutarse para potenciar la interacción. La otra estrategia imita una estimulación de antígenos *in vivo* que estimula la maduración de afinidad de la inmunoglobulina producida por linfocitos B. Durante la maduración de la respuesta inmunitaria, las regiones variables de las inmunoglobulinas se someten a mutaciones somáticas (Mc Heyzer-Williams M. 2003. B-cell signaling mechanism and activation. Fundamental Immunology, Fifth edition, 195-225). Este proceso, altamente específico para el sistema inmunitario, se caracteriza por la introducción de mutaciones puntuales a una tasa muy elevada. Esto solo se produce dentro de los fragmentos de ADN que codifican las regiones variables y excluye los dominios conservados. Los linfocitos B que expresan el anticuerpo variante somáticamente mutado se someten después a una selección mediada por antígenos dando como resultado la selección de inmunoglobulinas de mayor afinidad. Con objeto de repetir este fenómeno *in vitro*, se han usado diversas estrategias para introducir mutaciones por procedimientos al azar o dirigidos. Las mutaciones al azar pueden introducirse usando PCR propensa a error, redistribución de cadenas o cepas mutantes de *E. coli* (Clackson T. Hoogenboom N.R., Griffiths A.D. and Winter G. 1991 Making antibody fragments using phage display libraries. Nature 352, 624-628, Hawkins R.E., Russell S.J. and Winter G. 1992. Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation. J. Mol. Biol. 226, 889-896, Low N., Holliger P. and Winter G. 1996. Mimicking somatic hypermutation: affinity maturation of antibodies displayed on bacteriophage using a bacterial mutator strain. J Mol. Biol. 260, 359-368). Esta estrategia conduce a la creación de grandes bibliotecas en las que se seleccionan clones reactivos con una tecnología de presentación tal como de ribosomas, fagos o levaduras (Min L. (2000). Applications of display technology in protein analysis. Nat. Biotechnol. 18, 1251-1256).

Las mutaciones dirigidas de las CDR, especialmente las CDR3 de las cadenas ligera y pesada, han demostrado ser una técnica eficaz para aumentar la afinidad de los anticuerpos. Para la mutagénesis se dirigen bloqueos de 3 a 4 aminoácidos de la CDR o regiones específicas denominadas "puntos calientes". Yang y col. describieron un aumento de 420 veces de un fragmento Fab anti-gp120 del VIH mutando cuatro restos CDR (Yang W.P., Green K., Pinz-Sweeney S., Briones A.T., Burton D.R. y Barbas C.F. III. 1995. CDR walking mutagenesis for the affinity maturation of a potent human anti-HIV-1 antibody into picomolar range. J.Mol.Biol., 254, 392-403). Una mutación en la CDR3 VL combinada con tres mutaciones en la CDR3 VH de scFv C6.5 produjo una afinidad 1.230 veces aumentada (Schiefer R., McCall A., Adams G.P., Marshall K.W., Merrit H., Yin M., Crawford R.S. Weiner L.M., Marks C. and Marks J.D. 1996. Isolation of picomolar affinity anti-c-erbB-2 single-chain Fv by molecular evolution of the complementary determining regions in the center of the antibody binding site. J. Mol. Biol., 263, 551-567).

Los "puntos calientes" son las secuencias en las que se produce hipermutación somática *in vivo* (Neuberger M.S y Milstein C. 1995. Somatic hypermutation. Curr. Opin. Immunol. 7, 248-254). Las secuencias de puntos calientes pueden definirse como secuencias de nucleótidos consenso en determinados codones. La secuencia consenso es el tetranucleótido RGYW, en el que R puede ser A o G, Y puede ser C o T y W puede ser A o T (Neuberger M.S y Milstein C. 1995. Somatic hypermutation. Curr. Opin. Immunol. 7, 248-254). Además, los restos de serina codificados por los nucleótidos AGY están predominantemente presentes en las regiones CDR del dominio variable sobre los codificados por TCN correspondientes a posibles secuencias de puntos calientes (Wagner S.D., Milstein C. y Neuberger M.S. 1995. Codon bias targets mutation. Nature, 376, 732). El análisis estructural ha mostrado que los bucles CDR contribuyen en gran medida a la unión del antígeno, especialmente los bucles CDR3 (Giudicelli V., Chaume D. and Lefranc M.P. 2004. IMGTV-QUEST, an integrated software program for immunoglobulin and T cell receptor V-J and V-D-J rearrangement analysis. Nucleic Acids Res. 32, 435-440). Por lo tanto, la secuencia de nucleótidos de las CDR de las cadenas pesada y ligera de cada anticuerpo de la invención se explora con respecto a la presencia de las secuencias de puntos calientes y codones AGY. Los puntos calientes identificados de las regiones CDR de la cadena ligera y pesada se comparan con las secuencias germinales de las cadenas ligera y pesada usando la base de datos International ImMunoGen Tics (IMGT, <http://imgt.cines.fr/textes/vquest>) (Davies D.R., Padlan E.A. y Sheriff S. 1990. Antibody-antigen complexes. Annu. Rev. Biochem. 59, 439-473). Una secuencia, idéntica a la de la línea germinal, sugiere que no se ha producido mutación somática; por lo tanto, imitando los acontecimientos somáticos que se producen *in vivo* se introducen mutaciones al azar. Por otro lado, una secuencia diferente muestra que ya se han producido algunas mutaciones somáticas. Quedará por determinar si la mutación somática *in vivo* es óptima. Los puntos calientes que codifican aminoácidos ocultos o conservados en las CDR no están mutagenizados. Estos restos son normalmente críticos para la estructura global y al estar ocultos es

poco probable que interaccionen con el antígeno. Además, las secuencias pueden compararse con las localizaciones previstas en las secuencias de la línea germinal en las que predominantemente se producen mutaciones somáticas (Tomlinson I.M., Cox J.P.L., Gherardi E., Lesk A.M. and Chotia C. 1995. The structural repertoire of the human VI domain. EMBO J. 14, 4628-4638, Tomlinson I.M., Walter G., Jones P.T., Dear P.H., Sonnhammer E.L.L. y Winter G. 1996. The imprint of somatic hypermutation on the repertoire of human germline V genes. J.Mol.Biol. 256, 813-817). Se aplicó una estrategia similar para la maduración por afinidad de scFv de BL22. Se introdujo una mutación puntual en la CDR3 de la cadena pesada que dio como resultado un aumento de 5 a 10 veces en cuanto a la actividad de unión de diversas líneas celulares CD22-positivas (Salvatore G., Beers R., Margulies I., Kreitman R.J. y Pastan I. 2002. Improved cytotoxic activity toward cell lines and fresh leukemia cells of a mutant anti-CD22 immunotoxin obtained by antibody phage display. Clinical Cancer research, 8, 995-1002). Además, la mutación de diversos aminoácidos en los bucles CDR1 y CDR2 también produjo mutantes con mayor afinidad que variaba de 3 a 7 veces (Ho M., Kreitman J., Onda M. y Pastan I. 2005. In vitro antibody evolution targeting germline hot spots to increase activity of an anti-CD22 immunotoxin. J.Biol. Chem., 280, 607-617).

Después de introducir las mutaciones, mediante procesos al azar o dirigidos, los anticuerpos se expresan y se evalúa su función. Por ejemplo, la exploración funcional puede basarse en la unión. Una vez evaluada la función, después puede realizarse la secuenciación del ADN de los anticuerpos seleccionados usando procedimientos conocidos.

En otra realización, para la maduración por afinidad de las proteínas de unión o inmunocombinados de la invención se usa el procedimiento de expresión periplasmática anclada (ExPA) descrito por Harvey, B y col. (PNAS 22 de junio de 2004; 101(25): 9193-8).

Por consiguiente, la invención incluye proteínas de unión de la invención que han madurado por afinidad para aumentar la afinidad de las proteínas de unión por el transportador de glucosa 8 o variantes del mismo; una proteína que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEC ID N°: 11-20, preferentemente las SEC ID N°: 11-13; o una variante asociada con cáncer del transportador de glucosa 8.

La invención también proporciona composiciones que comprenden las proteínas de unión de la invención, preferentemente anticuerpos y fragmentos de anticuerpo, con un excipiente, vehículo, tampón o estabilizante farmacéuticamente aceptable.

(iii) Nuevos antígenos asociados con cáncer

Como se ha mencionado anteriormente, los autores de la invención han identificado el antígeno al cual se unen las proteínas de unión de la invención. El nuevo antígeno asociado con cáncer se expresa en la superficie de células cancerosas y no se expresa significativamente en la superficie de células normales. Por consiguiente, la invención incluye una proteína aislada que comprende la secuencia de una variante asociada con cáncer del transportador de glucosa 8 que se expresa en la superficie de células cancerosas que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 11, 12 o 13 o una variante funcional de las mismas, que puede unirse específicamente con una de las proteínas de unión de la invención, y secuencias de ácido nucleico y usos de las mismas.

La presente solicitud describe una proteína aislada que comprende el transportador de glucosa 8 o variantes del mismo. La proteína aislada puede comprender una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las SEC ID N°: 11-20 o variantes de las mismas. En una realización, la invención proporciona una proteína aislada que comprende una variante asociada con cáncer del transportador de glucosa 8 que se expresa en la superficie de las células que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 11 o una variante de la misma. La invención también proporciona una proteína aislada que comprende una variante asociada con cáncer del transportador de glucosa 8 que se expresa en la superficie de células cancerosas que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 12 o una variante de la misma. Adicionalmente, la invención proporciona una proteína aislada que comprende una variante asociada con cáncer del transportador de glucosa 8 que se expresa en la superficie de células cancerosas que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 13 o una variante de la misma. En una realización de la invención, la variante asociada con cáncer de GLUT8, comprende GLUT8 que tiene una modificación en el motivo di-leucina N-terminal. En una realización adicional de la invención, el motivo di-leucina N-terminal se ha modificado por di-alanina.

Un experto en la técnica apreciará que la invención incluye una variante asociada con cáncer del transportador de glucosa 8 que se expresa en la superficie de células cancerosas que comprende las variantes de las secuencias de aminoácidos de las SEC ID N°:11-13, incluyendo equivalentes químicos de las secuencias desveladas por la presente invención. Dichos equivalentes incluyen proteínas que realizan sustancialmente la misma función que la de las proteínas específicas desveladas en el presente documento sustancialmente de la misma manera. Por ejemplo, los equivalentes incluyen, sin limitación, sustituciones de aminoácidos conservativas.

En una realización, las secuencias de aminoácidos variantes de las proteínas aisladas de la invención tienen una identidad de secuencia de al menos el 50 %, preferentemente al menos el 60 %, más preferentemente al menos el 70 %, más preferentemente al menos el 80 % e incluso más preferentemente al menos el 90 % con las SEC ID N°: 11-13.

La invención incluye el uso de la proteína aislada de la presente invención. Por ejemplo, el uso de las proteínas aisladas de la invención para generar proteínas de unión e inmunoconjugados que pueden usarse para tratar o prevenir el cáncer o que pueden usarse para detectar o controlar el cáncer en un sujeto. Por consiguiente, la invención incluye el uso de las proteínas aisladas de la invención en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir el cáncer.

(C) Inmunoconjugados

La invención también incluye un inmunoconjugado que comprende (1) una proteína de unión de la invención, preferentemente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se ha fijado a (2) una molécula efectora.

En una realización preferida, la molécula efectora es (i) un marcador, que puede generar una señal detectable, directa o indirectamente o (ii) un agente terapéutico contra el cáncer que es citotóxico, citostático o de otra manera impide o reduce la posibilidad de que las células cancerosas se dividan y/o metastaticen. En el presente documento dicho inmunoconjugado puede denominarse generalmente "el inmunoconjugado de la invención".

En una realización de la invención, la molécula efectora es un agente terapéutico contra el cáncer. El agente terapéutico contra el cáncer es preferentemente una toxina que es citotóxica, citostática o de otra manera impide o reduce la posibilidad de que las células cancerosas se dividan y/o metastaticen. Por consiguiente, un aspecto de la invención es un inmunoconjugado que comprende (1) una proteína de unión de la invención, preferentemente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, fijado a (2) un agente terapéutico contra el cáncer, tal como una citotoxina.

En otra realización, el inmunoconjugado se internaliza y el agente terapéutico contra el cáncer es una citotoxina que bloquea la síntesis de proteínas de la célula, conduciendo de este modo a la muerte celular. Cabe destacar, que dado que mayoría de las células normales no expresan ampliamente el antígeno presente en las células cancerosas, estas no pueden unirse e internalizar el inmunoconjugado y están protegidas del efecto destructor de la toxina u otros agentes terapéuticos contra el cáncer.

En los inmunoconjugados de la invención pueden usarse diversas moléculas efectoras y varias de dichas moléculas efectoras son moléculas intracelularmente activas. Por consiguiente, en una realización de la invención, la célula cancerosa internaliza el inmunoconjugado.

En realizaciones preferidas, la molécula efectora es un agente terapéutico contra el cáncer, más preferentemente una citotoxina que comprende un polipéptido que tiene actividad inactivadora de ribosomas incluyendo, sin limitación, gelonina, bouganina, saporina, ricina, cadena A de la ricina, briodina, toxina diftérica, restrictocina, exotoxina A de *Pseudomonas* y variantes de las mismas. Cuando la proteína es una proteína inactivadora de ribosomas, el inmunoconjugado debe internalizarse después de unirse a la célula cancerosa para que la proteína sea citotóxica a las células. Por consiguiente, en una realización de la invención, la molécula efectora es una citotoxina y la célula cancerosa internaliza el inmunoconjugado.

En una realización de la invención, la toxina es bouganina o la exotoxina A de *Pseudomonas* y variantes de las mismas. En otra realización, la toxina es una bouganina modificada o una forma truncada de la exotoxina A de *Pseudomonas* que carece del dominio de unión celular. En una realización adicional, la toxina es una bouganina sustancialmente desprovista de epítopes de linfocitos T o una forma truncada de la exotoxina A de *Pseudomonas* que consiste en los aminoácidos 252-608.

En otras realizaciones no limitantes, el agente terapéutico contra el cáncer comprende un agente que actúa alterando el ADN. Por tanto, los agentes terapéuticos contra el cáncer pueden seleccionarse, sin limitación, de enediinas (por ejemplo, caliqueamicina y esperamicina) y agentes de molécula pequeña que no son enediinas (por ejemplo, bleomicina, metidiumpropil-EDTA-Fe(II)). Otros agentes terapéuticos contra el cáncer útiles de acuerdo con la invención incluyen, sin limitación, daunorrubicina, doxorubicina, distamicina A, cisplatino, mitomicina C, ecteinascidinas, duocarmicina/CC-1065 y bleomicina/pepleomicina.

En otras realizaciones no limitantes, el agente terapéutico contra el cáncer comprende un agente que actúa alterando la tubulina. Dichos agentes pueden comprender, sin limitación, rizoxina/maitansina, paclitaxel, vincristina y vinblastina, colchicina, auristatin dolastatina 10 MMAE y pelorusida A.

En otras realizaciones no limitantes, la parte del agente terapéutico contra el cáncer de un inmunoconjugado de la invención puede comprender un agente alquilante que incluye, sin limitación, Asaley NSC 167780, NSC 182986 AZQ, BCNU NSC 409962, Busulfán NSC 750, carboxifalatoplatino NSC 271674, NSC 241240 CBDCA, CCNU NSC 79037, CHIP NSC 256927, clorambucilo NSC 3088, clorozotocina NSC 178248, cisplatino NSC 119875, clomesona NSC 338947, cianomorfolinodoxorrubicina NSC 357704, ciclodisona NSC 348948, dianhidrogalactitol NSC 132313, fluorodopan NSC 73754, hepsulfam NSC 329680, hicantona NSC 142982, melfalán NSC 8806, metil CCNU NSC 95441, mitomicina C NSC 26980, mitozolamida NSC 353451, mostaza de nitrógeno NSC 762, PCNU NSC 95466, piperazina NSC 344007, piperazinadiona NSC 135758, pipobromán NSC 25154, porfiromicina NSC 56410, mostaza de espirohiantoína NSC 172112, teroxirona NSC 296934, tetraplatino NSC 363812, tiotepa NSC 6396, trietilenmelamina NSC 9706, mostaza de nitrógeno uracilo NSC 34462 y Yoshi-864 NSC 102627.

En otras realizaciones no limitantes, la parte del agente terapéutico contra el cáncer del inmunoconjugado de la invención puede comprender un agente antimetabólico que incluye, sin limitación, alocolchicina NSC 406042, NSC 609395 halicondrina B, colchicina NSC 757, derivado de colchicina NSC 33410, dolastatina 10 NSC 376128 (derivado de NG-auristatina), maitansina NSC 153858, rizoxina NSC 332598, taxol NSC 125973, derivado de taxol NSC 608832, tiocolchicina NSC 361792, tritil cisteína NSC 83265, sulfato de vinblastina NSC 49842 y sulfato de vincristina NSC 67574.

En otras realizaciones no limitantes, la parte del agente terapéutico contra el cáncer del inmunoconjugado de la invención puede comprender un inhibidor de topoisomerasa I incluyendo, sin limitación, camptotecina NSC 94600, camptotecina, sal Na NSC 100880, aminocamptotecina NSC 603071, derivado de camptotecina NSC 95382, derivado de camptotecina NSC 107,124, derivado de camptotecina NSC 643833, derivado de camptotecina NSC 629971, derivado de camptotecina NSC 295500, derivado de camptotecina NSC 249910, derivado de camptotecina NSC 606985, derivado de camptotecina NSC 374028, derivado de camptotecina NSC 176323, derivado de camptotecina NSC 295501, derivado de camptotecina NSC 606172, derivado de camptotecina NSC 606,173, derivado de camptotecina NSC 610458, derivado de camptotecina NSC 618939, derivado de camptotecina NSC 610457, derivado de camptotecina NSC 610459, derivado de camptotecina NSC 606499, derivado de camptotecina NSC 610456, derivado de camptotecina NSC 364830, derivado de camptotecina NSC 606497 y morfolinodoxorrubicina NSC 354646.

En otras realizaciones no limitantes, la parte del agente terapéutico contra el cáncer del inmunoconjugado de la invención puede comprender un inhibidor de topoisomerasa II, incluyendo, sin limitación, doxorubicina NSC 123127, amonafida NSC 308847, m-AMSA NSC 249992, derivado de antrapirozol NSC 355644, pirazoloacridina NSC 366140 pirazoloacridina, bisantreno HCL NSC 337766, daunorrubicina NSC 82151, desoxidoxorrubicina NSC 267469, mitoxantrona NSC 301739, menogaril NSC 269148, N,N-dibencil daunomicina NSC 268242, oxantrazol NSC 349174, rubidazona NSC 164011, VM-26 NSC 122819 y VP-16 NSC 141540.

En otras realizaciones no limitantes, la parte del agente terapéutico contra el cáncer del inmunoconjugado de la invención puede comprender un antimetabolito de ARN o ADN que incluye, sin limitación, L-alanosina NSC 153353, 5-azacitidina NSC 102816, 5-fluorouracilo NSC 19893, acivicina NSC 163501, derivado de aminopterina NSC 132483, derivado de aminopterina NSC 184692, derivado de aminopterina NSC 134033, un antifol NSC 633713, un antifol NSC 623017, un antifol soluble de Baker NSC 139105, dicloralil lawsona NSC 126771, brequinar NSC 368390, ftorafur (profármaco) NSC 148958, 5,6-dihidro-5-azacitidina NSC 264880, metotrexato NSC 740, derivado de metotrexato NSC 174121, N-(fosfonoacetil)-L-aspartato (PALA) NSC 224131, pirazofurina NSC 143095, trimetrexato NSC 352122, 3-HP NSC 95678, 2'-desoxi-5-fluorouridina NSC 27640, 5-HP NSC 107392, alfa-TGDR NSC 71851, afidicolin glicinato NSC 303812, ara-C NSC 63878, 5-aza-2'-desoxicitidina NSC 127716, beta-TGDR NSC 71261, ciclocitidina NSC 145668, guanazol NSC 1895, hidroxurea NSC 32065, inosin glicodialdehído NSC 118994, macbecina II NSC 330500, pirazoloimidazol NSC 51143, tioguanina NSC 752 y tiopurina NSC 755.

En otra realización no limitante, la parte del agente terapéutico del inmunoconjugado puede ser un ácido nucleico. Los ácidos nucleicos que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, ARN anti-sentido, genes u otros polinucleótidos, análogos de ácidos nucleicos tales como tioguanina y tiopurina.

La presente invención proporciona adicionalmente inmunoconjugados que comprenden (i) una proteína de unión de la invención, preferentemente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, fijado a (2) una molécula efectora, en el que la molécula efectora es un marcador, que puede generar una señal detectable, indirecta o directamente. Estos inmunoconjugados pueden usarse en investigación o en aplicaciones de diagnóstico, tal como para la detección *in vivo* del cáncer. Preferentemente, el marcador puede producir, directa o indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, el marcador puede ser compuesto radio-opaco o radioisótopo, tal como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I , un compuesto fluorescente (fluoróforo) o quimioluminiscente (cromóforo), tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina o luciferina; una enzima, tal como fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o peroxidasa de rábano picante; un agente formador de imágenes; o un ión metálico.

En otra realización, el inmunoconjugado se detecta indirectamente. Por ejemplo, para detectar el inmunoconjugado puede usarse un anticuerpo secundario que sea específico para el inmunoconjugado y que contenga un marcador detectable.

La proteína de unión de la invención, preferentemente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, puede "unirse a" la molécula efectora mediante cualquier medio por el cual la proteína de unión puede asociarse con, o ligarse a, la molécula efectora. Por ejemplo, la molécula de unión puede unirse a la molécula efectora por medios químicos o recombinantes. En la técnica se conocen medios químicos para preparar fusiones o conjugados y pueden usarse para producir el inmunoconjugado. El procedimiento usado para conjugar la proteína de unión y la molécula efectora de ser capaz de unir la proteína de unión con la molécula efectora sin interferir con la capacidad de la proteína de unión para unirse al antígeno en la célula cancerosa.

La proteína de unión de la invención puede estar unida indirectamente a la molécula efectora. Por ejemplo, la proteína de unión puede estar unida directamente a un liposoma que contenga la molécula efectora de uno de diversos tipos. La molécula (o moléculas) efectora y/o la proteína de unión también pueden unirse a una superficie

sólida.

En una realización, la proteína de unión, preferentemente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, y la molécula efectora son proteínas y pueden conjugarse usando técnicas bien conocidas en el campo. Se dispone de varios cientos de reticulantes que pueden conjugar dos proteínas. (Véase, por ejemplo, "Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking" 1991, Shans Wong, CRC Press, Ann Arbo). El reticulante se selecciona generalmente basándose en los grupos funcionales reactivos disponibles o insertados en la proteína de unión, preferentemente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, y/o molécula efectora. Además, si no hay grupos reactivos, puede usarse un reticulante fotoactivable. En determinados casos, puede ser deseable incluir un espaciador entre la proteína de unión, preferentemente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, y la molécula efectora. Como agentes reticulantes conocidos en la técnica se incluyen los agentes homobifuncionales: glutaraldehído, dimetiladipimidato y Bis (diazobencidina) y los agentes heterobifuncionales: m maleinidobenzoil-N-hidroxisuccinimida y Sulfo-m Maleimidobenzoil-N-Hidroxisuccinimida.

También puede prepararse una fusión de proteína molécula efectora- proteína de unión usando técnicas de ADN recombinantes. En tal caso se fusiona una secuencia de ADN que codifica la proteína de unión con una secuencia de ADN que codifica la molécula efectora, dando como resultado una molécula de ADN quimérica. La secuencia de ADN quimérica se transfecta en una célula huésped que expresa la proteína de fusión. La proteína de fusión puede recuperarse del cultivo celular y purificarse usando técnicas conocidas en la materia.

Como ejemplos para unir una célula efectora, que es un marcador, con la proteína de unión, se incluyen los procedimientos descritos en Hunter, y col, Nature 144:945 (1962); David, y col, Biochemistry 13:1014 (1974); Pain, y col, J. Immunol. Meth. 40:219 (1981); Nygren, J. Histochem. And Cytochem. 30:407 (1982); Wensel y Meares, Radioimmunoimaging y Radioimmunotherapy, Elsevier, Nueva York (1983); y Colcher y col., "Use Of Monoclonal Antibodies As Radiopharmaceuticals For The Localization Of Human Carcinoma Xenografts In Athymic Mice", Meth. Enzymol., 121:802-16 (1986).

(D) Preparación de las proteínas de la invención

Un experto en la técnica apreciará que las proteínas de la invención, tales como las proteínas de unión que comprenden las regiones determinantes de la complementariedad de cadena ligera y pesada, las regiones variables de cadena ligera y pesada, anticuerpos y fragmentos de anticuerpo, inmunoconjugados y nuevos antígenos asociados a cáncer de la invención, pueden prepararse de cualquiera de las diversas formas, pero se preparan más preferentemente usando procedimientos recombinantes.

Por consiguiente, las moléculas de ácido nucleico que codifican las proteínas de la presente invención pueden incorporarse de una manera conocida en un vector de expresión apropiado que garantiza la buena expresión de las proteínas de la invención. Como posibles vectores de expresión se incluyen, pero sin limitación, cósmidos, plásmidos o virus modificados (por ejemplo, retrovirus de replicación defectuosa, adenovirus y virus adeno-asociados), siempre que el vector sea compatible con la célula huésped usada. El vector de expresión es "adecuado para la transformación de una célula huésped", lo que significa que los vectores de expresión contienen una molécula de ácido nucleico de la invención y secuencias reguladoras seleccionadas basándose en las células huésped a usar para la expresión, que están unidas operativamente a la molécula de ácido nucleico. La expresión unido operativamente pretende indicar que el ácido nucleico está unido a secuencias reguladoras de tal manera que permita la expresión del ácido nucleico.

La invención por lo tanto contempla un vector de expresión recombinante de la invención que contiene una molécula de ácido nucleico de la invención, o un fragmento de la misma, y las secuencias reguladoras necesarias para la transcripción y traducción de la secuencia de proteína insertada.

Las secuencias reguladoras adecuadas pueden derivar de diversas fuentes, incluyendo genes bacterianos, fúngicos, víricos, de mamíferos o de insectos (véanse, por ejemplo, las secuencias reguladoras descritas en Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). La selección de secuencias reguladoras apropiadas depende de la célula huésped seleccionada, como se indica más adelante y un experto en la técnica puede realizarlo fácilmente. Como ejemplos de dichas secuencias reguladoras se incluyen: una secuencia promotora y potenciadora transcripcional y de unión a la ARN polimerasa, una secuencia de unión ribosomal, incluyendo una señal de inicio a la traducción. Adicionalmente, dependiendo de la célula huésped seleccionada y del vector empleado, en el vector de expresión pueden incorporarse otras secuencias, tales como un origen de replicación, sitios de restricción de ADN adicionales, potenciadores y secuencias que confieren inducibilidad de transcripción.

Los vectores de expresión recombinantes de la invención también pueden contener un gen marcador de selección que facilite la selección de células huésped transformadas o transfectadas con una molécula recombinante de la invención. Son ejemplos de genes marcadores de selección los genes que codifican una proteína tal como G418 e higromicina que confiere resistencia a determinados fármacos, β -galactosidasa, cloramfenicol acetiltransferasa, luciferasa de luciérnaga, o una inmunoglobulina o parte de la misma tal como la parte Fc de una inmunoglobulina

preferentemente IgG. La transcripción del gen marcador de selección se controla por cambios en la concentración de la proteína marcadora de selección tal como β -galactosidasa, cloramfenicol acetiltransferasa o luciferasa de luciérnaga. Si el gen marcador de selección codifica una proteína que confiere resistencia a antibióticos tal como resistencia a neomicina, pueden seleccionarse células transformantes con G418. Las células que han incorporado el gen marcador de selección sobrevivirán, mientras que las otras células morirán. Esto hace que sea posible visualizar y ensayar la expresión de vectores de expresión recombinantes de la invención y en particular determinar el efecto de una mutación sobre la expresión y fenotipo. Se apreciará que los marcadores de selección pueden introducirse en un vector distinto al del ácido nucleico de interés.

Los vectores de expresión recombinantes también pueden contener genes que codifiquen un resto de fusión que proporcione expresión aumentada de la proteína recombinante; solubilidad aumentada de la proteína recombinante; y ayuda en la purificación de la proteína recombinante diana actuando como un ligando en la purificación por afinidad. Por ejemplo, después de la purificación de la proteína de fusión, puede añadirse un sitio de escisión proteolítico a la proteína recombinante diana para permitir la separación de la proteína recombinante del resto de fusión. Los vectores de expresión de fusión típicos incluyen pGEX (Amrad Corp., Melbourne, Australia), pMal (New England Biolabs, Beverly, MA) y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) que fusionan glutatión S-transferasa (GST), proteína de unión a maltosa E, o proteína A, respectivamente, con la proteína recombinante.

En las células huésped pueden introducirse vectores de expresión recombinantes para producir una célula huésped transformada. Las expresiones "transformado con", "transfectado con", "transformación" y "transfección" pretenden incluir la introducción de ácido nucleico (por ejemplo, un vector) en una célula mediante cualquiera de las muchas posibles técnicas conocidas en la materia. La expresión "célula huésped transformada", como se usa en el presente documento, pretende incluir también células que pueden realizar la glucosilación que se han transformado con un vector de expresión recombinante de la invención. Las células procarióticas pueden transformarse con ácido nucleico, por ejemplo, por electroporación o transformación mediada con cloruro de calcio. Por ejemplo, puede introducirse ácido nucleico en células de mamífero mediante técnicas convencionales tales como co-precipitación con fosfato de calcio o cloruro de calcio, transfección mediada con DEAE-dextrano, lipofectina, electroporación o microinyección. En Sambrook y col. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001) y en otros libros de texto de laboratorio pueden encontrarse procedimientos adecuados para transformar y transfectar células huésped.

Las células huésped adecuadas incluyen una diversidad de células huésped eucariotas y células procariotas. Por ejemplo, las proteínas de la invención pueden expresarse en células de levadura o en células de mamífero. En Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1991) pueden encontrarse otras células huésped adecuadas. Además, las proteínas de la invención pueden expresarse en células procariotas, tales como *Escherichia coli* (Zhang y col, Science 303 (5656): 371-3 (2004)). Además, pueden usarse sistemas de expresión basados en *Pseudomonas* tales como *Pseudomonas fluorescens* (publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2005/0186666, Schneider, Jane C y col).

Como células huésped de levaduras y hongos adecuadas para realizar la presente invención se incluyen, pero sin limitación, *Saccharomyces cerevisiae*, el género *Pichia* o *Kluyveromyces* y diversas especies del género *Aspergillus*. Como ejemplos de vectores de expresión en la levadura *S. cerevisiae* se incluyen pYepSec1 (Baldari y col., Embo J. 6:229-234 (1987)), pMFa (Kurjan y Herskowitz, Cell 30:933-943 (1982)), pJRY88 (Schultz y col, Gene 54:113-123 (1987)), y pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Los expertos en la técnica conocen bien protocolos para la transformación de levaduras y hongos (véase Hinnen y col, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 75:1929 (1978); Itoh y col, J. Bacteriology 153:163 (1983), y Cullen y Col. (BioTechnology 5:369 (1987)).

Como células de mamífero adecuadas para realizar la presente invención se incluyen, entre otras: células COS (por ejemplo, ATCC N° CRL 1650 o 1651), BHK (por ejemplo, ATCC N° CRL 6281), CHO (ATCC N° CCL 61), HeLa (por ejemplo, ATCC N° CCL 2), 293 (ATCC N° 1573) y NS-1. Los vectores de expresión adecuados para dirigir la expresión en células de mamífero generalmente incluyen un promotor (por ejemplo, derivado de material viral tal como polioma, Adenovirus 2, citomegalovirus y Virus de Simio 40), así como otras secuencias de control transcripcional o traduccional. Como ejemplos de vectores de expresión de mamíferos se incluyen pCDM8 (Seed, B., Nature 329:840 (1987)) y pMT2PC (Kaufman y Col., EMBO J. 6:187-195 (1987)).

Dadas las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, los promotores, terminadores y procedimientos para introducir vectores de expresión de un tipo apropiado en células de plantas, aves e insectos también pueden realizarse fácilmente. Por ejemplo, en una realización, las proteínas de la invención pueden expresarse en células de plantas (véase Sinkar y Col., J. Biosci (Bangalore) 11:47-58 (1987), que revisa el uso de vectores de *Agrobacterium rhizogenes*; véase también Zambryski y Col., Genetic Engineering, Principles and Methods, Hollaender y Setlow (eds.), Vol. VI, páginas 253-278, Plenum Press, Nueva York (1984), que describen el uso de vectores de expresión para células de plantas, incluyendo, entre otros, PAPS2022, PAPS2023, y PAPS2034).

Como células de insecto adecuadas para realizar la presente invención se incluyen células y líneas celulares de especies de *Bombyx*, *Trichoplusia* o *Spodoptera*. Los vectores de baculovirus adecuados para la expresión de proteínas en células de insecto cultivadas (células SF 9) incluyen la serie pAc (Smith y Col., Mol. Cell. 3:2156-2165 (1983)) y la serie pVL (Lucklow, VA, y Summers, MD, Virology 170:31-39 (1989)). Algunos sistemas de expresión en

células de insecto-baculovirus adecuados para la expresión de las proteínas recombinantes de la invención se describen en el documento PCT/US/02442.

Como alternativa, las proteínas de la invención también pueden expresarse en animales transgénicos no humanos tal como ratas, conejos, ovejas y cerdos (Hammer y col. Nature 315:680-683 (1985); Palmiter y Col. Science 222:809-814 (1983); Brinster y Col. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82:4438-4442 (1985); Palmiter y Brinster Cell 41:343-345 (1985) y Patente de Estados Unidos N° 4.736.866).

Las proteínas de la invención también pueden prepararse por síntesis química usando técnicas bien conocidas en la química de proteínas tal como síntesis en fase sólida (Merrifield, J. Am. Chem. Assoc. 85:2149-2154 (1964); Frische y Col., J. Pept. Sci. 2 (4): 212-22 (1996)) o síntesis en solución homogénea (Houbenweyl, Methods of Organic Chemistry, ed. E. Wansch, vol. 15 I y II, Thieme, Stuttgart (1987)).

Las proteínas de fusión N o C terminal que comprenden las proteínas de la invención conjugadas con otras moléculas, tales como proteínas, pueden prepararse por fusión, a través de técnicas recombinantes. Las proteínas de fusión resultantes contienen una proteína de la invención fusionada con la proteína seleccionada o proteína marcadora, como se describe en el presente documento. La proteína recombinante de la invención también puede conjugarse con otras proteínas mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, las proteínas pueden acoplarse usando engarces que contienen tiol heterobifuncional como se describe en el documento WO 90/10457, N-succinimidil-3-(2-piridilditio-propionato) o N-succinimidil-5 tioacetato. Como ejemplos de proteínas que pueden usarse para preparar proteínas de fusión o conjugados se incluyen proteínas de unión a células tales como inmunoglobulinas, hormonas, factores de crecimiento, lectinas, insulina, baja densidad.

Por consiguiente, la invención proporciona un vector de expresión recombinante que comprende las secuencias de ácido nucleico que codifican las proteínas de la invención, tales como las regiones determinantes de la complementariedad de cadena ligera y pesada, las regiones variables de cadena ligera y pesada, las proteínas de unión, tales como anticuerpos y fragmentos de anticuerpo, inmunoconjugados de la invención y nuevas proteínas aisladas de la invención. Además, la invención proporciona una célula huésped que comprende el vector de expresión recombinante de la invención.

(E) Procedimientos terapéuticos y composiciones farmacéuticas de las proteínas de unión e inmunotoxinas de la invención

Los autores de la invención han mostrado que las proteínas de unión de la invención se unen al transportador de glucosa 8 o a sus variantes; a una proteína que comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos definida por las SEC ID N°: 11-20, preferentemente 11, 12 o 13; o a una variante asociada con cáncer del transportador de glucosa 8. En una realización de la invención, la variante asociada con cáncer de GLUT8, comprende la secuencia de aminoácidos definida por una cualquiera de las SEC ID N°: 11, 12 o 13, o variantes de las mismas. En otra realización de la invención, la variante asociada con cáncer de GLUT8, comprende GLUT8 que tiene una modificación en el motivo di-leucina N-terminal. En una realización adicional de la invención, el motivo di-leucina N-terminal se ha modificado por di-alanina.

Además, los autores de la invención han mostrado que las proteínas de unión de la invención presentan especificidad por células cancerosas y que están internalizadas por la célula. Por tanto, las proteínas de unión de la invención pueden usarse para la administración dirigida de agentes bioactivos o importantes desde el punto de vista médico, tales como agentes formadores de imágenes, radioactivos o citotóxicos.

En una realización, la invención proporciona un procedimiento de tratamiento o prevención del cáncer, que comprende administrar a un sujeto que padece o que se sospecha que padece cáncer, una cantidad eficaz del inmunoconjugado de la invención. En otra realización, la invención proporciona el uso de una cantidad eficaz del inmunoconjugado de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención del cáncer. Además, la invención proporciona el uso de una cantidad eficaz del inmunoconjugado del cáncer. Adicionalmente la invención proporciona el uso de una cantidad eficaz del inmunoconjugado de la invención, que comprende adicionalmente el uso de un agente terapéutico adicional contra el cáncer para la preparación de un medicamento para el tratamiento simultáneo, individual o secuencial o prevención del cáncer. La invención también proporciona el uso de una cantidad eficaz del inmunoconjugado de la invención para el tratamiento o prevención del cáncer. Además, la invención proporciona el uso de una cantidad eficaz del inmunoconjugado de la invención, que adicionalmente comprende el uso de un agente terapéutico adicional contra el cáncer para el tratamiento simultáneo, individual o secuencial o la prevención del cáncer.

En una realización de la invención, el cáncer incluye, sin limitación, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de próstata, así como cáncer de cuello uterino, cáncer uterino, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de hígado, cáncer hepático, cáncer de cabeza y cuello, carcinoma de células escamosas, cáncer gastrointestinal, cáncer de mama (tal como carcinoma, ductal, lobular y de pezón), cáncer pulmonar, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, leucemia (tal como leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda y leucemia mielógena crónica), cáncer cerebral, neuroblastoma, sarcomas, cáncer de recto, cáncer de vejiga, cáncer pancreático, cáncer endometrial, plasmacitoma, linfoma y melanoma. En una realización preferida, el cáncer incluye,

sin limitación, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, cáncer renal, melanoma, cáncer hepático, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de estómago y cáncer de cabeza y cuello.

5 La capacidad del inmunoconjugado de la invención para inhibir o destruir selectivamente células con cáncer puede ensayarse fácilmente *in vitro* usando líneas celulares cancerosas. El efecto inhibitor selectivo de los inmunoconjugados de la invención puede determinarse, por ejemplo, demostrando la inhibición selectiva de proliferación celular de las células cancerosas.

10 La toxicidad también puede medirse basándose en la viabilidad celular, por ejemplo, puede comprarse la viabilidad de cultivos de células cancerosas y normales expuestos al inmunoconjugado. La viabilidad celular puede evaluarse mediante técnicas conocidas, tales como ensayos de exclusión con azul de tripano.

15 En otro ejemplo, para ensayar la eficacia de los inmunoconjugados de la invención pueden usarse diversos modelos. Thompson, EW y Col. (Breast Cancer Res. Treatment 31:357-370 (1994)) han descrito un modelo para determinar la invasividad de células cancerosas de mama humano *in vitro* midiendo la proteólisis mediada por células tumorales de la matriz extracelular y la invasión de células tumorales de membranas basales reconstituidas (colágeno, laminina, fibronectina, matrigel o gelatina). Otros modelos de células de cáncer aplicables incluyen células de adenocarcinoma de ovario cultivadas (Young, T.N. y col. Gynecol. Oncol. 62:89-99 (1996); Moore, DH y col. Gynecol. Oncol. 65:78-82 (1997)), células de cáncer tiroideo folicular humano (Demeure, M.J. y col., World J. Surg. 16:770-776 (1992)), líneas celulares de melanoma humano (A-2058) y fibrosarcoma (HT-1080) (Mackay, A.R. y col. Lab. Invest. 70:781 783 (1994)), y líneas de células escamosas de pulmón (HS-24) y de adenocarcinoma (SB-3) (Spiess, E. y col. J. Histochem. Cytochem. 42:917-929 (1994)). También se describe un sistema de ensayo *in vivo* que implica el implante de tumores y la medición del crecimiento tumoral y metástasis en ratones desnudos atímicos (Thompson, E.W. y col., Breast Cancer Res. Treatment 31:357-370 (1994); Shi, Y.E. y col., Cancer Res. 53:1409-1415 (1993)).

25 El inmunoconjugado de la invención puede formularse en composiciones farmacéuticas para la administración a sujetos en una forma biológicamente compatible adecuada para la administración *in vivo*. Las sustancias pueden administrarse a organismos vivos, incluyendo seres humanos y animales. La administración de una cantidad terapéuticamente activa de las composiciones farmacéuticas de la presente invención se define como una cantidad eficaz, a dosificaciones y durante períodos de tiempo necesarios para conseguir el resultado deseado. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente activa de una sustancia puede variar de acuerdo con factores tales como la patología, la edad, el sexo y el peso del individuo, y de acuerdo con la capacidad de la proteína recombinante de la invención de suscitar una respuesta deseada en el individuo. El régimen de dosificación puede ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, pueden administrarse diversas dosis divididas diariamente o la dosis puede reducirse proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación terapéutica.

30 Por consiguiente, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento o prevención del cáncer que comprende los inmunoconjugados de la invención, y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. En una realización preferida, la molécula efectora del inmunoconjugado en la composición farmacéutica es un agente terapéutico contra el cáncer, más preferentemente una toxina.

35 La preparación farmacéutica que comprende el inmunoconjugado de la invención puede administrarse por vía sistémica. La preparación farmacéutica puede administrarse directamente en el lugar donde se encuentra el cancer. Dependiendo de la vía de administración, el inmunoconjugado puede revestirse con un material para proteger al compuesto de la acción de enzimas, ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

40 El inmunoconjugado puede suministrarse al paciente administrándolo directamente. La composición farmacéutica puede administrarse en al menos en una cantidad suficiente para conseguir el punto final, y si fuera necesario, comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 El riesgo de complicaciones post-quirúrgicas puede reducirse administrando una cantidad eficaz del inmunógeno de la invención antes, durante y después de la cirugía para tratar el cáncer.

50 Las composiciones descritas en el presente documento pueden prepararse por procedimientos de por sí conocidos para la preparación de composiciones farmacéuticamente aceptables que pueden administrarse a sujetos, de tal manera que una cantidad eficaz de la sustancia activa se combine en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, en Remington Pharmaceutical Sciences (Remington Pharmaceutical Sciences 20^a ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, USA, 2000) se describen vehículos adecuados. Basándose en esto, las composiciones incluyen, aunque no exclusivamente, soluciones de las sustancias en asociación con uno o más vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, e incluidas en soluciones tampón con un pH adecuado e isoosmótico con los fluidos fisiológicos.

55 Las composiciones farmacéuticas incluyen, sin limitación, polvos liofilizados o soluciones o suspensiones inyectables estériles acuosas o no acuosas, que adicionalmente pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que las composiciones sean sustancialmente compatibles con los tejidos o la sangre del receptor

- deseado. Otros componentes que pueden estar presentes en dichas composiciones incluyen agua, tensioactivos (tales como Tween), alcoholes, polioles, glicerina y aceites vegetales, por ejemplo. Las soluciones y suspensiones para inyección improvisada pueden prepararse a partir de polvos estériles, gránulos, comprimidos o soluciones o suspensiones concentradas. El inmunoc conjugado puede proporcionarse, por ejemplo, pero no a modo de limitación, como un polvo liofilizado que se reconstituye con agua estéril o solución salina antes de la administración al paciente.
- Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen básicamente composiciones no tóxicas y químicamente inertes que no interfieran con la eficacia de la actividad biológica de la composición farmacéutica. Como ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se incluyen, pero sin limitación, agua, soluciones salinas, soluciones de glicerol, etanol, cloruro de N-(1(2,3-dioleiloxi)propil)N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), diolesilfosfotidil-etanolamina (DOPE) y liposomas. Dichas composiciones deben contener una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, junto con una cantidad adecuada de vehículo para proporcionar la forma para la administración directa al paciente.
- Las composiciones pueden estar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable que incluye, sin limitación, las formadas con grupos amino libres tales como los derivados de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las formadas con grupos carboxilo libres tales como los derivados de hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, hierro, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc.
- Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse directamente por vía sistémica o directamente a la zona del tumor (o tumores).
- Las composiciones farmacéuticas pueden usarse para el tratamiento de animales incluyendo mamíferos, preferentemente seres humanos, con cáncer. La dosificación y el tipo del inmunoc conjugado a administrar dependerá de diversos factores que pueden controlarse fácilmente en sujetos humanos. Dichos factores incluyen la etiología y la gravedad (grado y fase) del cáncer.
- Los desenlaces clínicos de los tratamientos contra el cáncer usando los inmunoc conjugados de la invención son fácilmente discernibles para un experto, tal como un médico, en la técnica en cuestión. Por ejemplo, ensayos médicos convencionales para medir marcadores clínicos del cáncer pueden ser fuertes indicadores de la eficacia del tratamiento. Dichos ensayos pueden incluir, sin limitación, revisión médica, escalas de rendimiento, marcadores de enfermedad, ECG de 12 derivaciones, mediciones tumorales, biopsia de tejidos, cistoscopia, citología, mayor diámetro de cálculos tumorales, radiografía, formación digital de imágenes del tumor, signos vitales, peso, registro de acontecimientos adversos, evaluación de episodios infecciosos, evaluación de medicaciones simultáneas, evaluación del dolor, química de sangre o suero, análisis de orina, exploración CT y análisis farmacocinético. Además, los efectos sinérgicos de una terapia de combinación, que comprende el inmunoc conjugado y otro agente terapéutico contra el cáncer, pueden determinarse mediante estudios comparativos con pacientes que se someten a monoterapia.
- La presente solicitud también contempla un kit para el tratamiento o prevención del cáncer que comprende una cantidad eficaz del inmunoc conjugado de la invención e instrucciones para el uso del mismo para el tratamiento del cáncer.
- En la mayoría de las terapias anticancerosas autorizadas, la terapia anticancerosa se usa en combinación con otras terapias anticancerosas. Por consiguiente, el cáncer puede prevenirse o tratarse usando el inmunoc conjugado de la invención en combinación con al menos una terapia adicional contra el cáncer. Las otras terapias contra el cáncer pueden administrarse antes, solapándose con, simultáneamente y/o después de la administración del inmunoc conjugado. Cuando se administran simultáneamente, el inmunoc conjugado y el otro agente terapéutico contra el cancer, pueden administrarse en una sola formulación o en formulaciones individuales, y si se administra individualmente, entonces opcionalmente, mediante diferentes modos de administración. La combinación de uno o más inmunoc conjugados y una o más de otras terapias contra el cáncer puede actuar sinérgicamente para combatir el tumor o cáncer. Las otras terapias contra el cáncer incluyen, sin limitación, radiación y otros agentes terapéuticos anticancerosos. Estos otros agentes terapéuticos contra el cáncer pueden incluir, sin limitación, 2,2',2''triclorotrietilamina, 6-azauridina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, 6-mercaptopurina, aceglarona, aclacinomicinas, actinomicina, alretamina, aminoglutetimida, amsacrina, anastrozol, ancitabina, oligonucleótido antisentido de angiogenina, antramicina, azacitidina, azaserina, aziridina, batimastar, oligonucleótido antisentido bcl-2, benzodepa, bicalutamida, bisantreno, bleomicina, buserelina, busulfán, cactinomicina, calusterona, carboplatino, carboquona, carminomicina, carmofur, carmustina, carrubicina, carzinofilina, clorambucilo, clornafazina, acetato de clormadinona, clorozotocina, cromomicinas, cisplatino, cladribina, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina, dactinomicina, daunorrubicina, defosfamida, demecolcina, denopterina, detorrubicina, diaziquona, docetaxel, doxiluridina, doxorubicina, droloxifeno, dromostanolone, edatrexato, eflomitina, acetato de eliptinum, emitetur, enocitabine, epiirubicina, epitiostanol, esorubicina, estramustina, etoglúcido, etopósido, fadrozol, fenretinida, floxuridina, fludarabina, fluorouracilo, flutamida, ácido fólnico, formestano, fosfestrol, fotemustina, nitrato de galio, gemcitabina, goserelina, hexestrol, hidroxurea, idarrubicina, ifosfamida, improsulfán, interferón alfa, interferón beta, interferón gamma, interleucina-1, L-asparaginasa, lentinan, letrozol, leuprolida, lomustina, lonidamina, manomustina,

marcelomicina, mecloretamina, óxido de clorhidrato de mecloretamina, medroxiprogesterona, acetato de megestrol, melengestrol, melfalán, menogaril, mepitiostano, metotrexato, meturedpa, miboplatino, miltefosina, mitobronitol, mitoguazona, mitolactol, mitomicinas, mitotano, mitoxantrona, mopidamol, ácido micofenólico, nilutamida, nimustina, nitracina, nogalamicina, novembichina, olivomicinas, oxaliplatino, paclitaxel, pentostatina, peplomicina, perfosfamida, fenamet, fenesterina, pipobroman, pipsulfan, pirarrubicina, piritrexim, plicamicin, ácido podofilínico 2-etil-hidrazida, fosfato de poliestradiol, porfimer sódico, porfiromicina, prednimustina, procabazina, propagermano, PSK, pteropterina, puromicina, quelamicina, ranimustina, razoxano, rodorrubicina, roquinimex, sizofican, sobuzoxano, espirogermano, estreptonigrina, estreptozocina, tamoxifeno, taxotere, tegafur, temozolomida, tenipósido, ácido tenuzónico, testolacona, tiamiprina, tioguanina, tiotepa, tomudex, topotecán, toremifeno, triaziquona, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trielentiofosforamida, trilostano, trimetrexato, triptorelina, trofosfamida, trontecán, tubercidina, ubenimex, mostaza de uracilo, uredpa, uretano, vinblastina, vincristina, zinostatina y zorubicina, arabinósido de citosina, gemtuzumab, tioepa, ciclofosfamida, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptapurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracilo, fludarabina, gemcitabina, dacarbazina, temozoamida), hexametilmelamina, LYSODREN, análogos de nucleósidos, alcaloides de plantas (por ejemplo, taxol, paclitaxel, espirogermano, topotecán, irinotecán (CAMPTOSAR, CPT-11), vincristina, vinca alcaloides tales como vinblastina), podofilotoxina, epipodofilotoxina, VP-16 (etopósido), citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina), doxorrubicina liposomal, dihidroxiantracindiona, mitramicina, actinomicina D, aldesleucina, alutamina, biaomicina, capecitabina, carboplatino, clorabusín, ciclarabina, daclinomicina, floxurida, acetato de lauprolida, levamisol, lomuslina, mercaptopurino, mesna, mitolanc, pegaspergasa, pentoslatina, picamicina, riuxlmab, campat-1, estraplozocina, tretinoína, oligonucleótido antisentido VEGF, vindesina, y vinorelbina. La presente invención también contempla composiciones que comprenden uno o más agentes terapéuticos contra el cáncer (por ejemplo, FLAG, CHOP). FLAG comprende fludarabina, citosina, arabinósido de citosina (Ara-C) y G-CSF. CHOP comprende ciclofosfamida, vincristina, doxorrubicina y prednisona. Para un listado completo de agentes terapéuticos contra el cáncer conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, la última edición de The Merck Index and the Physician's Desk Reference.

Las composiciones farmacéuticas para terapia de combinación también pueden incluir, sin limitación, antibióticos (por ejemplo dactinomicina, bleomicina, mitramicina, antramicina), asparaginasa, Bacilo de Calmette y Guerin, toxina diftérica, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, agentes anti-mitóticos, abrina, ricina A, exotoxina de Pseudomonas, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador de plasminógeno tisular, agentes antihistamínicos, agentes anti-eméticos, etc.

Por supuesto, la administración de una cantidad eficaz de un inmunoconjugado a un paciente que necesite dicho tratamiento, puede dar como resultado reducir la dosis del otro agente terapéutico contra el cáncer que tiene eficacia clínicamente significativa. Dicha eficacia de la reducción de la dosis del otro agente terapéutico contra el cáncer no puede observarse si falta la administración con un inmunoconjugado. Por consiguiente, el tratamiento de un tumor o cáncer puede comprender administrar una dosis reducida de uno o más de los otros agentes terapéuticos contra el cáncer.

Además, una terapia de combinación para un paciente que necesite dicho tratamiento, que comprenda un inmunoconjugado, puede permitir tiempos de tratamiento relativamente cortos cuando se compara con la duración o número de ciclos de regímenes de tratamiento convencionales. Por consiguiente, el tratamiento de un tumor o cáncer puede comprender administrar uno o más de los otros agentes terapéuticos contra el cáncer para una duración de relativamente corta y/o en escasos ciclos de tratamiento.

Por tanto, las terapias de combinación que comprenden un inmunoconjugado y otro agente terapéutico contra el cáncer pueden reducir la toxicidad (es decir, efectos secundarios) del tratamiento global del cáncer. Por ejemplo, puede observarse toxicidad reducida cuando se compara con una monoterapia o con otra terapia de combinación, cuando se administra una dosis reducida de inmunoconjugado y/u otro agente terapéutico contra el cáncer y/o cuando se reduce la duración de un ciclo (es decir, el periodo de una sola administración o el periodo de una serie de dichas administraciones) y/o cuando se reduce el número de ciclos.

Por consiguiente la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un inmunoconjugado de acuerdo con la presente invención y uno o más agentes terapéuticos adicionales contra el cáncer, opcionalmente en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La presente solicitud también describe un kit que comprende una cantidad eficaz de un inmunoconjugado, opcionalmente combinado con uno o más agentes terapéuticos contra el cáncer, junto con instrucciones para su uso para tratar el cáncer.

Como se ha expuesto anteriormente, la terapia de combinación con un inmunoconjugado puede sensibilizar el cáncer o el tumor mediante la administración de un agente terapéutico adicional contra el cáncer. Por consiguiente, pueden usarse terapias de combinación para prevenir, tratar y/o prevenir la reaparición de cáncer, que comprenden administrar una cantidad eficaz de un inmunoconjugado antes de, después de o simultáneamente con, una dosis reducida de un agente terapéutico contra el cáncer. Por ejemplo, el tratamiento con un inmunoconjugado puede aumentar la sensibilidad de un cáncer o tumor a exposición posterior con una dosis de agente terapéutico contra el cáncer. La dosis es casi, o está por debajo del intervalo inferior de dosificaciones convencionales cuando el agente

terapéutico contra el cáncer se administra en solitario, o en ausencia de un inmunocombinado. Cuando se administra simultáneamente, el inmunocombinado puede administrarse por separado del agente terapéutico contra el cáncer, y opcionalmente, mediante un modo de administración diferente.

5 En una realización alternativa, la administración del agente terapéutico adicional contra el cáncer puede sensibilizar el cáncer o tumor contra el inmunocombinado o proteína de unión. En dicha realización, el agente terapéutico adicional contra el cáncer puede proporcionarse antes de la administración del inmunocombinado o de la proteína de unión.

10 En una realización, el agente terapéutico adicional contra el cáncer comprende cisplatino, por ejemplo, PLATINOL o PLATINOL-AQ (Bristol Myers), a una dosis que varía de aproximadamente 5 a 10, de 11 a 20, de 21 a 40 o de 41 a 75 mg/m²/ciclo.

En otra realización, el agente terapéutico adicional contra el cáncer comprende carboplatino, por ejemplo, PARAPLATINO (Bristol Myers), a una dosis que varía de aproximadamente 2 a 3, de 4 a 8, de 9 a 16, de 17 a 35 o de 36 a 75 mg/m²/ciclo.

15 En una realización, el agente terapéutico adicional contra el cáncer comprende ciclofosfamida, por ejemplo, CYTOXAN (Bristol Myers Squibb), a una dosis que varía de aproximadamente 0,25 a 0,5, de 0,6 a 0,9, de 1 a 2, de 3 a 5, de 6 a 10, de 11 a 20 o de 21 a 40 mg/kg/ciclo.

20 En otra realización, el agente terapéutico adicional contra el cáncer comprende citarabina, por ejemplo, CYTOSAR-U (Pharmacia & Upjohn), a una dosis que varía de aproximadamente 0,5 a 1, de 2 a 4, de 5 a 10, de 11 a 25, de 26 a 50 o de 51 a 100 mg/m²/ciclo. En otra realización, el agente terapéutico adicional contra el cáncer comprende liposoma de citarabina, por ejemplo, DEPOCYT (Chiron Corp.), a una dosis que varía de aproximadamente 5 a 50 mg/m²/ciclo.

En otra realización, el agente terapéutico adicional contra el cáncer comprende dacarbazina, por ejemplo, DTIC o DTICDOME (Bayer Corp.), a una dosis que varía de aproximadamente 15 a 250 mg/m²/ciclo o que varía de aproximadamente 0,2 a 2 mg/kg/ciclo.

25 En otra realización, el agente terapéutico adicional contra el cáncer comprende topotecán, por ejemplo, HYCAMTIN (SmithKline Beecham), a una dosis que varía de aproximadamente 0,1 a 0,2, de 0,3 a 0,4, de 0,5 a 0,8 o de 0,9 a 1,5 mg/m²/ciclo. En otra realización, el agente terapéutico adicional contra el cáncer comprende irinotecán, por ejemplo, CAMPTOSAR (Pharmacia & Upjohn), a una dosis que varía de aproximadamente 5 a 9, de 10 a 25 o de 26 a 50 mg/m²/ciclo.

30 En otra realización, el agente terapéutico adicional contra el cáncer comprende fludarabina, por ejemplo, FLUDARA (Berlex Laboratories), a una dosis que varía de aproximadamente 2,5 a 5, de 6 a 10, de 11 a 15 o de 16 a 25 mg/m²/ciclo.

35 En otra realización, el agente terapéutico adicional contra el cáncer comprende arabinósido de citosina (Ara-C), a una dosis que varía de aproximadamente 200 a 2.000 mg/m²/ciclo, de 300 a 1000 mg/m²/ciclo, de 400 a 800 mg/m²/ciclo o de 500 a 700 mg/m²/ciclo.

En otra realización, el agente terapéutico adicional contra el cáncer comprende docetaxel, por ejemplo, TAXOTERE (Rhone Poulenc Rorer) a una dosis que varía de aproximadamente 6 a 10, de 11 a 30 o de 31 a 60 mg/m²/ciclo.

40 En otra realización, el agente terapéutico adicional contra el cáncer comprende paclitaxel, por ejemplo, TAXOL (Bristol Myers Squibb), a una dosis que varía de aproximadamente 10 a 20, de 21 a 40, de 41 a 70 o de 71 a 135 mg/kg/ciclo.

En otra realización, el agente terapéutico adicional contra el cáncer comprende 5-fluorouracilo a una dosis que varía de aproximadamente 0,5 a 5 mg/kg/ciclo, de 1 a 4 mg/kg/ciclo o de 2-3 mg/kg/ciclo.

45 En otra realización, el agente terapéutico adicional contra el cáncer comprende doxorubicina, por ejemplo, ADRIAMYCIN (Pharmacia & Upjohn), DOXIL (Alza), RUBEX (Bristol Myers Squibb), a una dosis que varía de aproximadamente 2 a 4, de 5 a 8, de 9 a 15, de 16 a 30 o de 31 a 60 mg/kg/ciclo.

En otra realización, el agente terapéutico adicional contra el cáncer comprende etopósido, por ejemplo, VEPESID (Pharmacia & Upjohn), a una dosis que varía de aproximadamente 3,5 a 7, de 8 a 15, de 16 a 25 o de 26 a 50 mg/m²/ciclo.

50 En otra realización, el agente terapéutico adicional contra el cáncer comprende vinblastina, por ejemplo, VELBAN (Eli Lilly), a una dosis que varía de aproximadamente 0,3 a 0,5, de 0,6 a 0,9, de 1 a 2 o de 3 a 3,6 mg/m²/ciclo.

En otra realización, el agente terapéutico adicional contra el cáncer comprende vincristina, por ejemplo, ONCOVIN (Eli Lilly), a una dosis que varía de aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6 o 0,7 mg/m²/ciclo.

En otra realización, el agente terapéutico adicional contra el cáncer comprende metotrexato a una dosis que varía de aproximadamente 0,2 a 0,9, de 1 a 5, de 6 a 10 o de 11 a 20 mg/m²/ciclo.

55 En otra realización, se administra un inmunocombinado en combinación con al menos otro agente inmunoterapéutico que incluye, sin limitación, rituxan, rituximab, campath-1, gemtuzumab y trastuzumab.

En otra realización, se administra un inmunoconjugado en combinación con uno o más agentes anti-angiogénicos que incluyen, sin limitación, angiostatina, talidomida, kringle 5, endostatina, Serpina (Inhibidor de Serina Proteasa), anti-trombina, fragmentos proteolíticos N-terminal de 29 kDa y C-terminal de 40 kDa de fibronectina, un fragmento proteolítico de 16 kDa de prolactina, un fragmento proteolítico de 7,8 kDa de factor plaquetario-4, un péptido de 13 aminoácidos correspondiente a un fragmento del factor plaquetario-4 (Maione y col., 1990, Cancer Res. 51: 2077-2083), un péptido de 14 aminoácidos correspondiente a un fragmento de colágeno I (Tolma y col., 1993, J. Cell Biol. 122: 497-511), un péptido de 19 aminoácidos correspondiente a un fragmento de Trombospondina I (Tolsma y col., 1993, J. Cell Biol. 122: 497-511), un péptido de 20 aminoácidos correspondiente a un fragmento de SPARC (Sage y col., 1995, J. Cell. Biochem. 57: 1329-1334), y una variante de los mismos, que incluye un sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

En otra realización, se administra un inmunoconjugado en combinación con un régimen de radioterapia. La terapia también puede comprender cirugía y/o quimioterapia. Por ejemplo, el inmunoconjugado puede administrarse en combinación con radioterapia y cisplatino (Platinol), fluorouracilo (5-FU, Aduvicol), carboplatino (Paraplatin), y/o paclitaxel (Taxol). El tratamiento con el inmunoconjugado puede permitir el uso de menos dosis de radiación y/o tratamientos de radiación menos frecuentes, que pueden, por ejemplo, reducir la frecuencia del grave ardor de garganta que impide realizar la deglución dando posiblemente como resultado la pérdida de peso o deshidratación no deseadas.

En otra realización, se administra un inmunoconjugado en combinación con una o más citocinas que incluyen, sin limitación, una linfocina, factores de necrosis tumoral, citosina similar al factor de necrosis tumoral, linfotóxica, interferón, proteína inflamatoria de macrófagos, factor estimulante de colonias de granulocitos monocitos, interleucina (incluyendo, sin limitación, interleucina-1, interleucina-2, interleucina-6, interleucina-12, interleucina-15, interleucina-18) y una variante de los mismos incluyendo un sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

En otra realización adicional, se administra un inmunoconjugado en combinación con una vacuna contra el cáncer o agentes biológicos que incluyen, sin limitación, células o tejidos autólogos, células o tejidos no autólogos, antígeno carcinoembrionario, alfa-fetoproteína, gonadotropina coriónica humana, vacuna viva de BCG, complejos de ADN de la pared celular micobacteriana, proteínas de linaje melanocítico y antígenos mutados, específicos de tumores.

En otra realización adicional, se administra un inmunoconjugado en asociación con terapia hormonal. Los agentes terapéuticos hormonales incluyen, sin limitación, un agonista hormonal, un antagonista hormonal (por ejemplo, flutamida, tamoxifeno, acetato de leuprolida (LUPRON)) y esteroides (por ejemplo, dexametasona, retinoides, betametasona, cortisol, cortisona, prednisona, dehidrotestosterona, glucocorticoides, mineralocorticoides, estrógenos, testosterona, progestina).

En otra realización adicional, se administra un inmunoconjugado en asociación con un programa de terapia génica para el tratamiento o prevención del cáncer.

La terapia de combinación puede por tanto aumentar la sensibilidad del cáncer o tumor contra el inmunoconjugado y/o agente terapéutico adicional contra el cáncer administrado. De esta manera, pueden ser posibles ciclos de tratamiento más cortos, reduciendo de esta manera los acontecimientos tóxicos. La duración del ciclo puede variar de acuerdo con el agente terapéutico específico contra el cáncer usado. La invención también contempla la administración continua o discontinua, o dosis diarias divididas en diversas administraciones parciales. El experto en la técnica apreciará el ciclo de duración apropiado para un agente terapéutico específico contra el cáncer y la invención contempla la valoración continua de programas de tratamiento óptimos para cada agente terapéutico contra el cáncer. En la técnica se conocen directrices específicas para el experto. Véase, por ejemplo, Therasse y col., 2000, "New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada", J Natl Cancer Inst. 2 feb; 92(3): 205-16.

Se contempla que el inmunoconjugado pueda administrarse mediante cualquier procedimiento adecuado tal como inyección, administración oral, inhalación, administración transdérmica o intratumoral, mientras que cualquier otro agente terapéutico contra el cáncer puede administrarse al paciente mediante el mismo, u otro, modo de administración. Adicionalmente, cuando se pretende administrar al paciente los agentes terapéuticos múltiples contra el cáncer, el inmunoconjugado y uno o más de los otros agentes terapéuticos contra el cáncer pueden administrarse mediante un procedimiento, mientras que los otros agentes terapéuticos contra el cáncer pueden administrarse mediante otro modo de administración.

(F) Procedimientos de diagnóstico y agentes que usan las proteínas de unión e inmunotoxinas de la invención

Las proteínas de unión de la invención se unen selectivamente a células cancerosas o a moléculas internalizadas por las células cancerosas y no se unen significativamente a células normales. Por lo tanto, las proteínas de unión pueden usarse en el diagnóstico del cáncer. Como se ha expuesto anteriormente, los autores de la invención han demostrado que las proteínas de unión de la invención se unen al transportador de glucosa 8 o a variantes del mismo; a proteínas que comprenden una cualquiera de las secuencias de aminoácidos definidas por las SEC ID N°: 11-20; o a una variante asociada con cáncer del transportador de glucosa 8. En una realización de la invención, la variante asociada con cáncer de GLUT8 comprende la secuencia de aminoácido definida por una cualquiera de las SEC ID N°: 11, 12 o 13, o variantes de las mismas. La variante asociada con cáncer de GLUT8 comprende GLUT8

que tiene una modificación en el motivo di-leucina N-terminal, en el que el motivo di-leucina N-terminal se ha modificado por di-alanina.

En una realización preferida, las proteínas de unión son anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de la invención. Además, las células cancerosas pueden evaluarse para determinar su susceptibilidad hacia los procedimientos de tratamiento de la invención, obteniendo, por ejemplo, una muestra de las células cancerosas y determinando la capacidad de la muestra de unirse a las proteínas de unión de la invención, preferentemente anticuerpos o fragmentos de anticuerpo.

Por consiguiente, la presente invención incluye procedimientos de diagnóstico, agentes y kits que pueden usarse por sí mismos o antes, durante o después del procedimiento terapéutico de la invención para determinar si existe una célula, cancerosa o no, que exprese el antígeno y que pueda unirse a las proteínas de unión de la invención, preferentemente anticuerpos y fragmentos de anticuerpo.

En una realización, la invención proporciona un procedimiento para detectar o controlar cáncer en un sujeto que comprende las etapas de

(1) poner en contacto una muestra de ensayo, extraída de dicho sujeto, con las proteínas de unión de la invención y que se unen específicamente a un antígeno en la célula cancerosa para producir un complejo proteína de unión-antígeno;

(2) medir la cantidad de complejo proteína de unión-antígeno en la muestra de ensayo; y

(3) comparar la cantidad de complejo proteína de unión-antígeno en la muestra de ensayo con un control.

En una realización, el antígeno es el transportador de glucosa 8 o una variante del mismo; una proteína que comprende una cualquiera de una de las secuencias de aminoácidos definidas por las SEC ID N°: 11-20, preferentemente las SEC ID N°: 11, 12 o 13; o una variante asociada con cáncer del transportador de glucosa 8. En una realización, la variante asociada con cáncer del transportador de glucosa 8 comprende una mutación en el motivo di-leucina N-terminal de tal manera que la variante del transportador de glucosa 8 se localiza en la membrana celular.

La presente solicitud contempla adicionalmente un kit para el diagnóstico del cáncer que comprende una cualquiera de las proteínas de unión de la invención que se unen a un antígeno sobre la célula cancerosa e instrucciones para el uso de las mismas para diagnosticar el cáncer.

Para su uso en las aplicaciones de diagnóstico, las proteínas de unión de la invención, preferentemente anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, pueden marcarse con un marcador detectable, tal como un compuesto radio-opaco o radioisótopo, tal como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{123}I , ^{125}I , ^{131}I ; un compuesto fluorescente (fluoróforo) o quimioluminescente (cromóforo) tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina o luciferina; una enzima, tal como, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o peroxidasa de rábano picante; un agente formador de imágenes; o un ión metálico. Como se ha descrito anteriormente, en la técnica se conocen procedimientos para unir un marcador con una proteína de unión, tal como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

La presente solicitud también describe un procedimiento para detectar o controlar el cáncer en un sujeto que comprende las etapas de

(1) medir la cantidad de anticuerpos de la invención en una muestra de ensayo extraída de dicho sujeto; y

(2) comparar con un control la cantidad de anticuerpos de la invención en la muestra de ensayo.

En una realización, la cantidad de anticuerpos de la invención se mide midiendo la cantidad de anticuerpos de la invención en la muestra de ensayo, por ejemplo por ELISA. En otra realización, la cantidad de anticuerpos de la invención se mide midiendo los niveles de expresión de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos de la invención en la muestra de ensayo, por ejemplo por RT-PCR.

(G) Composiciones farmacéuticas, procedimientos y usos del nuevo antígeno asociado con cáncer

La invención proporciona un nuevo antígeno asociado con cáncer que se expresa en la superficie de células cancerosas y que no se expresa significativamente en la superficie de células normales. Por tanto, el nuevo antígeno asociado con cáncer puede usarse en terapias para tratar y prevenir el cáncer, incluyendo el uso del nuevo antígeno asociado con cáncer o sus fragmentos para suscitar una respuesta inmunitaria *in vivo*. Además, la nueva variante asociada con cáncer de GLUT8 puede usarse para detectar o controlar el cáncer.

(i) Composiciones farmacéuticas

Una realización de la invención es una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de una proteína aislada que comprende la nueva variante asociada con cáncer de GLUT8 expresada en la superficie de células cancerosas que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 11, 12 o 13 o una variante funcional o fragmento de las mismas, mezclada con un diluyente o vehículo adecuado. Otra realización de la invención es una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un ácido nucleico aislado que codifica la proteína aislada mezclada con un diluyente o vehículo adecuado. Un aspecto adicional de la invención es una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de un de expresión recombinante que

comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína aislada mezclada con un diluyente o vehículo adecuado.

Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden usarse para tratar o prevenir el cáncer. Además, las composiciones farmacéuticas pueden usarse para suscitar una respuesta inmunitaria en un sujeto
5 contra la nueva variante asociada con cáncer de GLUT8.

La composición farmacéutica puede prepararse y administrarse como se ha indicado anteriormente. La composición farmacéutica puede usarse en combinación con otros agentes terapéuticos anticancerosos como se ha indicado anteriormente.

La inmunogenicidad puede mejorarse significativamente si los agentes inmunizantes (es decir, la proteína aislada de
10 la invención, y/o las secuencias de ácido nucleico que la codifican y/o vectores de expresión recombinantes) y/o la composición, se co-inmuniza, independientemente del formato de administración, con un adyuvante. Normalmente los adyuvantes se usan en solución salina tamponada con fosfato como una solución del 0,05 al 1,0 por ciento. Los adyuvantes potencian la inmunogenicidad de un inmunógeno pero de por sí no son necesariamente inmunogénicos. Los adyuvantes pueden actuar conservando la inmunogenicidad localmente cerca del sitio de administración para
15 producir un efecto depósito que facilite una liberación lenta, prolongada, del inmunógeno a las células del sistema inmunitario. Los adyuvantes también pueden atraer a células del sistema inmunitario hacia un depósito inmunogénico y estimular dichas células para suscitar una respuesta inmunitaria. Como tal, las realizaciones de la presente invención incluyen composiciones farmacéuticas que adicionalmente comprenden adyuvantes.

Durante muchos años los adyuvantes se han utilizado para mejorar las respuestas inmunitarias de los huéspedes
20 contra, por ejemplo, vacunas. Normalmente, los adyuvantes intrínsecos (tales como lipopolisacáridos) son los componentes de bacterias destruidas o atenuadas usados como vacunas. Los adyuvantes extrínsecos son inmunomoduladores que están normalmente unidos de manera no covalente a antígenos y se formulan para potenciar las respuestas inmunitarias del huésped. Por tanto, se han identificado adyuvantes que potencian la respuesta inmunitaria contra antígenos administrados por vía parenteral. Sin embargo, algunos de estos adyuvantes
25 son tóxicos y pueden producir efectos no deseables lo que hace que no sean adecuados para su uso en seres humanos y en muchos animales. De hecho, sólo el hidróxido de aluminio y el fosfato de aluminio (denominados en su conjunto alumbre) se usan rutinariamente como adyuvantes en vacunas humanas y veterinarias. La eficacia del alumbre aumentando las respuestas de los anticuerpos contra toxoides diftéricos y tetánicos está bien establecida. No obstante, posee limitaciones. Por ejemplo, el alumbre es ineficaz para la vacuna gripal y suscita de manera
30 inconsecuente una respuesta inmunitaria mediada por células con otros inmunógenos. Los anticuerpos suscitados por antígenos que llevan alumbre como adyuvante son principalmente del isotipo IgG1 en ratón, que pueden no ser óptimos para la protección por algunos agentes de vacunas.

Una gran variedad de adyuvantes extrínsecos pueden provocar fuertes respuestas inmunitarias contra
35 inmunógenos. Estos incluyen saponinas formando complejos con antígenos de proteína de membrana (complejos inmunoestimuladores), polímeros plurónicos con aceite mineral, micobacterias destruidas y aceite mineral, adyuvante completo de Freund, productos bacterianos, tales como muramil dipéptido (MDP) y lipopolisacárido (LPS), así como lípido A y liposomas.

En un aspecto de la presente invención, los adyuvantes útiles en cualquiera de las realizaciones de la invención
40 descritas en el presente documento son los siguientes. Los adyuvantes para inmunización parenteral incluyen compuestos de aluminio (tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio e hidroxifosfato de aluminio). El antígeno puede precipitarse con, o adsorberse sobre, el compuesto de aluminio de acuerdo con protocolos convencionales. En administración parenteral también pueden usarse otros adyuvantes tales como RIBI (Immunochem, Hamilton, MT).

Los adyuvantes para inmunización mucosa incluyen toxinas bacterianas (por ejemplo, la toxina colérica (TC), la
45 toxina termolábil (TL) de *E. coli*, la toxina A de *Clostridium difficile* y la toxina tosferínica (TT), o combinaciones, subunidades, toxoides, o mutantes de los mismos. Por ejemplo, puede usarse una preparación purificada de la subunidad B de la toxina colérica nativa (TCB). También son adecuados fragmentos, homólogos, derivados y fusión a cualquiera de estas toxinas, siempre que conserven actividad adyuvante. Preferentemente, se usa un mutante que tenga toxicidad reducida. Se han descrito mutantes adecuados (por ejemplo, en los documentos WO 95/17211
50 (mutante TC Arg-7-Lys), WO 96/6627 (mutante TL Arg-192-Gly) y WO 95/34323 (mutante TT Arg-9-Lys y Glu-129-Gly)). Como mutantes TL adicionales que pueden usarse en los procedimientos y composiciones de la invención se incluyen, por ejemplo, mutantes Ser-63-Lys, Ala-69-Gly, Glu-110-Asp y Glu-112-Asp. También pueden usarse otros adyuvantes (tal como un monofosforil lípido A (MPLA) bacteriano de diversas fuentes (por ejemplo, *E. coli*, *Salmonella minnesota*, *Salmonella typhimurium* o *Shigella flexneri*, saponinas, o microesferas de polilactida glicolida
55 (PLGA)) en administración mucosa.

Como adyuvantes útiles para inmunización tanto mucosa como parenteral se incluyen polifosfaceno (por ejemplo
documento WO 95/2415), DC-col (3 b-(N-(N',N'-dimetil aminometano)-carbamoil) colesterol (por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.283.185 y documento WO 96/14831) y QS-21 (por ejemplo, documento WO 88/9336).

Como sabe un experto en la técnica, un sujeto puede inmunizarse con una composición farmacéutica que
60 comprenda la proteína aislada de la invención, una secuencia de ácido nucleico aislada que codifique la misma y/o

5 un vector de expresión recombinante mediante cualquier vía convencional. Esto puede incluir, por ejemplo, la inmunización a través de una superficie mucosa (por ejemplo, ocular, intranasal, oral, gástrica, pulmonar, intestinal, rectal, vaginal o tracto urinario), a través de la vía parenteral (por ejemplo subcutánea, intradérmica, intramuscular, intradérmica, intravenosa o intraperitoneal) o por vía intranodal. Las vías preferidas dependen de la elección del inmunógeno y serán obvias para un experto en la técnica. La administración puede realizarse en una sola dosis o a intervalos repetidos. La dosificación apropiada depende de diversos parámetros conocidos por los expertos en la técnica, tales como el propio inmunógeno (es decir el péptido frente al ácido nucleico (y más específicamente tipos de los mismos), la vía de administración y la afección del animal que vaya a vacunarse (peso, edad y similares).

10 La invención también proporciona kits que comprenden una cantidad eficaz de una composición farmacéutica de la invención, opcionalmente, en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos contra el cáncer, junto con instrucciones para el uso de los mismos.

(ii) Procedimientos terapéuticos

15 Como se ha mencionado anteriormente, la nueva variante asociada con cáncer de GLUT8 está presente en células cancerosas, pero no significativamente en células normales. Por tanto, la proteína aislada de la presente invención puede usarse en procedimientos terapéuticos para prevenir o tratar el cáncer. Además, para suscitar una respuesta inmunitaria en un sujeto, la proteína aislada de la presente invención puede usarse, por ejemplo, en una vacuna.

Una realización de la invención es el uso de la proteína aislada de la presente invención en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir el cáncer. Otra realización de la invención es el uso de la proteína aislada de la presente invención en la fabricación de un medicamento para suscitar respuesta inmunitaria en un sujeto.

20 La invención también incluye el uso de una secuencia de ácido nucleico aislado que codifica la proteína aislada de la presente invención en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir el cáncer. Además, la invención incluye el uso de una secuencia de ácido nucleico aislado que codifica la proteína aislada de la presente invención en la fabricación de un medicamento para suscitar una respuesta inmunitaria en un sujeto.

25 Una realización adicional de la invención es el uso del vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico aislado que codifica la proteína aislada de la presente invención en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir el cáncer. La invención también incluye el uso del vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico aislado que codifica la proteína aislada de la presente invención en la fabricación de un medicamento para su suscitar una respuesta inmunitaria en un sujeto.

30 Por consiguiente, el cáncer puede tratarse o prevenirse en un sujeto que padece, o que se sospecha que padece, cáncer administrando a dicho sujeto una cantidad eficaz de una variante asociada con cáncer de GLUT8 o fragmento de la misma. Además, el cáncer puede tratarse o prevenirse en el sujeto que padece, o que se sospecha que padece, cáncer administrando a dicho paciente una cantidad eficaz de la secuencia de ácido nucleico aislado que codifica la variante asociada con cáncer de GLUT8 o fragmento de la misma. Además, el cáncer puede tratarse o prevenirse en un sujeto que padece, o que se sospecha que padece, cáncer administrando a dicho sujeto una cantidad eficaz de un vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico aislado que codifica la variante asociada con cáncer de GLUT8 o fragmento de la misma.

35 En otra realización puede inducirse una respuesta inmunitaria en un sujeto contra una variante asociada con cáncer de GLUT8, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de una variante asociada con cáncer de GLUT8 o fragmento de la misma. Además, puede inducirse una respuesta inmunitaria en un sujeto contra la variante asociada con cáncer de GLUT8, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de una secuencia de ácido nucleico aislado que codifica la variante asociada con cáncer de GLUT8 o fragmento de la misma. Además, puede inducirse una respuesta inmunitaria en un sujeto contra la variante asociada con cáncer de GLUT8 que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad eficaz de un vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico aislado que codifica la variante asociada con cáncer de GLUT8 o fragmento de la misma.

(iii) Procedimientos de diagnóstico

40 La nueva variante asociada con cáncer de GLUT8 se expresa en células cancerosas y no se expresa significativamente en células normales, por tanto la detección de la nueva variante asociada con cáncer de GLUT8 puede usarse como un procedimiento de diagnóstico para el cáncer. La variante asociada con cáncer de GLUT8 puede comprender la secuencia de aminoácidos definida por una cualquiera de las SEC ID N°: 11, 12 o 13 o variantes de las mismas. La variante asociada con cáncer de GLUT8 puede comprender GLUT8 que tiene una modificación en el motivo di-leucina N-terminal. En una realización adicional de la invención, el motivo di-leucina N-terminal se ha modificado por di-alanina.

45 Una realización de la invención es un procedimiento para la detección o control del cáncer en un sujeto que padece, o que se sospecha que padece, cáncer que comprende detectar una variante asociada con cáncer de GLUT8 expresada en la superficie de células cancerosas que comprende: la secuencia de aminoácidos de las SEC ID N°:

11, 12 o 13, o sus variantes funcionales, en una célula en la muestra, en la que se indica cáncer, si la variante asociada con cáncer de GLUT8 se detecta en la célula.

Para detectar la variante asociada con cáncer de GLUT8 en la célula pueden usarse diversas técnicas. Por ejemplo, la proteínas de unión de la invención pueden usarse en inmunoensayos para detectar la expresión de superficie celular de la variante asociada con cáncer de GLUT8. Un experto en la técnica apreciará que para detectar y/o cuantificar la expresión en la superficie celular de la variante asociada con cáncer de GLUT8 pueden usarse diversas técnicas, incluyendo transferencia de Western, inmuno-precipitación seguida de SDS-PAGE, inmunohistoquímica, FACS, matrices de proteínas y similares.

La presente solicitud también describe un procedimiento para detectar o controlar el cáncer en un sujeto que padece, o que se sospecha que padece, cáncer que comprende detectar la expresión de una variante asociada con cáncer de GLUT8 en la célula en la muestra, en la se indica cáncer, si la expresión de la variante asociada con cáncer de GLUT8 se detecta en la célula. En un ejemplo preferido, para detectar la expresión de la variante asociada con cáncer de GLUT8 en la célula, se usa un producto de expresión de ARN que codifica la variante asociada con cáncer de GLUT8. Un experto en la técnica apreciará que el producto de expresión de ARN puede detectarse o cuantificarse detectando el ARNm que codifica la variante asociada con cáncer de GLUT8, o un fragmento de la misma, u oligonucleótidos, ADNc, ADN, ARN, productos de la PCR, ADN sintético, ARN sintético u otras combinaciones de nucleótidos de origen natural o modificados que se hibridan específica o selectivamente con el ARN que codifica la variante asociada con cáncer de GLUT8 o un fragmento de la misma.

Por consiguiente, otra realización de la invención es un procedimiento para detectar o controlar el cáncer en un sujeto que comprende las etapas de: detectar la cantidad de ARNm en una célula aislada del sujeto; y comparar la cantidad de ARNm con un control, en el que el ARNm codifica una variante asociada con cáncer del transportador de glucosa 8 expresada en la superficie de las células cancerosas que comprende: la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 11, 12 o 13 o variantes funcionales de las mismas.

Para detectar y/o cuantificar la expresión de ARN de la variante asociada con cáncer de GLUT8 en una célula pueden usarse diversos procedimientos que incluyen, RT-PCR, ensayos de protección con nucleasas, tales como ensayos de protección con ribonucleasa y ensayos con nucleasa S1 y transferencia de Northern y similares.

(H) Otros procedimientos

Se ha observado que el transportador de glucosa 8 tiene actividad transportadora de azúcar. Por tanto, la presente solicitud desvela un procedimiento de tratamiento o prevención de cáncer en un sujeto modulando la actividad de la variante asociada con cáncer del transportador de glucosa 8 sobre o en una célula cancerosa.

El procedimiento de tratamiento o prevención del cáncer en un sujeto puede comprender la prevención o disminución de la función de la variante asociada con cáncer del transportador de glucosa 8 como un transportador de azúcar. En una realización de la invención, puede usarse una proteína de unión de la invención para tratar o prevenir el cáncer en un sujeto previniendo o disminuyendo la función de la variante asociada con cáncer del transportador de glucosa 8 como un transportador de azúcar.

La presente solicitud también contempla el uso de un inhibidor de transportadores de glucosa que no es un anticuerpo para tratar o prevenir el cáncer en un sujeto.

Existen diversos inhibidores conocidos de la familia de moléculas de transportadores de glucosa que incluyen diversos miembros de la familia flavonoide. Por ejemplo, se sabe que la forscolina, la floretina (un compuesto de tipo flavonoide) y la citocalasina B que inhiben GLUT1 y en un modelo molecular tridimensional de GLUT-1 (Salas-Burgos y col., *Biophys.J.* 87: 2990-2999, 2004) se han identificado sus supuestos sitios de unión. Se ha observado que la quercetina, un flavonol, inhibe el transporte de glucosa mediado por GLUT2 (Song y col., *J.Biol.Chem.* 277: 15252-15260, 2002). El estradiol y el fitoestrógeno de isoflavona, la genisteína, son también inhibidores del transporte de glucosa mediado por GLUT1 y también se han propuesto supuestos sitios de unión para estas moléculas (Afzal y col., *Biochem J.* 365: 707-719, 2002). Los inhibidores del transportador de glucosa forscolina, dipiridamol e isobutilmetilxantiina (IBMX) se unen tanto a GLUT1 como a GLUT4 (Hellwig & Joost, *Mol. Pharmacol.* 40: 383-389, 1991). La citocalasina B también se une a GLUT4 (Wandel y col., *Biochim. Biophys. Acta* 1284: 56-62, 1996).

Además de estos inhibidores conocidos, un experto en la técnica apreciará que existen diversos ensayos conocidos para identificar inhibidores de transportadores de glucosa. Por ejemplo, el efecto de inhibidores sobre un transportador de glucosa puede evaluarse expresando el GLUT de interés, preferentemente transportador de glucosa 8, en células tales como ovocitos de *Xenopus laevis* o CHO, midiendo la captación de glucosa en presencia o en ausencia del inhibidor y determinando si el inhibidor es competitivo o no competitivo. Una vez que se conoce la secuencia de una isoforma de GLUT proporcionada, su sensibilidad contra una gran cantidad de moléculas puede ensayarse fácilmente identificando candidatos farmacológicos.

Por consiguiente la presente solicitud también describe un procedimiento de tratamiento o prevención del cáncer en un sujeto administrando, a un sujeto que lo necesite, una cantidad eficaz de un inhibidor del transportador de

glucosa. Los inhibidores incluyen miembros de la familia Flavonoide, tal como quercetina o genisteína, moléculas similares a Flavonoides, tales como floretina, compuestos estrogénicos, incluyendo estradiol o genisteína, forscolina, citocalasina B, dipiridamol y/o isobutilmetilxantina (IBMX).

5 La presente solicitud también describe un procedimiento en el que la función de la variante asociada con cáncer del transportador de glucosa 8 se previene o disminuye disminuyendo o previniendo la expresión de la variante asociada con cáncer del transportador de glucosa 8 en la célula.

10 Para prevenir o disminuir la expresión de la variante asociada con cáncer del transportador de glucosa 8 en una célula pueden usarse técnicas convencionales que incluyen el uso de moléculas antisentido, triple hélice, o ribozimas reactivas contra los transcritos de las variantes asociadas con cáncer del gen del transportador de glucosa 8.

15 Por ejemplo, para la producción de moléculas de ácido nucleico antisentido, es decir, moléculas que son complementarias con un ácido nucleico en sentido que codifica un polipéptido de interés, por ejemplo, complementarias con la cadena codificante de una molécula de ADNc bicatenaria o complementarias con una secuencia de ARNm, pueden utilizarse técnicas convencionales. Por consiguiente, un ácido nucleico antisentido puede unirse mediante enlaces de hidrógeno con un ácido nucleico en sentido. El ácido nucleico antisentido puede ser complementario con una cadena codificante completa, o solo con una parte de la misma, por ejemplo, toda o parte de la región codificante de la proteína (o fase de lectura abierta). Una molécula de ácido nucleico antisentido puede ser antisentido en toda o parte de una región no codificante de la cadena codificante de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de interés. Las regiones no codificantes ("regiones 5' y 3' no traducidas") son las secuencias 5' y 3' que flanquean la región codificante y no se traducen en aminoácidos.

20 Un oligonucleótido antisentido puede tener, por ejemplo, una longitud de aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 nucleótidos o más. Un ácido nucleico antisentido de la invención puede construirse usando síntesis química y reacciones de ligamiento enzimáticas usando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, un ácido nucleico antisentido (por ejemplo, un oligonucleótido antisentido) puede sintetizarse químicamente usando nucleótidos de origen natural o nucleótidos modificados de modos diversos diseñados para aumentar la estabilidad biológica de las moléculas o para aumentar la estabilidad física del dúplex formado entre los ácidos nucleicos sentido y antisentido, por ejemplo, pueden usarse derivados de fosforotionato y nucleótidos sustituidos con acridina. Como ejemplos de nucleótidos modificados que pueden usarse para generar el ácido nucleico antisentido se incluyen 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroxilmetil) uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-mannosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, metiléster de ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo, (acp3)w y 2,6-diaminopurina. Como alternativa, el ácido nucleico antisentido puede producirse biológicamente usando un vector de expresión en el que un ácido nucleico se ha subclonado en una orientación antisentido (es decir, ARN transcrito a partir del ácido nucleico insertado será de una orientación antisentido con respecto a un ácido nucleico diana de interés).

40 Las moléculas de ácido nucleico antisentido se administran a un sujeto o se generan *in situ* de tal manera que se hibridan con o se unen a ARNm celular que codifica el polipéptido de interés para inhibir de este modo la expresión, por ejemplo, inhibiendo la transcripción y/o traducción. La hibridación puede ser por complementariedad convencional del nucleótido para formar un dúplex estable, o, por ejemplo, en el caso de una molécula de ácido nucleico antisentido que se une a dúplex de ADN, a través de interacciones específicas en el surco principal de la hélice doble. Como un ejemplo de una vía de administración de moléculas de ácido nucleico antisentido de la invención se incluye la inyección directa en un lugar del tejido. Como alternativa, las moléculas de ácido nucleico antisentido pueden modificarse para dirigir células seleccionadas y después administrarse por vía sistémica. Por ejemplo, para la administración sistémica, las moléculas antisentido pueden modificarse de tal manera que se unan específicamente a receptores o a antígenos expresados en una célula seleccionada, por ejemplo, un linfocito T o una célula cerebral, por ejemplo, ligando las moléculas de ácido nucleico antisentido con péptidos o anticuerpos que se unen a receptores o a antígenos de la superficie celular. Las moléculas de ácido nucleico antisentido también pueden administrarse a células usando vectores, por ejemplo, vectores de terapia génica, descritos más adelante. Para conseguir concentraciones intracelulares suficientes de las moléculas antisentido, se prefieren construcciones de vectores en las que la molécula de ácido nucleico antisentido se coloca bajo el control de un promotor pol II o pol III fuerte.

50 Una molécula de ácido nucleico antisentido de interés puede ser una molécula de ácido nucleico α -anomérico. Una molécula de ácido nucleico α -anomérico forma híbridos bicatenarios específicos con ARN complementario en el que, contrario a las α -unidades normales, las cadenas corren paralelas entre sí (Gaultier y col., 1987, Nucleic Acids Res. 15: 6625-6641). La molécula de ácido nucleico antisentido también puede comprender un 2'-o-metilribonucleótido (Inoue y col., 1987, Nucleic Acids Res. 15: 6131-6148) o un análogo de ARN-ADN quimérico (Inoue y col., 1987, FEBS Lett. 215: 327-330).

Las ribozimas son moléculas de ARN catalíticas con actividad ribonucleasa que pueden escindir un ácido nucleico monocatenario, tal como un ARNm, con el cual tienen una región complementaria, y también pueden generarse usando técnicas convencionales. Por tanto, las ribozimas (por ejemplo, ribozimas de cabeza de martillo (descritas en Haselhoff and Gerlach, 1988, Nature 334: 585-591)) pueden usarse para escindir catalíticamente transcritos de ARNm para así inhibir la traducción de la proteína codificada por el ARNm. Puede diseñarse una ribozima que tenga especificidad por una molécula de ácido nucleico que codifique un polipéptido de interés basándose en la secuencia de nucleótidos de un ADNc que codifique una variante asociada con cáncer de GLUT8. Por ejemplo, puede construirse un derivado de un ARN de *Tetrahymena* L-19 IVS en el que la secuencia de nucleótidos del sitio activo sea complementaria a la secuencia de nucleótidos que va a escindirse, en un Cech y col. Patente de Estados Unidos N° 4.987.071; y Cech y col. Patente de Estados Unidos N° 5.116.742. Como alternativa, para seleccionar un ARN catalítico que tenga actividad ribonucleasa específica, puede usarse un ARNm que codifique un polipéptido de interés a partir de un conjunto de moléculas de ARN. Véase, por ejemplo Bartel and Szostak, 1993, Science 261: 1411-1418.

Usando técnicas bien conocidas también puede generarse estructuras de triple hélice. Por ejemplo, la expresión de un polipéptido de interés puede inhibirse dirigiendo secuencias de nucleótidos complementarias a la región reguladora del gen que codifica el polipéptido (por ejemplo, el promotor y/o potenciador) para formar estructuras triple helicoidales que impidan la transcripción del gen en células diana. Véase en líneas generales Helene, 1991, Anticancer Drug Des. 6(6): 569-84; Helene, 1992, Ann. N.Y. Acad. Sci. 660: 27-36; y Maher, 1992, Bioassays 14(12): 807-15.

En diversas realizaciones, en la estructura del resto base, resto azúcar o fosfato, pueden modificarse composiciones de ácido nucleico para mejorar, por ejemplo, la estabilidad, hibridación o solubilidad de la molécula. Por ejemplo, la estructura desoxirribosa fosfato de los ácidos nucleicos puede modificarse para generar ácidos nucleicos peptídicos (véase Hyrup y col., 1996, Bioorganic & Medicinal Chemistry 4(1): 5-23). Como se usa en el presente documento, las expresiones "ácidos nucleicos peptídicos" o "ANP" se refieren a miméticos de ácido nucleico, por ejemplo, miméticos de ADN, en los que la estructura desoxirribosa fosfato se sustituye por una estructura seudopeptídica y solamente se conservan las cuatro nucleobases naturales. Se ha observado que la estructura neutra de los ANP permite hibridación específica con ADN y ARN en condiciones de fuerza iónica baja. La síntesis de oligómeros de ANP puede realizarse usando protocolos convencionales de síntesis peptídica en fase sólida como se describe en Hyrup y col., 1996, citado anteriormente; Perry-O'Keefe y col., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 14670-675.

Los ANP pueden, por ejemplo, modificarse, para potenciar su estabilidad o captación celular, uniendo al ANP grupos lipófilos u otros grupos auxiliares mediante la formación de quimeras de ANP-ADN; o mediante el uso de liposomas u otras técnicas de administración de fármacos conocidas en la técnica. Por ejemplo, pueden generarse quimeras de ANP-ADN que pueden combinar las propiedades ventajosas del ANP y del ADN. Dichas quimeras permiten que enzimas de reconocimiento de ADN, por ejemplo, RNAsa H y ADN polimerasa, interaccionen con la parte ADN mientras que la parte ANP proporcionaría elevada afinidad de unión y especificidad. Las quimeras de ANP-ADN pueden engarzarse usando engarces de longitudes apropiadas seleccionadas según el apilamiento de bases, número de enlaces entre las nucleobases y orientación (Hyrup, 1996, citado anteriormente). La síntesis de quimeras de ANP-ADN puede realizarse como se describe en Hyrup, 1996, citado anteriormente, y en Finn y col., 1996, Nucleic Acids Res. 24(17): 3357-63. Por ejemplo, puede sintetizarse una cadena de ADN sobre un soporte usando química de acoplamiento con fosforamidita convencional y análogos de nucleósidos modificados. Pueden usarse compuestos tales como 5'-(4-metoxitritil)amino-5'-desoxi-timidina fosforamidita como un engarce entre el ANP y el extremo 5' del ADN (Mag y col., 1989, Nucleic Acids Res. 17: 5973-88). Después, los monómeros de ANP se acoplan de manera gradual para producir una molécula quimérica con un segmento de ANP en posición 5' y un segmento de ADN en posición 3' (Finn y col., 1996, Nucleic Acids Res. 24(17): 3357-63). Como alternativa, pueden sintetizarse moléculas quiméricas con un segmento de ADN en posición 5' y un segmento de ANP en posición 3' (Peterser y col., 1975, Bioorganic Med. Chem. Lett. 5: 1119-11124).

En otras realizaciones, el oligonucleótido puede incluir otros grupos anexados, tales como péptidos (por ejemplo, para dirigir receptores de células huésped *in vivo*) o agentes que facilitan el transporte a través de la membrana celular (véase, por ejemplo, Letsinger y col., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6553-6556; Lemaitre y col., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 648-652; Publicación Internacional N° WO 88/09810) o de la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, la Publicación Internacional N° WO 89/10134). Además, los oligonucleótidos pueden modificarse con agentes de escisión activados por hibridación (véase, por ejemplo, Krol y col., 1988, Bio/Techniques 6: 958-976) o agentes intercalantes (véase, por ejemplo, Zon, 1988, Pharm. Res. 5: 539-549). Para esta finalidad, el oligonucleótido puede conjugarse con otra molécula, por ejemplo, un péptido, un agente reticulante activado por hibridación, un agente transportador, un agente de escisión activado por hibridación, etc.

Otro aspecto de la invención es un procedimiento para identificar compuestos que sean capaces de modular la expresión o la actividad de la variante asociada con cáncer del transportador de glucosa 8, que puede usarse para prevenir o tratar el cáncer. El procedimiento es un procedimiento para identificar la capacidad de un compuesto para prevenir o tratar el cáncer que comprende las etapas:

(a) poner en contacto una célula que exprese una variante asociada con cáncer del transportador de glucosa 8 expresada en la superficie de las células cancerosas que comprende: la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 11, 12 o 13 o variantes funcionales de las mismas, con un compuesto de ensayo; y

5 (b) determinar la expresión o la función de la variante asociada con cáncer del transportador de glucosa 8 que comprende: la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 11, 12 o 13 o variantes funcionales de las mismas, como un transportador de glucosa;

10 (c) comparar la expresión o la función de la variante asociada con cáncer del transportador de glucosa 8 que comprende: la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 11, 12 o 13 o variantes funcionales de las mismas, con un control, en el que una disminución en la expresión o función de la variante asociada con cáncer del transportador de glucosa 8 que comprende: la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 11, 12 o 13 o variantes funcionales de las mismas, en comparación con el control, es indicativa de un compuesto útil para prevenir o tratar el cáncer.

Los siguientes ejemplos no limitantes son ilustrativos de la presente invención.

Ejemplos

15 **Ejemplo 1: Generación del anticuerpo monoclonal VB1-050**

El anticuerpo monoclonal VB1-050 se generó a partir de linfocitos agrupados de muestras de pacientes con cáncer. Como compañero de fusión para generar el anticuerpo monoclonal se usó SHFP-1. El anticuerpo VB1-050 es un anticuerpo monoclonal kappa, IgG1.

Ejemplo 2: Secuenciación

20 Se aisló ARN mensajero (ARNm) de células de hibridoma y se sintetizó la primera cadena de ADN complementario (ADNc). Después, el ADNc se usó para aislar los genes de la cadena H y L del anticuerpo por PCR. Se diseñaron cebadores PCR (véase observación) de acuerdo con regiones marco conservadas consenso de los isotipos de cadena H (gamma) y L (kappa). Los productos de la PCR se clonaron individualmente en el vector TOPO-pCR 2.1 y se transformaron en células de *E. coli*. Los clones individuales que contenían los insertos en TOPO-pCR 2.1 se
25 aislaron y se cultivaron. El ADN plasmídico se purificó y secuenció.

Cebadores gamma:

1) 5' TCT AAA GAA GCC CCT GGG AGC ACA GCT CAT CAC CAT G 3' (SEC ID N°: 21)

2) 5' GCC CGG GGA GCG GGG GCT TGC CGG CCG TCG CAC TCA 3' (SEC ID N°: 22)

3) 5' ACC ATG AGT GAG AAA AAC TGG ATT TGT GTG GCA 3' (SEC ID N°: 23)

30 4) 5' GGA GCC GGT GAC CAG GGT TCC CTG GCC CCA 3' (SEC ID N°: 24)

5) 5' CTC ACC ATG GAG TTT GGG CTG AGC TGG GTT 3' (SEC ID N°: 25)

6) 5' GGA GGC TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT TCC CTG GCC 3' (SEC ID N°: 26)

Cebadores kappa:

7) 5' GGC TCG AGA TGG ACA TGR RRD YCC HVG YKC ASC TT 3' (SEC ID N°: 27)

35 8) 5' CCC GTC GAC CAT CAG ATG GCG GGA AGA T 3' (SEC ID N°: 28)

Observación: para aislar tantas variedades como sea posible usando un solo cebador, se usaron bases mixtas para determinados cebadores consenso: R = A + G, D = A + T + G, Y = C + T, H = A + C + T, V = A + C + G, K = T + G, S = C + G, W = A + T.

Cada reacción PCR comprendía los siguientes componentes en un volumen de reacción de 50 µl.

40 5 µl de tampón PCR 10x

5 µl de los dNTP 2 mM

2 µl de MgCl₂ 50 mM

Cebador 5' 20 pmol

Cebador 3' 20 pmol

Taq ADN Polimerasa 2,5 U

Molde de ADN 50 ng

Las condiciones de los ciclos de la PCR fueron: 95 °C durante 1 minuto; 62 °C durante 1 minuto; 72 °C durante 1,5 minutos, durante 30 ciclos y una extensión final durante 10 minutos a 72 °C. Los productos de la PCR amplificados se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1 %, se escindieron, se purificaron usando un kit de extracción con gel Qiaquick, se clonaron en el vector de clonación TOPO pCR 2.1 y después el ADN se secuenció usando el tramo secuenciador 373 de ADN (Griffin G.H. and Griffin M.A.: PCR technology, Current innovations. CRC Press, Boca. Raton. Florida3431.USA; Cloning vector pCR 2.1, Catálogo n° 205184. Invitrogen, Carlsbad, CA; Qiagen, Qiaquick gel extraction kit, Catálogo N° 28706. Qiagen Inc., Mississauga, ON; and 373 DNA Stretch. PE Applied Biosystems, Mississauga ON.).

Las secuencias CDR del VB1-050 se muestran en la Tabla 1.

En las Figuras 1 y 2 se muestran, respectivamente, la región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada.

Ejemplo 3: Perfilado del anticuerpo midiendo la reactividad de células tumorales y normales

El anticuerpo VB1-050 se ensayó por citometría de flujo con respecto a la reactividad de células tumorales y normales. Se exploró un solo panel de líneas celulares tumorales que representaba quince tipos diferentes de cánceres epiteliales. En la Tabla 2 se resumen los resultados del VB1-050. Aunque el VB1-050 tuvo un valor de FM > 2,0 en todas las indicaciones, la reactividad más fuerte se observó, pero sin limitación, en líneas celulares de mama, melanoma y ovario. En comparación, la reactividad con líneas celulares tisulares normales fue generalmente menor que la observada con las líneas celulares de cáncer. En el caso de las líneas celulares de mama y próstata la expresión de VB1-050 por término medio fue >9 veces en las líneas celulares cancerosas. Las dos excepciones fueron las líneas celulares de riñón y pulmón; sin embargo, fueron aún inferiores que las del tipo de células tumorales correspondientes. Los valores de FM indican la media calculada a partir de la suma del factor de aumento medio en la fluorescencia media sobre el anticuerpo control de todas las líneas celulares en cada indicación. Un valor de cero indica reactividad no medible con respecto al anticuerpo control.

Ejemplo 4: Micromatriz de tejido normal

En primer lugar el VB1-050 se ensayó frente a la línea celular tumoral SKBR-3 de flujo positivo para evaluar el formato tisular apropiado para demostrar la tinción de membrana y definir las condiciones óptimas para la tinción. El VB1-050 demostró fuerte tinción nuclear y/o de membrana nuclear en todos los grupos experimentales. Cabe destacar que, los portaobjetos cytospin mostraron tinción con puntos en la membrana celular, aproximadamente en el 30 % de las células intactas. En secciones congeladas de membrana celular similar se detectó tinción (10 % de células) además de tinción nuclear/membrana nuclear (60 % de células) así como tinción en el citoplasma (10 % de células). En sedimentos celulares fijos, este anticuerpo tiñó el núcleo y la membrana nuclear (70 % de células), y el citoplasma (10 % de células), pero muy pocas veces tiñó la membrana celular (3-5 % de células). Dado que la fijación no afectó al antígeno (según se pone de manifiesto por la tinción de células fijadas sobre los portaobjetos cytospin) la aparente pérdida de la tinción de la membrana celular en el sedimento celular fijo puede deberse a que las células tienen un área superficial de membrana menor en comparación con el de las células congeladas. El área de membrana más grande visible en células congeladas es una consecuencia de la contracción del citoplasma, así como, por naturaleza, de una sección más fina usando células congeladas. Como alternativa, el procesamiento después de la fijación (inclusión, etc.) puede haber alterado el antígeno de superficie.

Una vez identificadas las condiciones de tinción óptimas, el anticuerpo se ensayó en comparación con un control isotipo (4B5) en una matriz de baja densidad (BD) de tejido normal crítico fijado en formalina para reactividad tisular normal. En la Tabla 3 se resumen estos resultados del VB1-050. No se observó tinción de membrana significativa de ninguno de los tejidos críticos normales. Se detectó intensa tinción del núcleo y/o de la membrana nuclear en muchos de los tejidos. De manera similar, de acuerdo con la tinción de membrana celular, no se observó con ninguno de los tejidos normales no críticos, excepto en testículos, que mostró tinción de membrana del 30 % para 1/5 ensayado (Tabla 4).

Ejemplo 5: Micromatriz de tejido tumoral

A diferencia de la exploración de tejido normal crítico y no crítico, la reactividad de la membrana celular se observó en algunos pero no en todos los tejidos tumorales. VB1-050 se detectó más frecuentemente en cánceres de colon, próstata, estómago, ovario e hígado. La tinción más intensa (2+) se detectó más homogéneamente en los carcinomas gástricos. Generalmente, el porcentaje de células con tinción de membrana varió con la indicación y las muestras tisulares dentro de cada indicación, sin embargo, los carcinomas de colon no mostraron el porcentaje más elevado de células que se teñían. Véase la Tabla 5. En muestras de ensayo tisulares de cánceres de pulmón, recto, piel y uterino no se detectó tinción.

Ejemplo 6: Evaluación de la unión e internalización del VB1-050 por citometría de flujo y microscopía confocal

El anticuerpo VB1-050 y dos anticuerpos de control (5E9 y MA-103) que demuestran fuerte reactividad contra la línea celular tumoral A-375 se usaron para evaluar la internalización del VB1-050. En la Tabla 6 se muestra un experimento representativo. Los resultados de unión del VB1-050 a diferentes temperaturas no fueron diferentes de los del anticuerpo de internalización 5E9. Después de 60 minutos a 37 °C, el VB1-050 unido a la membrana desapareció de la superficie celular, con una reducción del 61,8 % en la fluorescencia media. Aumentando el tiempo de incubación a 37 °C se asoció con una disminución adicional en la fluorescencia media, pero a una velocidad más reducida. A los 120 minutos, la fluorescencia media había disminuido al 69,6 %. En la Figura 3 se ilustran los histogramas de flujo que demuestran la unión a la superficie celular.

Para confirmar si el VB1-050 unido a la superficie celular se internalizaba en células A-375 o se desprendía de la membrana plasmática, células tratadas con anticuerpo se evaluaron adicionalmente por visualización directa de distribución de fluorescencia y tinción intracelular usando microscopía confocal de exploración con láser. De manera similar a MA-103 y 5E9, la incubación de VB1-050 con células A-375 a 4 °C durante 60 minutos demostró una distribución superficial circunferencial del marcador de fluorescencia (Figura 4A). El calentamiento a 37 °C del anticuerpo VB1-050 unido a las células puso de manifiesto una fuerte tinción intracelular por el anticuerpo internalizado a los 60 minutos, como se muestra en la Figura 4B.

Ejemplo 7: Estado de la afinidad de unión

El factor más importante que influye sobre la formación de complejos anticuerpo-antígeno es la afinidad del anticuerpo por su antígeno. Esta afinidad de unión es una propiedad constante de estos reactivos y se expresa como una constante de equilibrio (K) que se mide como una proporción de asociación/disociación o KA/KD. Para un anticuerpo determinado, la diferencia en afinidades observada se refiere más a la disociación (KD) en lugar de a la asociación (KA), por tanto KD se seleccionó como una medida de afinidad de VB1-050.

Se usó una estrategia de citometría de flujo para determinar la afinidad del anticuerpo [Benedict, CA y col. (1997) "Determination of the binding affinity of an anti-CD34 single-chain antibody using a novel, flow cytometry based assay", J. Immunol. Methods 2001, 223-31]. Resumiendo, se incubaron células A-375 con una serie de concentraciones de VB1-050 durante una cantidad de tiempo suficiente para conseguir el equilibrio. Después, las células se lavaron y se trataron con anticuerpo secundario anti-IgG humana conjugado con biotina. Las células tumorales se analizaron después mediante citometría de flujo para detectar el anticuerpo unido a las células. La inversa de la fluorescencia media determinada se representó gráficamente en función de la inversa de la concentración de anticuerpo para determinar la KD por el procedimiento de Lineweaver-Burk [Lineweaver, H. y col. (1934) "The determination of enzyme dissociation constants" J. Am. Chem. Soc. 56, 658].

Se determinó que el valor de la KD de la interacción entre VB1-050 y A-375 era de $4,90 \times 10^{-8}$ M.

Ejemplo 8: Modificación por ingeniería genética y ensayo de una inmunotoxina de-Bouganina**1) Modificación genética de VB6-050**

El inserto PeIB-V_H-PvuII, obtenido de la digestión del plásmido PeIB-V_{H845}-C_H-F-de-bouganina/pSV73 con *EcoRI* y *PvuII*, se ligó en el vector PeIB(-S)-V_{H050}-C_H-F-de-bouganina/psV73 previamente digerido con las mismas enzimas (previamente modificado por ingeniería genética para la expresión por inclusión que contenía la secuencia líder PeIB sin la secuencia peptídica de señal, PeIB(-S)). Se transformaron células competentes 10F con la reacción de ligamiento y se seleccionaron en placas con ampicilina. La exploración de colonias mapeando sitios de restricción determinó qué clones contenían el inserto PeIB-V_{H050}-C_H-F-de-bouganina.

El fragmento PeIB(-S)-V_{L050}-C_L se digirió con *EcoRV* y *XhoI* y se ligó en el vector *SpeI*-de-bouganin-PeIB-V_{L845C}-C_L/pSV73 previamente digerido con las mismas enzimas. Después, células competentes 10F se transformaron con la reacción de ligamiento y se sembraron en placas de agar-LB complementadas con ampicilina. La exploración de colonias mapeando sitios de restricción determinó qué clones contenían el inserto *SpeI*-de-bouganin-PeIB-V_{L050}-C_L. Después, el inserto *SpeI*-de-bouganin-PeIB-V_{L050}-C_L se clonó en el plásmido pING3302 usando las enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI*. El fragmento PeIB-V_{H050}-C_H-F-de-bouganina se digirió con *EcoRI* y *SpeI* y se ligó con el vector *SpeI*-de-bouganin-PeIB-V_{L050}-C_L/3302 previamente digerido con las mismas enzimas creando el inserto VB6-050. El plásmido que contenía el inserto VB6-050 se aisló después y se usó para transformar células E104.

2) Estudios de expresión a pequeña escala

Las células E104 transformadas que contenían VB6-050 se propagaron en 30 ml de medio TB (inóculo al 1 %) en un matraz agitador de 250 ml a 37 °C y se agitó a 225 rpm durante aproximadamente 5 horas hasta que la densidad óptica (D.O. 600 nm) alcanzó un valor de 2. En este momento, el cultivo se indujo con una concentración final de L-(+) arabinosa al 0,1 % y se incubó a 25 °C durante 16 horas. Posteriormente, el sobrenadante se recogió por centrifugación a 14.000 rpm durante 5 minutos y se analizó mediante transferencia de Western usando un

anticuerpo humano anti cadena ligera kappa o anti-lambda en condiciones no reductoras para confirmar la presencia y el tamaño de la inmunotoxina.

3) Generación de un banco de células maestro

5 Para generar el BCM, se usó una sola colonia de una placa de LB-agar que contenía 25 µg/ml de tetraciclina para inocular 5 ml de 2xYT más 25 µg/ml de tetraciclina y se incubó a 37 °C con agitación constante. Cuando la DO₆₀₀ alcanzó - 2, se inocularon 50 ml de medio YT 2X que contenía 25 µg/ml de tetraciclina en un matraz agitador de 250 ml con 1,25 ml del cultivo de semillas y se incubó a 37 °C. Cuando la DO₆₀₀ alcanzó un valor de 1 a 1,5, se mezclaron 25 ml de glicerol al 30 % en el cultivo. Se dispusieron partes alícuotas de 1,5 ml en criotubos y se conservaron a -80°C. Se ensayaron tres viales independientes para la expresión como se ha descrito anteriormente.

10 4) Fermentación y purificación

La fermentación semidiscontinua de VB6-050 se realizó en un fermentador CHEMAP de 15l usando medio TB. A una DO₆₀₀ de 20 (semilogaritmo), el cultivo se indujo con una mezcla de nutriente (glicerol al 50 %) e inductor (L-arabinosa 200 g). Treinta horas después de la inducción, el cultivo se recogió y se centrifugó a 8000 rpm durante 30 minutos, después se purificó usando columnas de CM-sepharose y quelante-sepharose seguido de una columna de exclusión por tamaño. Resumiendo, el sobrenadante se concentró y se diafiltró frente a fosfato sódico 20 mM un pH de 6,9 ± 0,1. El sobrenadante concentrado diafiltrado se aplicó después sobre una columna de CM-sepharose equilibrada con fosfato de sodio 20 mM, NaCl 25 mM a un pH de 6,9 ± 0,1. La columna se lavó con fosfato sódico 20 mM, NaCl 25 mM, a un pH de 6,9 ± 0,1. La proteína de fusión VB6 Fab-de-bouganina unida se eluyó posteriormente con fosfato sódico 20 mM, NaCl 150 mM a un pH de 7,5 ± 0,1. El eluato de CM-sepharose se ajustó a una concentración final de triton-X100 al 0,25 % y se aplicó a una columna de sepharose-quelante cargada. La columna de sepharose-quelante se lavó después con 3 tampones de lavado diferentes comenzando con fosfato sódico 20 mM, NaCl 150 mM, triton-X100 al 0,25 % a un pH de 7,5 ± 0,1, seguido de fosfato sódico 20 mM, NaCl 150 mM a un pH de 7,5 ± 0,1 y seguido de fosfato sódico 20 mM, NaCl 150 mM, imidazol 10 mM a un pH de 7,5 ± 0,1. La proteína de fusión VB6 Fab-de-bouganina unida se eluyó con fosfato sódico 20 mM, NaCl 150 mM, imidazol 250 mM a un pH de 7,5 ± 0,1 y se reunió en fracciones de 2 ml. Se determinó la absorbancia a A₂₈₀ nm de cada fracción y las fracciones con material se agruparon y se aplicaron sobre una columna de exclusión de tamaño S200 para obtener una pureza de ~ 80 %. Las muestras en cada etapa del proceso se analizaron mediante transferencia de Western usando el anticuerpo anti-kappa. La pureza después de la columna de exclusión de tamaño se confirmó por tinción con azul coloidal.

30 5) Actividad biológica de VB6-050

Se cultivaron las líneas celulares de A-375 melanoma humano, Daudi de linfocitos T humanos, SK-OV-3 de ovario humano, Panc-1 pancreática humana, SKBR-3 y MB-435S de mama humana y Colo-320 de colon humano en sus respectivos medios según protocolos de la ATCC. Las células se recogieron a una confluencia del 30 al 40 % con una viabilidad mayor del 90 %.

35 a) Actividad de unión

Para demostrar que el VB6-050 conservaba especificidad de unión se usó citometría de flujo usando la línea celular positiva a antígenos SKBR-3, A-375 y SK-OV-3 y una línea celular negativa a antígenos Panc-1, Colo-320 y Daudi, respectivamente. La unión se detectó usando un anticuerpo anti-de-bouganina. Resumiendo, las construcciones a ensayar se incubaron con 0,45x10⁶ células tumorales durante 1,5 horas en hielo. Después del lavado, la reactividad unida a la superficie celular se detectó con anti-de-bouganina de conejo (1/100) durante una hora en hielo. Las células se lavaron y se incubaron con anti-IgG de conejo conjugado con FITC durante 30 minutos en hielo. Posteriormente, las células se lavaron, se resuspendieron en PBS con FCS al 5 % que contenía yoduro de propidio para evaluar la unión de Fab por citometría de flujo.

b) Ensayo de competencia

45 Se generó una curva de saturación incubando células positivas a antígeno con una concentración en aumento de VB6-050 que variaba de 10 a 750 µg/ml. La Fab-de-bouganina unida se detectó por citometría de flujo como se ha descrito anteriormente. La concentración de Fab-de-bouganina correspondiente al punto de saturación se incubó después con células positivas a antígeno en presencia de concentraciones en aumento de anticuerpo IgG parental. La reducción de la unión de Fab-de-bouganina unida se midió por citometría de flujo. Como control negativo se usó IgG 4B5.

50 c) Ensayo de citotoxicidad

La citotoxicidad de VB6-050 se midió mediante un ensayo con MTS. Brevemente, células positivas a antígeno y negativas a antígeno se sembraron a 1000 células por pocillo y se incubaron a 37 °C durante 3 horas. Posteriormente, se añadieron diversas concentraciones de VB6-050 y de de-bouganina a las células y después de 5 días, se determinó la viabilidad celular.

Resultados

1) Modificación genética y expresión a pequeña escala de VB6-050 en el vector de expresión pING3302

Como un primer intento para producir la proteína Fab-de-bouganina, el vector se modificó por ingeniería genética como dos construcciones individuales, la parte Fd fusionada a la de-bouganina y la cadena ligera. La expresión de cada cadena se dirigió al interior de cuerpos de inclusión por delección de la señal peptídica en la secuencia líder PelB, PelB (-S). Sin embargo, la ausencia de expresión de la proteína Fd-de-bouganina en los cuerpos de inclusión y el éxito de la expresión de VB6-845 soluble racionalizó la re-modificación genética de la construcción Fab-de-bouganina VB6-050 soluble. Para minimizar el tiempo de remodelación genética y basándose en la viabilidad, se usaron enzimas de restricción para unir los fragmentos Fd-F-de-bouganina y V_L-C_L de la secuencia líder PelB con una señal peptídica.

El análisis de Fd y de la cadena ligera de 050 mostró que los sitios de restricción *EcoRI* y *PvuII* y *EcoRV* y *XhoI* localizados en la cadena pesada y ligera, respectivamente, permitieron la re-modificación genética de VB6-050 sin reacción PCR usando las construcciones intermedias de VB6-845. Para esta finalidad, se obtuvo el inserto PelB con el péptido líder de PelB-V_{H845}-C_H-F-de-bouganina usando los sitios de restricción *EcoRI* y *PvuII* y se ligó en el PelB(-S)-V_{H050}-C_H-F-de-bouganina previamente digerido con las mismas enzimas (Figura 5A). De manera similar, el plásmido PelB (-S)-V_{L050}-C_L/pSV73 se digirió con *EcoRV* y *XhoI* y el inserto se clonó en el vector Spel-de-bouganin-PelB-V_{L845}-C_L previamente digerido con *EcoRV* y *XhoI*. El inserto, PelB-V_{L050}-C_L, se insertó posteriormente en el plásmido 3302 usando los sitios de restricción *EcoRI* y *XhoI* (Figura 5B). El fragmento PelB-V_{H050}-C_H-F-de-bouganina se ligó después mediante las enzimas de restricción *EcoRI*-*Spel* generando el inserto VB6-050 en el plásmido de ADN 3302 que se transformó en las células E104 (Figuras 5C y 5D).

El análisis de transferencia de Western en condiciones no reductoras de VB6-050 mostró que las proteínas de longitud completa se detectaban con el anticuerpo anti-cadena ligera kappa (Figura 6). Además, el nivel de expresión de VB6-050 es similar al del VB6-845 usado como referencia. La transferencia de Western del sobrenadante de cultivo E104 no inducido reveló que no había bandas correspondientes lo que sugería que estas proteínas se detectan específicamente con el anticuerpo correspondiente (Figura 6, carril 4). Además, con cada clon también, se obtuvo un perfil similar de productos degradados observados en VB6-845.

2) Purificación de VB6-050

VB6-050 se purificó en un fermentador de 15 litros. Se analizaron partes alícuotas de cada una de las etapas del proceso de purificación con transferencia de Western para evaluar la tasa de recuperación de cada columna (Figura 7A). La inmunotransferencia se incubó con un anticuerpo anti-cadena ligera kappa humano. No se observaron productos detectables en el infiltrado de la etapa de concentración y de filtración (Figura 7A, carril 2 y 4, respectivamente). El material difiltrado, diluido a 1/10, se cargó en la columna de CM-sepharose (Figura 7A, carril 5). El análisis de transferencia de Western mostró que el eluato CM (Figura 7A, carril 8) contenía los fragmentos VB6-050 de longitud completa y posibles VB6-050 degradados. El flujo a través de la columna de níquel, carril 9, muestra la mayor parte de los productos VB6-050 y otros unidos a la columna. El eluato Ni²⁺, carril 13, se aplicó después sobre una SEC 200 de exclusión por tamaño, que permite la separación de VB6-050 intacta de los fragmentos degradados (Figura 7A, carril 14 y Figura 7B, carril 2).

3) Detección de proteínas de unión VB6-050 por citometría de flujo

Para VB6-050, se seleccionaron líneas celulares positivas a antígeno y negativas a antígeno basándose en los datos de perfilado de cada anticuerpo. La Fab-de-bouganina unida se detectó por citometría de flujo usando un anticuerpo anti-bouganina. Como se esperaba, no se detectó unión por citometría de flujo después de incubación con la célula negativa a antígeno. Por otro lado, la Fab-de-bouganina unida se detectó con las líneas celulares positivas a antígeno. Además, la línea celular positiva a antígeno se incubó con diversas concentraciones de la proteína Fab-de-bouganina, que variaban de 0 a 500 µg/ml y se determinó la actividad de unión por citometría de flujo. Se generó una curva de titulación (Figura 8). La inversa de la fluorescencia media determinada se representó gráficamente en función de la inversa de concentración de anticuerpo para determinar la K_D mediante el procedimiento de Lineweaver-Burk. Se generó una línea recta y la K_D se calculó a partir de la pendiente de la curva. Se determinó la constante de disociación K_D mediante la siguiente ecuación: $1/F = 1/f_{max} + (K_D/F_{max}) (1/VB6)$, en la que F = fluorescencia media menos el fondo y la F_{max} se calculó a partir de la representación gráfica (Tabla 7). El punto de saturación de la Fab-de-bouganina se determinó a partir de la curva de saturación y se usó para el ensayo de competencia con el anticuerpo parental. El punto de saturación de VB6-050, 250 µg/ml, se incubó con células positivas a antígeno en presencia de cantidades en aumento de su correspondiente IgG parental que variaba de 0 a 1000 µg/ml. La VB6-050 unida se detectó por citometría de flujo usando anticuerpo anti-bouganina. Como se esperaba, la IgG parental compitió por la unión de las proteínas Fab-de-bouganina. Se determinó que la concentración de IgG necesaria para inhibir el 50 % de la Fab-de-bouganina unida era de 180 µg/ml (Tabla 7).

4) Citotoxicidad de proteínas VB6-050

Se incubaron las líneas celulares negativas y positivas a antígeno con diferentes concentraciones de VB6-050 a

partir de 1 nM a 1 μ M. Después de 5 días de incubación, el valor CI_{50} calculado de VB6-050 fue de 400 nM (Figura 9) (Tabla 7). En cambio, no pudo determinarse la CI_{50} con las líneas celulares negativas a antígeno.

Conclusión

5 La IgG VB1-050 seleccionada de la plataforma Hybridomics e Immunomine™ se modificó genéticamente como una proteína de fusión Fab-de-bouganina soluble que contiene la de-bouganina unida genéticamente al dominio V_H - C_H mediante el engarce escindible de furina. Los datos confirman que el formato Fab-de-bouganina derivado de IgG es adecuado para la expresión soluble lo que permite facilitar el proceso aguas abajo. Una vez depurados, los datos de citometría de flujo mostraron que los datos de perfilado del formato VB6 coincidían con los de la IgG parental lo que sugería que se conservaba la especificidad y la selectividad. Además, la IgG compitió con las proteínas de fusión VB6 lo que demostraba que ambos fragmentos se unían al mismo antígeno. La afinidad calculada del formato VB6 estaba en el intervalo micromolar que conducía a un valor $CI_{50} \geq$ de 280 nM.

Ejemplo 9: Identificación de antígenos

Caracterización preliminar del Ag VB1-050

15 VB1-050 mostró un aumento del 58,62 % (valor de P 0,008) en la unión después de la desglucosilación. Este aumento en la unión del antígeno observado después de la desglucosilación, sugiere que el resto de glucano puede enmascarar parcialmente los sitios antigénicos en la superficie celular y que la desglucosilación puede ser una etapa esencial en la identificación del antígeno.

Inmunoprecipitación

20 Las mismas cantidades de preparaciones de membranas de cada una de las cuatro líneas positivas, MCF-7, MDA-MB-435S, A-375, HepG2 y de las tres líneas celulares negativas, Panc-1, Daudi y C-33A se desglucosilaron con N-glucanasa y se sometieron a mutación con 40 μ g de VB1-050 y 485-IgG cada una en presencia de inhibidores de proteasa con condiciones que simulaban las condiciones *in vivo*. Los complejos inmunitarios se centrifugaron, se lavaron con tampón de lisis RIP-A y se eluyeron con glicina 0,2 M a un pH de 2,5.

Análisis basado en gel y transferencia de Western

25 Los inmunoprecipitados de todas las líneas celulares mencionadas anteriormente se sometieron a condiciones reductoras y no reductoras de preparaciones de muestras y posteriormente se analizaron mediante SDS-PAGE y transferencia de Western. Las transferencias resultantes se exploraron con 4B5-IgG y VB1-050 simultáneamente y el anticuerpo secundario correspondiente se conjugó con HRP, para visualizar las proteínas inmunoprecipitadas por quimioluminiscencia. En todas las líneas celulares se detectó una banda sencilla a \sim 50 kDa procedente de los inmunoprecipitados de VB1-050 en 1D-PAGE y en 2D-PAGE no se produjo ningún resultado. No se detectaron bandas con 4B5-IgG. Dado que la estrategia convencional no mostró ningún antígeno diferencialmente expresado, se exploró un procedimiento alternativo para la identificación de antígenos.

ID antígeno HTP usando PF-2D ProteomeLab™ en tándem con nano-ESI-MS/MS

Fraccionamiento PF2D de HepG2, MCF-7, Panc-1 y C-33A

35 Los inmunoprecipitados de VB1-050 previamente fraccionados de preparaciones de membrana se limpiaron de cualquier material particulado por centrifugación a alta velocidad. El sobrenadante limpio se equilibró con tampón Start y se fraccionó en la columna de cromatoenfoco en la primera dimensión. Las fracciones pico que eluyeron a un pH = 7,4-7,6 se equilibraron con disolvente A (TFA 0,1 %) en la proporción de 1:4, y se fraccionaron en la columna HPRP con un gradiente de acetonitrilo al 0-100 % que contenía trazas de TFA.

40 Después del fraccionamiento sobre la columna de cromatoenfoco (CF), HepG2 y MCF-7 mostraron solo un pico amplio que eluía a un pH de 7,4-7,6 como dos fracciones (que constituían el N° B6 y B7) a los 68 y 65 minutos respectivamente. Como se observa en las Figuras 10A y B, las membranas de HepG2 y MCF-7 que eluyeron de la columna HPRP mostraron diferentes perfiles de separación, totalmente dependientes de la presencia de los antígenos reactivos a VB1-050. Se observó que dos picos se regulaban diferencialmente en las líneas celulares positivas, que parecía que eran insignificativos o totalmente ausentes en las líneas celulares negativas, las membranas de Panc-1 y C-33A (Figura 10A y B). En el minucioso análisis de los picos de proteína presentes en las líneas celulares positivas (MCF-7 y HepG2), se observó que los picos eluían de la columna RP-HPLC con tiempos de retención de 15 y 18 minutos, respectivamente. Estos picos no se observaron en las líneas celulares negativas a antígeno (Panc-1 y C-33A). En cambio, se observó un solo pico que eluía ligeramente tan pronto como a los 12 minutos en las líneas celulares negativas.

Análisis de fraccionamiento usando programación informatizada ProteoVue™/DeltaVue™

Los perfiles cromatográficos obtenidos para la columna HPRP se importaron a archivos ProteoVue™ para formatearse en un formato aceptable para el análisis final en DeltaVue™. Para el fraccionamiento del antígeno los

análisis se combinaron a partir de las líneas celulares tanto positivas (HepG2 y MCF-7) como negativas (Panc-1 y C-33A) y se formateó usando el programa informático ProteoVue® para generar un mapa de proteínas de membrana exhaustivo de cada una de las líneas celulares. Después de esto se generó un perfilado comparativo de proteínas diferencialmente reguladas en el programa informático DeltaVue™. Los perfiles cromatográficos del fraccionamiento de ambas líneas celulares se transformaron desde picos a áreas realizando patrones de banda de expresión diferencial más fácilmente visibles. Los picos/bandas particulares, diferencialmente expresados en las líneas celulares positivas, pudieron enfocarse para una mejor resolución y análisis. El solapamiento de las representaciones positivas y negativas obtenido en cada experimento demostró que la sobre-expresión de las proteínas solo se observaba en las líneas celulares positivas (HepG2 y MCF-7) y que estas fracciones se usaban con fines de extracción de péptidos.

Extracción peptídica de fracciones pico

Se realizaron digestiones tripticas con tripsina de calidad secuenciadora en un proceso de extracción peptídico de 20 horas dando como resultado finalmente la extracción de péptidos que se analizaron en un QSTAR Pulsar-I (ESI-qTOF-MS/MS), equipado con una nanofuente con un caudal de trabajo de 20-50 nUmin. Los péptidos se ionizaron y se detectaron como moléculas cargadas el doble, el triple o el cuádruple, que después se refinaron con respecto a sus masas respectivas. La secuenciación *de novo* de las proteínas identificadas también se realizó siempre que fuese posible. Los péptidos se extrajeron de ambas líneas celulares positivas y negativas para garantizar que se trataba del antígeno correcto. Las masas peptídicas extraídas de los espectros de masas se usaron directamente para identificar el antígeno de acuerdo con las puntuaciones de MOWSE obtenidas en las bases de datos de las proteínas que eran accesibles a través del buscador MASCOT.

Los péptidos se extrajeron tras digestión triptica de las fracciones pico eluyendo a 15-18 minutos, a partir de las cuatro muestras (MCF-7, HepG2, Panc-1 y C-33A) y se sometieron a análisis MS. Además de las fracciones que eluían a los 15, 18 minutos, también se procesaron simultáneamente las fracciones que eluían al minuto 12 de las líneas celulares positivas y negativas. Las Figuras 11-14 muestran los resultados de las exploraciones TOF-MS de los péptidos obtenidos a partir de las líneas celulares. Como se observa en la Figura 15, se identificó una sola proteína correspondiente al transportador de glucosa 8 de ambas líneas celulares positivas que no pudo detectarse en las líneas celulares negativas. La diferencia en cuanto a la elución entre los dos picos (15 minutos frente a 18) pudo atribuirse a cambios en la glucosilación u a otras modificaciones post-traduccionales.

Análisis espectral de masas

Se realizó un análisis peptídico de dos maneras:

- Todos los péptidos recuperados y reconstruidos con sus masas correctas se usaron directamente en una etapa de identificación genética de masa peptídica para obtener una ID para la proteína.
- Los péptidos que eran abundantes y bien ionizados se seleccionaron para fragmentación iónica MS/MS adicional, en la que se usaron los iones 'y' y 'b' para deducir su estructura primaria. Estas secuencias se investigaron después con respecto a sus homologías en la base de datos de proteínas para la ID de proteína.

Los péptidos se ionizan y se detectan como moléculas cargadas el doble, triple o cuádruple, en un sistema LC-MS/MS en lugar de detectarse como individualmente cargados en una ionización asistida por matriz tal como en MALDI. Las masas respectivas de los péptidos diferencialmente cargados se refinaron después de esto, en la etapa de reconstrucción de masa. Después, estas masas peptídicas se analizaron directamente por un buscador mascot basado en ciencia matricial para la ID de antígeno. Las masas peptídicas extraídas de los espectros de masas se usaron directamente para identificar el antígeno de acuerdo con las puntuaciones de MOWSE obtenidas en las bases de datos de proteínas accesibles a través de buscadores tales como MASCOT, SEQUEST y Prospector. Dado que la adquisición de QSTAR-pulsar-I incluye la adquisición de licencia del servidor Pepsea para adiciones de bases de datos de proteínas más recientes, y que es compatible con MASCOT, este buscador se seleccionó para todas las búsquedas de proteína.

La lista de los péptidos recuperados y sus posiciones en el mapa con respecto a la secuencia del Transportador de Glucosa 8 se proporciona en las Figuras 15, 16 y en la Tabla 8. Todos los péptidos representados se obtuvieron por secuenciación *de novo*. La Figura 17 identifica al Transportador de Glucosa 8 como el antígeno.

La fragmentación MS/MS de cuatro de los péptidos (1401,54-466,600000,3+; 1070.785448-536,400000, 2+; 1.998.272862-667.098230, 3 +; 1176.185448-589,100000, 2 +) dio lugar a los iones fragmentados mostrados en las Figuras 18-21 que mapean con respecto a los péptidos del Transportador de Glucosa 8. Dado que estos 2 péptidos se detectaron en TOF-MS, estos péptidos se usaron para la fragmentación iónica MS/MS además de los péptidos derivados de la identificación genética de masa. Para esta finalidad se usó un cabezal nanopulverizador específico en una nanofuente. La energía de colisión fue de 48 V, el gas cortina y el gas CAD se conservaron a 25 y 6, respectivamente, y la muestra se permitió que realizase un ciclo de 1.667 minutos (100 ciclos) para obtener fragmentación iónica de masa estable. Los péptidos derivados de los espectros coincidieron claramente con la secuencia del transportador de glucosa 8, por lo tanto se desplegaron como aciertos principales. Los datos de fragmentación de iones confirmaron adicionalmente la identidad del Transportador de Glucosa 8 como el antígeno

afín para VB1-050.

La identificación genética de la masa peptídica y fragmentación MS/MS de las fracciones positivas a antígeno revelaron la identidad del transportador de glucosa 8/producto génico/GLUTX1/SLC 2A8 como el antígeno de unión afín para VB1-050. El transportador de glucosa 8 es una proteína transmembrana de tipo II de ~ 50 kDa, con el extremo N dentro de la célula. Se obtuvo un ámbito de secuencia del 34 % a partir de los péptidos que se recuperaron por vía interna. Las líneas celulares, seleccionadas positivas por flujo mostraron la presencia del antígeno después de la inmunoprecipitación. El análisis MS/MS de dos péptidos, 1070.785, que apareció como una molécula doblemente cargada (536.40000, 2+); 1401.54, que apareció como una molécula triplemente cargada (466.60000, 3+), identificó dos secuencias peptídicas, SL4SVVVGVIQ (292-303) y KTLEQITAHFEGR (466-477), respectivamente, claramente coincidentes con la secuencia de proteína que correspondía al Transportador de Glucosa 8.

La secuenciación MS/MS de dos péptidos adicionales recuperados de MCF-7, 1176.3547 y 1997.9992, mapeó secuencias con una homología del 68,2 % con los péptidos correspondientes de GLUT8 con cambios en los aminoácidos en siete posiciones, es decir, 7, 10, 12-15, 18. Los cambios incorporados se corresponden con los cambios posicionales en 12, 13 de LL a AA como indican Shin y col. (2004, J. Neuro Res. 75: 835), que se encargan de la orientación de GLUT8 desde el citosol a las membranas plasmáticas.

Aunque la presente invención se han descrito con referencia a lo que actualmente se considera que son los ejemplos preferidos, debe entenderse que la invención no se limita a los ejemplos desvelados.

Tabla 1: Secuencias CDR

Secuencias CDR				
VB1-050				
	Cadena L		Cadena H	
CDR1	RASQDISNYLA	SEC ID N°: 1	NYAMS	SEC ID N°: 4
CDR2	AASSLHS	SEC ID N°: 2	AITPSGGSTNYADSVKG	SEC ID N°: 5
CDR3	LGYSTYPIT	SEC ID N°: 3	VPYRSTWYPLY	SEC ID N°: 6

Tabla 2: Comparación de la reactividad de la superficie de células tumorales y normales con VB1-050

Indicación clínica	Líneas de células tumorales representativas	N ¹	FM ²	Rango relativo
Mama	MCF-7 ^o , MDA-MB-231 ^o , MDA-MB-435S ^o	3	29,9	1
Melanoma	A-375, SK-MEL-5 ^{a, b} , SK-MEL-28 ^a	3	22,7	2
Ovario	SK-OV-3 ^a , OVCAR-3	2	21,7	3
Próstata	DU-145 ^{a, b, c} PC-3 ^{a, b, c} LNCaP ^{a, b, c}	3	19,6	4
Riñón	Caki-1 ^a , A498 ^a , ACHN ^a	3	18,4	5
Recto	SW837, NCI-H630	2	15,2	6
Pulmón	A-549, HCI-H460, NCI-H69	3	14,8	7
Hígado	SK-HEP-1, Hep-G2	2	14,6	8
Colon	HT-29 ^a , SW480, WiDr	3	13,3	9
Cuello uterino	HeLa, C-41, C33A	3	11,8	10
Cabeza y cuello	SCC-15, SCC-25	2	11,4	11
Vejiga Urinaria	UM-UC-3, T24	2	9,8	12

Indicación clínica	Líneas de células tumorales representativas	N ¹	FM ²	Rango relativo
Estómago	AGS, NCI-N-87, KATO III	3	9,6	13
Páncreas	PANC-1, BxPC-3, MIA PaCa-2	3	7,6	14
Endometrio	RL-95-2, HEC-1-A	2	7,0	15
Tipo celular normal	Línea Celular			tumor normal
Riñón	HRE	1	12,5	1,5
Pulmón	NHLF	1	8,7	1,7
Endotelial	HUVEC	1	5,0	N / A
Mama	HMEC	1	3,1	9,6
Próstata	PrEC	1	2,1	9,3

¹N indica el número de líneas celulares ensayadas por indicación. ²FM: los valores indican la media calculada de la suma del factor de aumento medio en la fluorescencia media sobre el anticuerpo control de todas las líneas celulares en cada indicación. Un valor de cero indica reactividad no medible con respecto al anticuerpo control, ^a Indica modelos ortotópicos ofrecidos por AntiCancer Inc. ^b Indica líneas celulares disponibles como transfectantes con GFP (*Green Fluorescent Protein*, proteína verde fluorescente). ^cHer2/neu⁻, ER⁺. ^dHer2/neu⁻, ER⁻, p53^{wt}, ras^{wt}, ^eHer2/neu⁻, ER⁻, p53^{mt} ras^{wt}, ^fsensible a andrógeno. ^gno sensible a andrógeno.

Tabla 3: Matriz de BD de tejido normal crítico fijado en formalina para VB1-050

Tejido	Tinción de membrana	Intervalo de Puntuación
Cerebro	Sin tinción (0/6)	0
Colón ²	Sin tinción (0/4)	0
Corazón	Sin tinción (0/5)	0
Riñón	Sin tinción (0/3)	0
Hígado	Sin tinción (0/5)	0
Pulmón	Sin tinción (0/4)	0
Páncreas	Sin tinción (0/4)	0
Estómago ³	Sin tinción (0/4)	0

¹ La puntuación se evaluó en una escala de 0-3+, siendo 0 = sin tinción y con trazas menores de 1+ pero mayores de 0. Los grados 1+ a 3+ representan un aumento de intensidad de tinción, siendo 3+ la más fuerte, tinción de pardo oscuro. En general, se exploró una sola muestra de ensayo de 6 pacientes diferentes. Cuando se exploraron menos de 6 pacientes las puntuaciones indican que se han perdido o que no eran representativas del tejido a teñir. Los valores entre paréntesis indican el porcentaje de células teñidas en el intervalo puntuado. ² Solo se usaron tejidos normales adyacentes. ³ Cuatro de cinco eran muestras de ensayo de tejido normal adyacente.

Tabla 4: TMA normal fijado en formalina de BD para VB1-050

Tejido	Tinción de membrana	Intervalo de puntuación
Adrenal	Sin tinción (0/5)	0
Aorta	Sin tinción (0/5)	0
Arteria	Sin tinción (0/5)	0
Vejiga urinaria	Sin tinción (0/5)	0
Cerebral	Sin tinción (0/5)	0
Mama	Sin tinción (0/5)	0
Trompa de Falopio	Sin tinción (0/5)	0
LN	Sin tinción (0/4)	0
Músculo	Sin tinción (0/5)	0
Ovario	Ninguno (0/5)	0
Pituitaria	Ninguno (0/5)	0
Placenta	Sin tinción (0/5)	0
Próstata	0/5	0
Piel	0/1	
Médula espinal	Sin tinción (0/3)	0
Bazo	Sin tinción (0/5)	0
Testículo	1/5	1 + (30 %)
Timo	Sin tinción (0/1)	0
Tiroide	Sin tinción (0/5)	0
Uréter	0/2	0
Útero	Sin tinción (0/3)	0

*La puntuación se evaluó en una escala de 0-3+, siendo 0 = sin tinción y con trazas menores de 1+ pero mayores de 0. Los grados 1+ a 3+ representan un aumento de intensidad de tinción, siendo 3+ la más fuerte, tinción de pardo oscuro. En general se exploraron 2 muestras de ensayo de 8 pacientes diferentes. Cuando se exploraron menos de 8 pacientes las puntuaciones indican que se han perdido o que no eran representativas del tejido a teñir. Los valores entre paréntesis indican el porcentaje de células teñidas en el intervalo puntuado

Tabla 5: TMA tumoral fijado en formalina de BD para VB1-050

Tejido	Tinción de membrana	Intervalo de puntuación *
Vejiga	2/8	2 + (50 %)
Mama	1/8	1 + (90 %)
Cuello uterino	1/8	1 + (30 %)
Colon	4/7	1 + (70-90 %)
Riñón	1/8	2 + (40 %)
Hígado	3/6	1 + (80 %)
Pulmón	0/6	N/A
Ovario	3/7	1 + (20 %)
Páncreas	2/8	2 + (30-80 %)
Próstata	4/7	1 + (20-60 %)
Recto	0/7	N/A
Piel	0/4	N/A
Estómago	4/8	2 + (30 %)
Útero	0/8	N/A
Cabeza y cuello	2/8	2 + (30-50 %)

La puntuación se evaluó en una escala de 0-3+, siendo 0 = sin tinción y con trazas menores de 1+ pero mayores de 0. Los grados 1+ a 3+ representan un aumento de intensidad de tinción, siendo 3+ la más fuerte, tinción de pardo oscuro. En general se exploraron 2 muestras de ensayo de 8 pacientes diferentes. Cuando se exploraron menos de 8 pacientes las puntuaciones indican que se han perdido o que no eran representativas del tejido a teñir.. Los cánceres de cabeza y cuello incluyeron carcinomas de garganta, labio, laringe, boca, amígdala y superficie gingival. Los valores entre paréntesis indican el porcentaje de células teñidas en el intervalo puntuado. Las indicaciones del cáncer que están en negrita indican reactividad VB1-050.

Tabla 6: Evaluación por citometría de flujo de la unión del anticuerpo en función del tiempo y temperatura

MABID	Anticuerpos ¹	Incubación (min) a 37 °C	Fluorescencia Media (FM)	Factor de aumento en FM ²	% de reducción en FM ³
VB1-050	VB1-050	- ⁴	1041,0 ± 23,0	129,1	-
		60	397,5 ± 5,1	49,2	61,8
		120	317,5 ± 4,1	39,3	69,6
Control sin internalización	MA-103	-	536,1 ± 31,3	112,8	-
		120	535,5 ± 16,8	113,0	-
Control con internalización	5E9	- ⁴	248 ± 11	60,0	-
		60	53,5 ± 1,5	13,0	78,3
		120	48 ± 4	11,7	80,5

¹ Se muestra un experimento representativo. ² La FM aumenta por encima del control negativo, IgG de mieloma de ratón o IgG humana (485), ³ Porcentaje de reducción de FM de la superficie celular de células tumorales, ⁴ células (-) incubadas en hielo durante 120 minutos.

Tabla 7: Caracterización biológica de VB6-050

	Afinidad (M)	Concentración de saturación de VB6 (µg/ml)	Concentración de IgG (µg/ml) *	Cl ₅₀ (nM)
VB6-050	5.10 ⁻⁶	250	180	400

ND: no determinado. * Concentración de IgG que inhibe el 50 % de la unión de VB6.

Tabla 8: Listado de péptidos recuperados

Observador	Inicio	Fin	Péptido	SEC ID Nº:
1998,27	3	22	PEDPSETEPAAPRPGASAPR	12
1151,241	6	15	PSETEPAAPR	13
3140,68	26	56	RVFLAAFAAALGPLSFGFALGYSSPAIPSLQRA	14
2916,29	64	93	RLDDAAASWFGAVVTLGAAAGGVLGGWLVDR	15
889,04	216	223	RQEMAALRF	16
2984,32	224	249	RFLWGSEQGWEDPPIGAEQSFHLALLRQ	17
4263,10	427	463	KEFSSLMEVLRPYGAFWLASAFICFVLFVPEIKG	18
1401,54	466	477	KTLEQITAHFEGR	19
	292	302	SLASVWGVQ	

5 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> VIVENTIA BIOTECH INC. GLOVER, Nicholas R. MACDONALD, Glen ENTWISTLE, Joycelyn CIZEAU, Jeannick CHAHAL, Francina C.

10 <120> ANTICUERPOS ESPECÍFICOS DE CÁNCER Y PROTEÍNAS DE SUPERFICIE CELULAR

<130> 10241-64

<140>

15 <141>

<150> US 60/637.448

<151> 21-12-2004

20 <160> 29

<170> PatentIn versión 3.3

<210>1

25 <211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>1

30 **Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Ala**
1 5 10

<210>2

35 <211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>2

5 **Ala Ala Ser Ser Leu His Ser**
 1 5

<210>3

<211> 9

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400>3

15 **Leu Gln Tyr Ser Thr Tyr Pro Ile Thr**
 1 5

<210>4

<211> 5

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400>4

25 **Asn Tyr Ala Met Ser**
 1 5

<210>5

<211> 17

<212> PRT

30 <213> Homo sapiens

<400>5

Ala Ile Thr Pro Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

35 <210>6

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>6

40 **Val Pro Tyr Arg Ser Thr Trp Tyr Pro Leu Tyr**
 1 5 10

<210>7

<211> 108

<212> PRT

45 <213> Homo sapiens

<400>7

ES 2 421 558 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu His Ser Lys Val Pro Thr Gln Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Ser Thr Tyr Pro Ile
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210>8
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400>8

gacatccaga tgaccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtca ggacattagt aattatttag cctggtttca gcggaacca 120
 gggaaagccc ctaagtccct gatctatgct gcatccagtt tgcacagtaa ggtcccaaca 180
 caattcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgcctacag tatagtactt accctatcac cttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa acga 324

10

<210>9
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

<400>9

ES 2 421 558 T3

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Thr Pro Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Gly Arg Val Pro Tyr Arg Ser Thr Trp Tyr Pro Leu Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210>10
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400>10

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagac ttggtacagc ctggggggtc gctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttcagc aactatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagcg attactccta gtggtggtag tacaattat 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attcccagaa tacactgtat 240
 ctgcaaataga acagcctgag agtcgaggac acggccgtat attactgtgg gagagtccca 300
 tatagaagca cttggtaccc tttatattgg ggccagggaa ccoctggtcac cgtctcctca 360

5

ES 2 421 558 T3

<210>11
<211> 477
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5

<400>11

Met Thr Pro Glu Asp Pro Ser Glu Thr Glu Pro Ala Ala Pro Arg Pro
1 5 10 15
Gly Ala Ser Ala Pro Arg Gly Arg Arg Val Phe Leu Ala Ala Phe Ala
 20 25 30
Ala Ala Leu Gly Pro Leu Ser Phe Gly Phe Ala Leu Gly Tyr Ser Ser
 35 40 45
Pro Ala Ile Pro Ser Leu Gln Arg Ala Ala Pro Pro Ala Pro Arg Leu
 50 55 60
Asp Asp Ala Ala Ala Ser Trp Phe Gly Ala Val Val Thr Leu Gly Ala
65 70 75 80

Ala Ala Gly Gly Val Leu Gly Gly Trp Leu Val Asp Arg Ala Gly Arg
85 90 95

Lys Leu Ser Leu Leu Leu Cys Ser Val Pro Phe Val Ala Gly Phe Ala
100 105 110

Val Ile Thr Ala Ala Gln Asp Val Trp Met Leu Leu Gly Gly Arg Leu
115 120 125

Leu Thr Gly Leu Ala Cys Gly Val Ala Ser Leu Val Ala Pro Val Tyr
130 135 140

Ile Ser Glu Ile Ala Tyr Pro Ala Val Arg Gly Leu Leu Gly Ser Cys
145 150 155 160

Val Gln Leu Met Val Val Val Gly Ile Leu Leu Ala Tyr Leu Ala Gly
165 170 175

Trp Val Leu Glu Trp Arg Trp Leu Ala Val Leu Gly Cys Val Pro Pro
180 185 190

Ser Leu Met Leu Leu Leu Met Cys Phe Met Pro Glu Thr Pro Arg Phe
195 200 205

Leu Leu Thr Gln His Arg Arg Gln Glu Ala Met Ala Ala Leu Arg Phe
210 215 220

Leu Trp Gly Ser Glu Gln Gly Trp Glu Asp Pro Pro Ile Gly Ala Glu
225 230 235 240

Gln Ser Phe His Leu Ala Leu Leu Arg Gln Pro Gly Ile Tyr Lys Pro
245 250 255

Phe Ile Ile Gly Val Ser Leu Met Ala Phe Gln Gln Leu Ser Gly Val
260 265 270

Asn Ala Val Met Phe Tyr Ala Glu Thr Ile Phe Glu Glu Ala Lys Phe
275 280 285

Lys Asp Ser Ser Leu Ala Ser Val Val Val Gly Val Ile Gln Val Leu
290 295 300

Phe Thr Ala Val Ala Ala Leu Ile Met Asp Arg Ala Gly Arg Arg Leu
305 310 315 320

Leu Leu Val Leu Ser Gly Val Val Met Val Phe Ser Thr Ser Ala Phe

ES 2 421 558 T3

<210>14
<211> 33
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5

<400>14

Arg Val Phe Leu Ala Ala Phe Ala Ala Ala Leu Gly Pro Leu Ser Phe
1 5 10 15

Gly Phe Ala Leu Gly Tyr Ser Ser Pro Ala Ile Pro Ser Leu Gln Arg
20 25 30

Ala

10

<210>15
<211> 32
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15

<400>15

Arg Leu Asp Asp Ala Ala Ala Ser Trp Phe Gly Ala Val Val Thr Leu
1 5 10 15

Gly Ala Ala Ala Gly Gly Val Leu Gly Gly Trp Leu Val Asp Arg Ala
20 25 30

20

<210>16
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

25

<400>16

Arg Gln Glu Ala Met Ala Ala Leu Arg Phe
1 5 10

30

<210>17
<211> 28
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400>17

Arg Phe Leu Trp Gly Ser Glu Gln Gly Trp Glu Asp Pro Pro Ile Gly
1 5 10 15

35

Ala Glu Gln Ser Phe His Leu Ala Leu Leu Arg Gln
20 25

40

<210>18
<211> 39
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400>18

ES 2 421 558 T3

Lys Glu Phe Ser Ser Leu Met Glu Val Leu Arg Pro Tyr Gly Ala Phe
1 5 10 15

Trp Leu Ala Ser Ala Phe Cys Ile Phe Ser Val Leu Phe Thr Leu Phe
20 25 30

Cys Val Pro Glu Ile Lys Gly
35

5
<210>19
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400>19

10
Lys Thr Leu Glu Gln Ile Thr Ala His Phe Glu Gly Arg
1 5 10

15
<210>20
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400>20

20
Ser Leu Ala Ser Val Val Val Gly Val Ile Gln
1 5 10

25
<210>21
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador gamma

30
<400>21
tctaaagaag ccctgggag cacagctcat caccatg 37

35
<210>22
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador gamma

40
<400>22
gccccggggag cgggggcttg ccggccgtcg cactca 36

45
<210>23
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50
<220>
<223> Cebador gamma

<400>23

ES 2 421 558 T3

accatgagtg agaaaaactg gatttggtg gca 33

5 <210>24
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador gamma

<400>24
ggagccggtg accaggggtc cctggcccca 30

15 <210>25
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Cebador gamma

<400>25
ctcacatgg agtttgggct gagctgggtt 30

25 <210>26
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Cebador gamma

35 <400>26
ggaggctgag gagacggtga ccaggttcc ctggcc 36

40 <210>27
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> cebador kappa

<400>27
ggctcgagat ggacatgrrr dycchvgykc asctt 35

50 <210>28
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> cebador Kappa

<400>28
cccgtcgacc atcagatggc gggaagat 28

60 <210>29
<211> 250
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400>29

Tyr Asn Thr Val Ser Phe Asn Leu Gly Glu Ala Tyr Glu Tyr Pro Thr
 1 5 10 15
 Phe Ile Gln Asp Leu Arg Asn Glu Leu Ala Lys Gly Thr Pro Val Cys
 20 25 30
 Gln Leu Pro Val Thr Leu Gln Thr Ile Ala Asp Asp Lys Arg Phe Val
 35 40 45
 Leu Val Asp Ile Thr Thr Thr Ser Lys Lys Thr Val Lys Val Ala Ile
 50 55 60
 Asp Val Thr Asp Val Tyr Val Val Gly Tyr Gln Asp Lys Trp Asp Gly
 65 70 75 80
 Lys Asp Arg Ala Val Phe Leu Asp Lys Val Pro Thr Val Ala Thr Ser
 85 90 95
 Lys Leu Phe Pro Gly Val Thr Asn Arg Val Thr Leu Thr Phe Asp Gly
 100 105 110
 Ser Tyr Gln Lys Leu Val Asn Ala Ala Lys Ala Asp Arg Lys Ala Leu
 115 120 125
 Glu Leu Gly Val Asn Lys Leu Glu Phe Ser Ile Glu Ala Ile His Gly
 130 135 140
 Lys Thr Ile Asn Gly Gln Glu Ala Ala Lys Phe Phe Leu Ile Val Ile
 145 150 155 160
 Gln Met Val Ser Glu Ala Ala Arg Phe Lys Tyr Ile Glu Thr Glu Val
 165 170 175
 Val Asp Arg Gly Leu Tyr Gly Ser Phe Lys Pro Asn Phe Lys Val Leu
 180 185 190
 Asn Leu Glu Asn Asn Trp Gly Asp Ile Ser Asp Ala Ile His Lys Ser
 195 200 205
 Ser Pro Gln Cys Thr Thr Ile Asn Pro Ala Leu Gln Leu Ile Ser Pro
 210 215 220
 Ser Asn Asp Pro Trp Val Val Asn Lys Val Ser Gln Ile Ser Pro Asp
 225 230 235 240
 Met Gly Ile Leu Lys Phe Lys Ser Ser Lys
 245 250

REIVINDICACIONES

1. Una proteína aislada que comprende una variante asociada con cáncer del transportador de glucosa 8 expresada en la superficie de células cancerosas que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 11, 12 o 13 o una variante funcional de las mismas.
- 5 2. La proteína aislada de la reivindicación 1, que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 11.
3. Una secuencia de ácido nucleico aislado que codifica la proteína de acuerdo con la reivindicación 1 o 2.
4. Un vector de expresión recombinante que comprende la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 3.
5. Una célula huésped que comprende el vector de expresión recombinante de acuerdo con la reivindicación 4.
- 10 6. Un procedimiento para identificar una proteína de unión que puede unirse a un antígeno del transportador de glucosa 8 expresado en la superficie de una célula cancerosa, en donde el procedimiento es un ensayo de unión competitiva que comprende:
- 15 incubar un número fijo de células cancerosas con una concentración mínima de una proteína de unión de referencia (Ab1) que comprende las regiones determinantes de la complementariedad como se muestra en las SEC ID N°: 1-6 o que comprende una región variable de cadena ligera como se muestra en la SEC ID N°: 7 y una región variable de cadena pesada como se muestra en la SEC ID N°: 9 que genera una unión máxima frente al número fijo de células cancerosas y medir la fluorescencia media de Ab1 (FM_{Ab1}); y
- ensayar dos o más concentraciones de una proteína de unión de ensayo (Ab2) por adición de Ab2 a Ab1 y a células cancerosas, y medir la fluorescencia media (FM_(Ab1+Ab2));
- 20 medir la fluorescencia media de fondo (FM_{fondo});
- calcular el PI, en el que
- PI=FM[(FM_(Ab1+Ab2))-FM_{fondo}]/(FM_{Ab1}-FM_{fondo})]x100;**
- y
- comparar el PI con un valor de PI control;
- 25 en el que, un PI que tenga una diferencia estadísticamente significativa con respecto al PI control indica que la proteína de unión de ensayo puede unirse a una variante asociada con cáncer del transportador de glucosa 8 que comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las SEC ID N°: 11-13.
7. Una proteína de unión que comprende las CDR que tienen las secuencias de las SEC ID N°: 1-6, o una variante funcional de las mismas, en donde la proteína de unión puede unirse a una variante asociada con cáncer del transportador de glucosa 8 expresada sobre la superficie de células cancerosas que comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las SEC ID N°: 11-13.
- 30 8. La proteína de unión de la reivindicación 7, en donde la proteína de unión puede unirse a una variante asociada con cáncer del transportador de glucosa 8 que comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las SEC ID N°: 11-13, cuando se evalúa en un ensayo de unión competitiva que comprende:
- 35 incubar un número fijo de células cancerosas con una concentración mínima de una proteína de unión de referencia (Ab1) que comprende la región determinante de la complementariedad como se muestra en las SEC ID N°: 1-6 o que comprende una región variable de cadena ligera como se muestra en la SEC ID N°: 7 y una región variable de cadena pesada como se muestra en la SEC ID N°: 9 que genera una unión máxima frente al número fijo de células cancerosas y medir la fluorescencia media de Ab1 (FM_{Ab1});
- 40 ensayar dos o más concentraciones de una proteína de unión de ensayo (Ab2) por adición de Ab2 a Ab1 y a células cancerosas, y medir la fluorescencia media (FM_(Ab1+Ab2));
- medir la fluorescencia media de fondo (FM_{fondo});
- calcular el PI, en el que
- PI=FM[(FM_(Ab1+Ab2))-FM_{fondo}]/(FM_{Ab1}-FM_{fondo})]x100;**
- 45 y
- comparar el PI con un valor de PI control;

en el que, un PI que tenga una diferencia estadísticamente significativa con respecto al PI control indica que la proteína de unión de ensayo puede unirse a una variante asociada con cáncer del transportador de glucosa 8 que comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las SEC ID N°: 11-13.

- 5 9. La proteína de unión de la reivindicación 7 u 8 que comprende una región variable de cadena ligera como se muestra en la SEC ID N°: 7 o una variante funcional de la misma.
10. La proteína de unión de la reivindicación 7 u 8 que comprende una región variable de cadena pesada como se muestra en la SEC ID N°: 9 o una variante funcional de la misma.
11. La proteína de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en donde la proteína de unión es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.
- 10 12. La proteína de unión de la reivindicación 11, en la que el fragmento de anticuerpo es un Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, dsFv, ds scFv, dímeros, minicuerpos, diacuerpos o multímeros de los mismos o fragmentos de anticuerpos biespecíficos.
13. La proteína de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, donde para aumentar la afinidad de la proteína de unión por el transportador de glucosa 8 o de una variante funcional de la misma, o de una proteína que comprende una cualquiera de las SEC ID N°: 11-13 o una variante funcional de las mismas, se usó maduración de afinidad.
- 15 14. Un inmunoconjugado que comprende (1) una proteína de unión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13 que se une a un antígeno del transportador de glucosa 8 expresado en la superficie de una célula cancerosa fijado a (2) un agente terapéutico contra el cáncer que es citotóxico, citostático o que de otra manera previene o reduce la capacidad de las células cancerosas de dividirse y/o de metastatizarse.
- 20 15. El inmunoconjugado de la reivindicación 14, en el que el agente terapéutico contra el cáncer es una citotoxina.
16. El inmunoconjugado de la reivindicación 15, en el que la citotoxina se selecciona del grupo que consiste en un polipéptido de inactivación de ribosomas, gelonina, bouganina, saporina, ricina, cadena A de la ricina, briodina, differia, restrictocina, exotoxina A de Pseudomonas o variantes de la misma, bouganina modificada o una variante de la misma y una forma truncada de la exotoxina A de Pseudomonas que consiste en los aminoácidos 252-608 o una variante de la misma.
- 25 17. Una composición que comprende el inmunoconjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16 con un excipiente, un vehículo, un tampón o un estabilizante farmacéuticamente aceptables.
18. Un inmunoconjugado de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16 para su uso en el tratamiento o la prevención del cáncer.
- 30 19. El inmunoconjugado para su uso de acuerdo con la reivindicación 18, en donde el inmunoconjugado es para su uso en combinación con uno o más agentes terapéuticos contra el cáncer adicionales para administrar simultáneamente, por separado o secuencialmente.
20. Un procedimiento para detectar o controlar el cáncer en un sujeto que comprende las etapas de:
- 35 poner en contacto una muestra de ensayo, extraída de dicho sujeto, con una proteína de unión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13 que se une específicamente a un antígeno sobre la célula cancerosa para producir un complejo proteína de unión-antígeno;
- medir la cantidad de complejo proteína de unión-antígeno en la muestra de ensayo; y
- comparar con un control la cantidad de complejo proteína de unión-antígeno en la muestra de ensayo.
- 40 21. Un agente de diagnóstico que comprende (1) una proteína de unión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13 que se une a un antígeno sobre una célula cancerosa fijada a (2) un marcador que produce una señal detectable, directa o indirectamente.
22. Un procedimiento para detectar o controlar cáncer en un sujeto que padece o que se sospecha que padece cáncer, que comprende detectar una variante asociada con cáncer del transportador de glucosa 8 expresada en la superficie de células cancerosas que comprende: la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 11, 12 o 13, o variantes funcionales de las mismas, en una célula en la muestra, en la que se indica cáncer, si la proteína se detecta en la célula.
- 45 23. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de una variante asociada con cáncer del transportador de glucosa 8 expresada en la superficie de las células cancerosas que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 11, 12 o 13, o variantes funcionales o fragmento de las mismas, una cantidad eficaz de la secuencia de ácido nucleico aislado de la reivindicación 3, o una cantidad eficaz del vector de expresión
- 50

recombinante de la reivindicación 4, mezclado con un diluyente o un vehículo adecuado.

24. La composición farmacéutica de la reivindicación 23, que adicionalmente comprende un adyuvante.

5 25. Uso de la proteína aislada de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 o un fragmento funcional de la misma, la secuencia de ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 3, el vector de expresión recombinante de la reivindicación 4, o la proteína de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 7-13, en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir cáncer.

10 26. La proteína aislada de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 o un fragmento funcional de la misma, la secuencia de ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 3, el vector de expresión recombinante de la reivindicación 4 o la proteína de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 7-13 para uso en el tratamiento o la prevención del cáncer.

27. Uso de la proteína aislada de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 o un fragmento funcional de la misma, la secuencia de ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 3 o el vector de expresión recombinante de la reivindicación 4, en la fabricación de un medicamento para provocar una respuesta inmunitaria en un sujeto.

15 28. La proteína aislada de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 o un fragmento funcional de la misma, la secuencia de ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 3, o el vector de expresión recombinante de la reivindicación 4, para su uso para provocar una respuesta inmunitaria en un sujeto.

29. Uso de la reivindicación 27, para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto contra una variante asociada con cáncer de la proteína del transportador de glucosa 8 expresada en la superficie de células cancerosas que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 11, 12 o 13 o variantes de la misma.

20 30. Un procedimiento para detectar o controlar cáncer en un sujeto que comprende las etapas de:

detectar la cantidad de ARNm en una célula aislada del sujeto; y

comparar la cantidad de ARNm con un control, en donde el ARNm codifica una variante asociada con cáncer del transportador de glucosa 8 expresada en la superficie de células cancerosas que comprende: la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 11, 12 o 13 o variantes funcionales de la misma.

25 31. Un procedimiento para identificar la capacidad de los compuestos para prevenir o tratar cáncer, que comprende las siguientes etapas:

poner en contacto una célula que exprese una variante asociada con cáncer del transportador de glucosa 8 expresada en la superficie de las células cancerosas que comprende: la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 11, 12 o 13 o variantes funcionales de la misma, con un compuesto de ensayo; y

30 determinar la expresión o la función de la variante asociada con cáncer del transportador de glucosa 8 que comprende: la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 11, 12 o 13 o variantes funcionales de la misma, como un transportador de glucosa;

35 comparar con un control la expresión o la función de la variante asociada con cáncer del transportador de glucosa 8 que comprende: la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 11, 12 o 13 o variantes funcionales de la misma, en donde una disminución en la expresión o la función de la variante asociada con cáncer del transportador de glucosa 8 que comprende: la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 11, 12 o 13 o variantes funcionales de la misma, comparada con el control es indicativa de un compuesto útil para prevenir o tratar cáncer.

40 32. Uso de la proteína de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13 en un inmunoensayo *in vitro* para detectar y/o cuantificar una variante asociada con cáncer del transportador de glucosa 8 expresada en la superficie de células cancerosas que comprende: la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 11, 12 o 13 o variantes funcionales de la misma, en una superficie celular.

33. Uso de la reivindicación 32, en la que el procedimiento de inmunoensayo incluye una transferencia de Western, una inmunoprecipitación seguida de SDS-PAGE, inmunocitoquímica, FACS o una matriz de proteínas.

FIGURA 1

VB1-050

V_L (SEC ID Nos: 8 y 7)

GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA GTC
 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V

ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GAC ATT AGT AAT TAT TTA GCC TGG TTT CAG
 T I T C R A S Q D I S N Y L A W F Q

┌────────────────── CDR 1 (L) ───────────────────┐

CGG AAA CCA GGG AAA GCC CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG CAC
 R K P G K A P K S L I Y A A S S L H

┌────────── CDR 2 (L) ───────────┐

AGT AAG GTC CCA ACA CAA TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC
 S K V P T Q F S G S G S G T D F T L

└──┘

ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGC CTA CAG TAT
 T I S S L Q P E D F A T Y Y C L Q Y

┌──────────────────┐

AGT ACT TAC CCT ATC ACC TTC GGC GGA GGG ACC AAG GTG GAG ATC AAA CGA
 S T Y P I T F G G G T K V E I K R

CDR 3(L) ┌──────────────────┐

FIGURA 2

VB1-050

V_H (SEC ID Nos: 10 y 9)

GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GAC TTG GTA CAG CCT GGG GGG TCG CTG
 E V Q L L E S G G D L V Q P G G S L

AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGC AAC TAT GCC ATG AGC TGG
 R L S C A A S G F T F S N Y A M S W

┌────────── CDR1 (H) ─────────┐

GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC TCA GCG ATT ACT CCT AGT
 V R Q A P G K G L E W V S A I T P S

┌──────────────────────────────────┐

GGT GGT AGT ACA AAT TAT GCA GAC TCC GTG AAG GGC CGG TTC ACC ATC TCC AGA
 G G S T N Y A D S V K G R F T I S R

┌────────── CDR2 (H) ─────────┐

GAC AAT TCC CAG AAT ACA CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GTC GAG GAC
 D N S Q N T L Y L Q M N S L R V E D

ACG GCC GTA TAT TAC TGT GGG AGA GTC CCA TAT AGA AGC ACT TGG TAC CCT TTA
 T A V Y Y C G R V P Y R S T W Y P L

┌────────── CDR3 (H) ─────────┐

TAT TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA
 Y W G Q G T L V T V S S

┌──┐

FIGURA 3

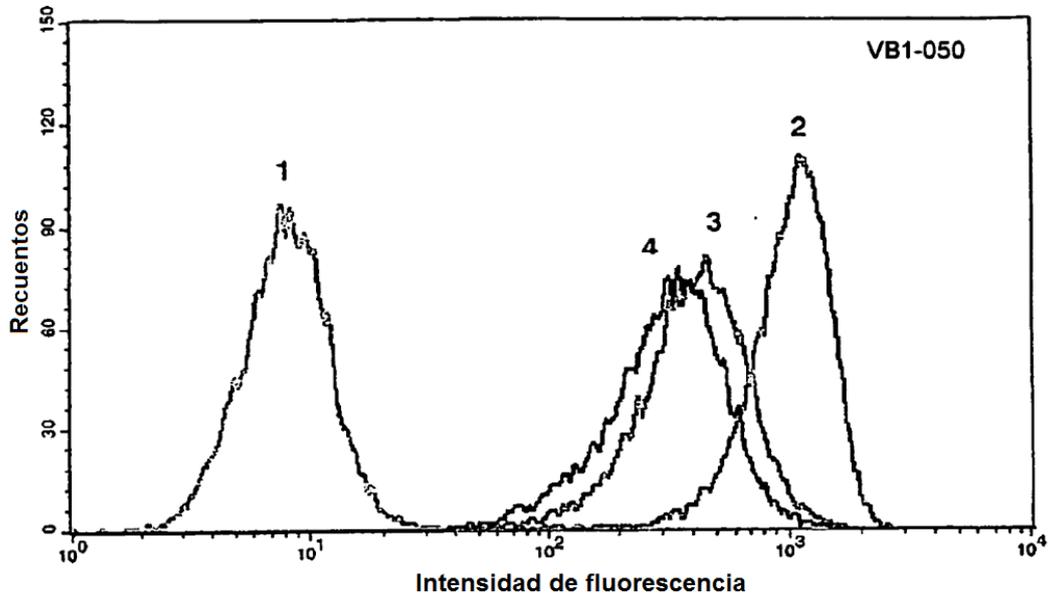


FIGURA 4

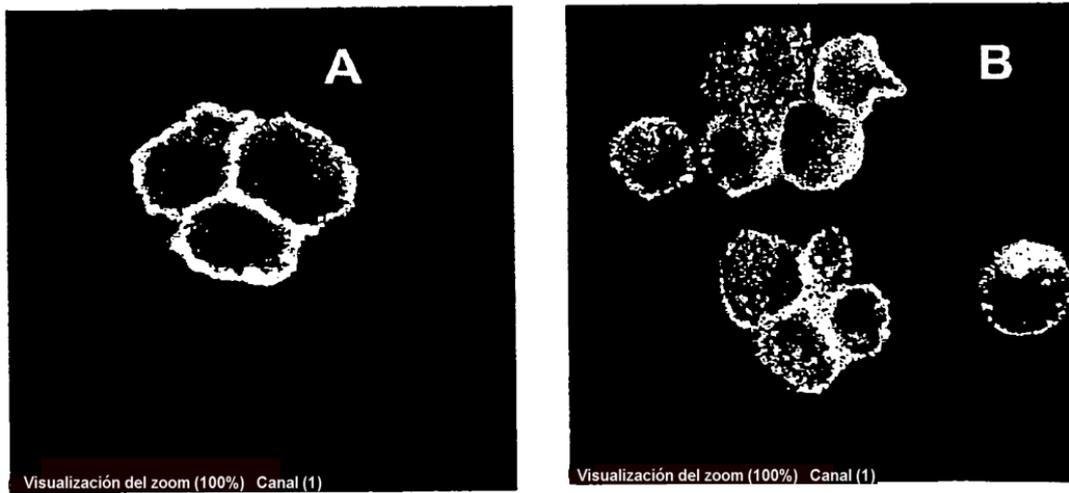


FIGURA 5

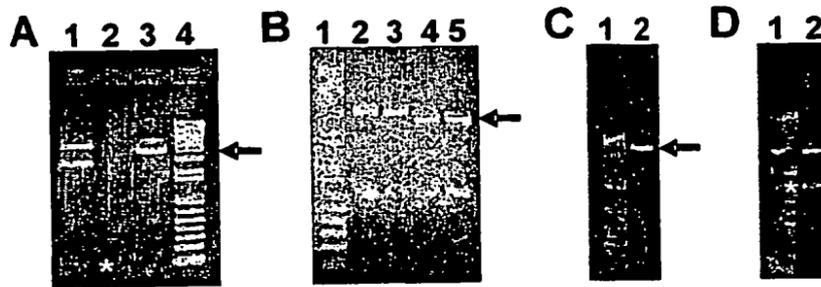


FIGURA 6

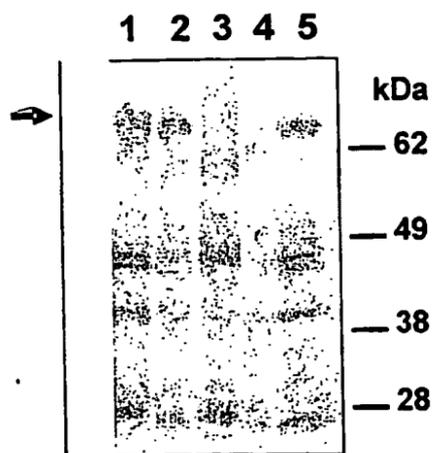


FIGURA 7

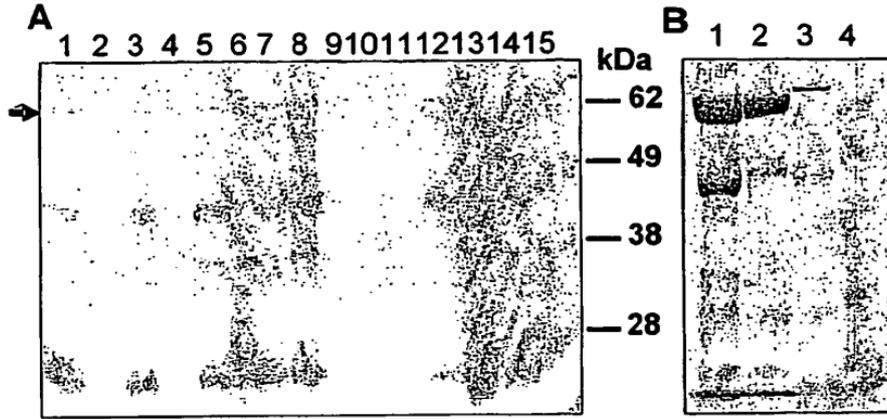


FIGURA 8

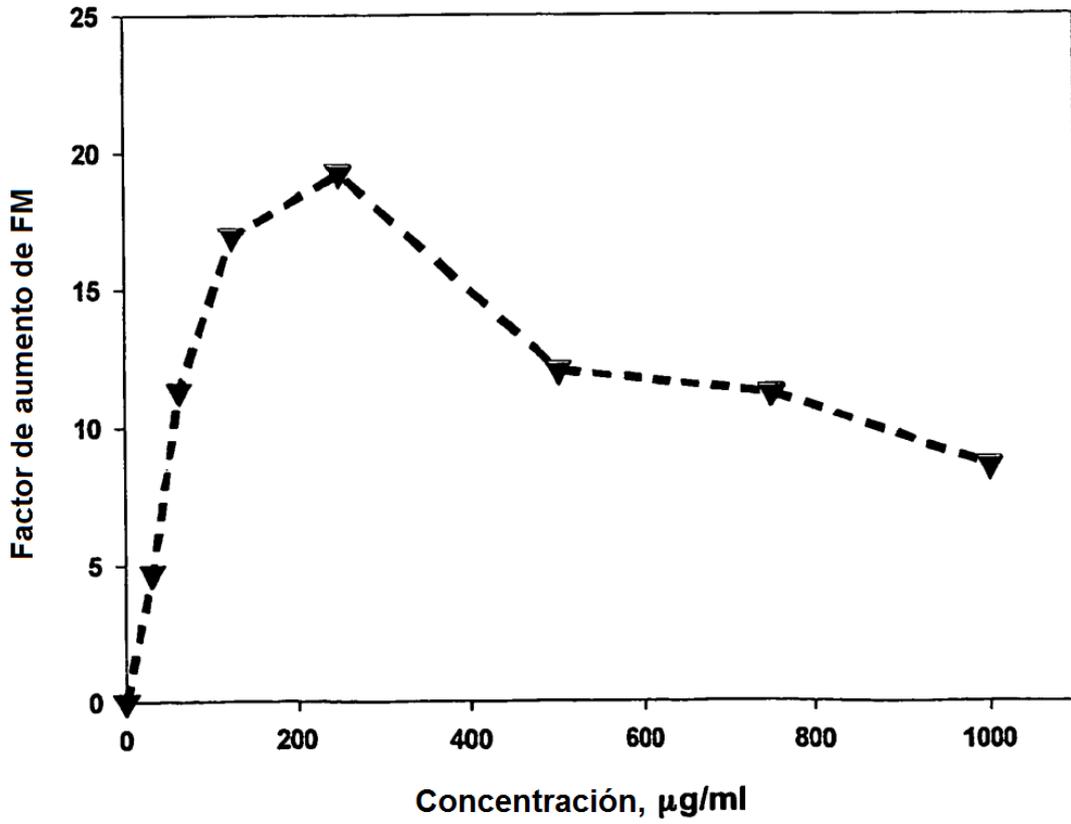


FIGURA 9

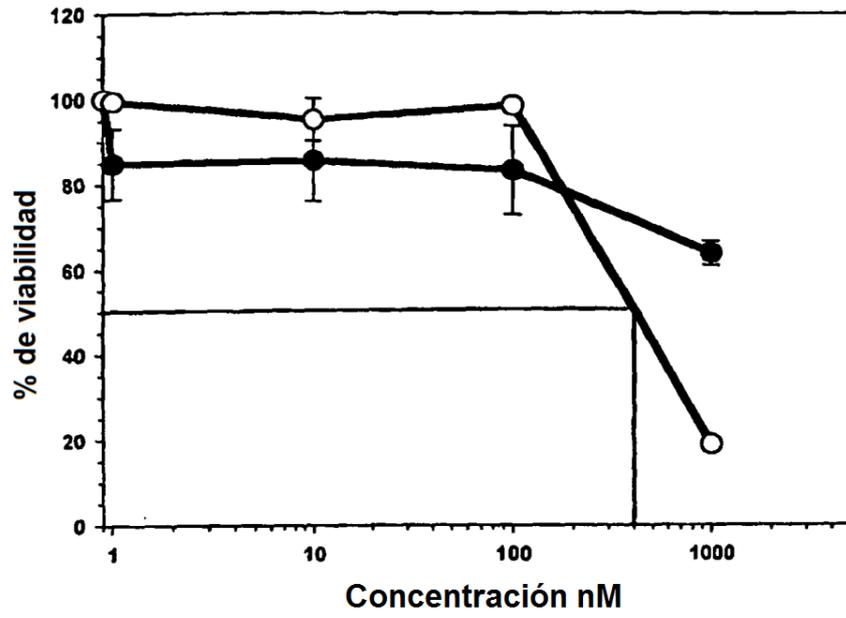


FIGURA 10

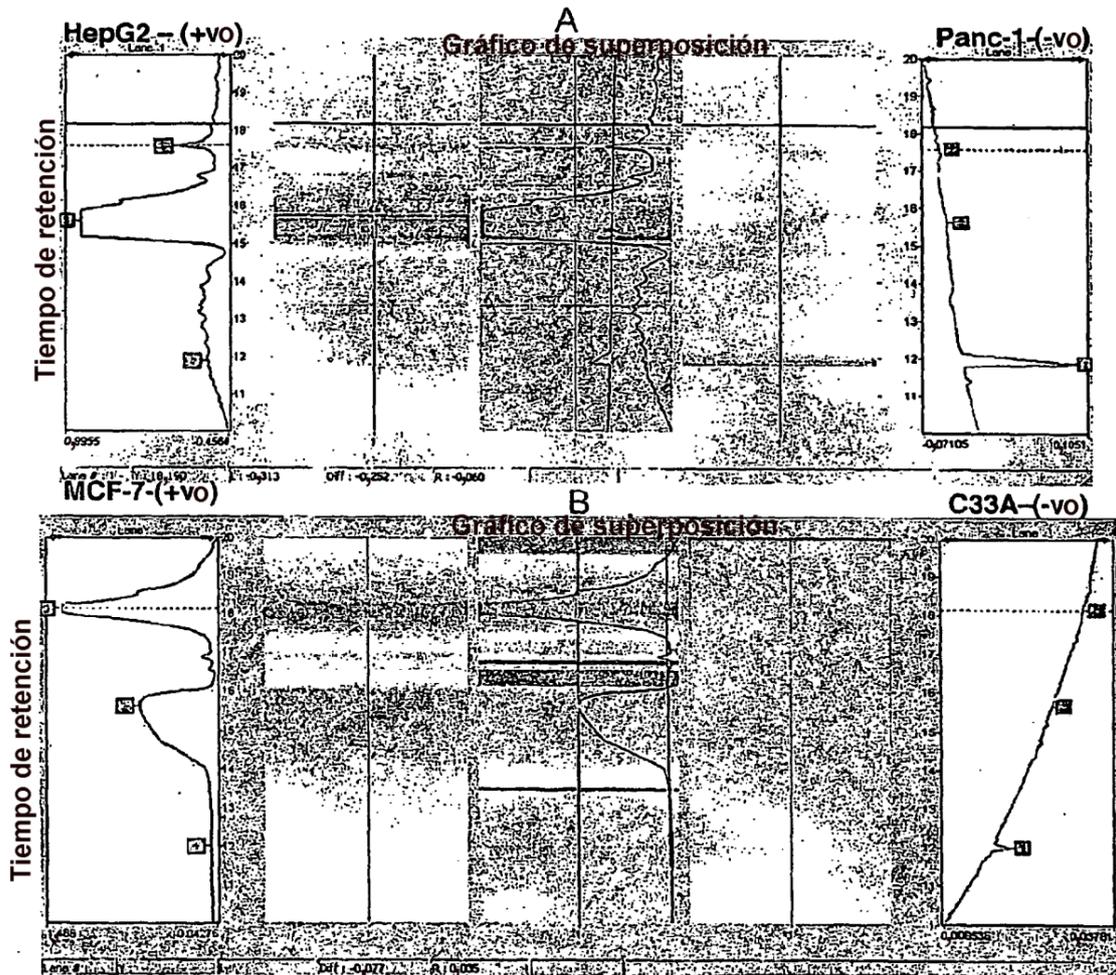
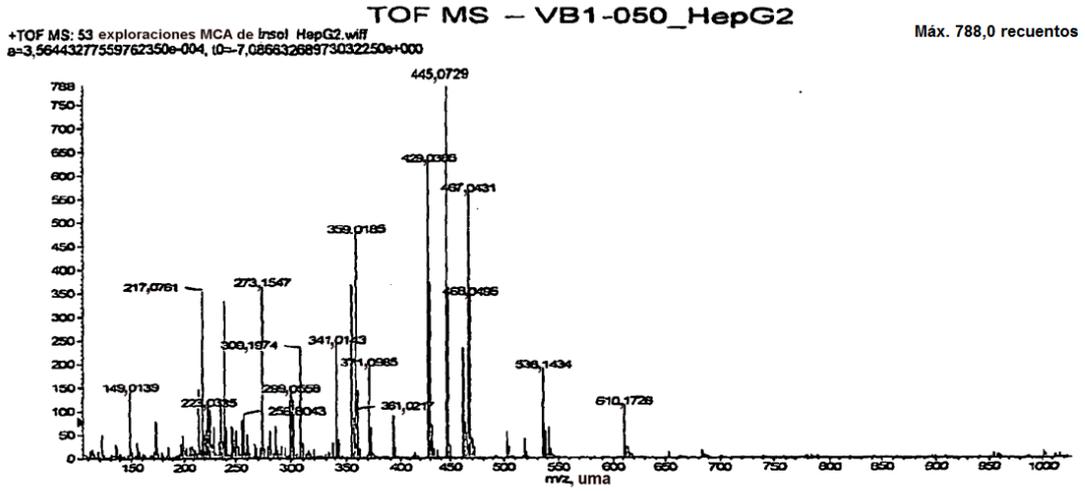


FIGURA 11



Reconstrucción de masa de VB1-050_HepG2

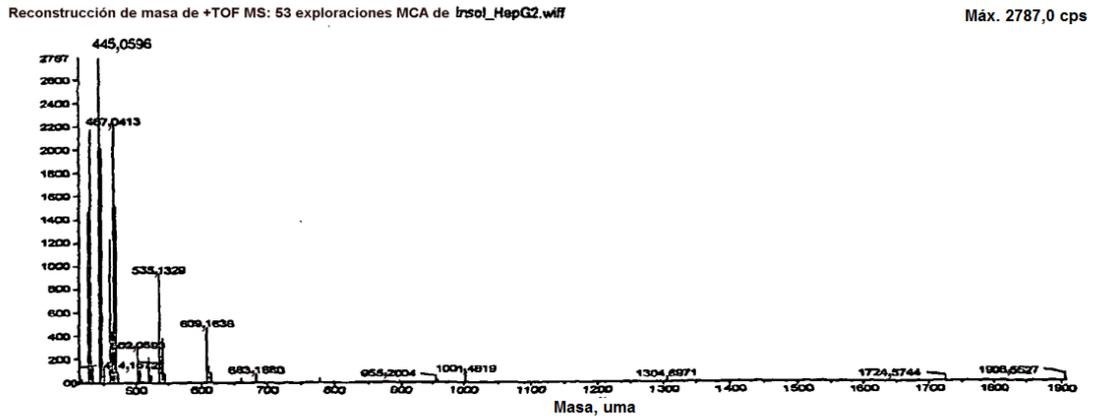
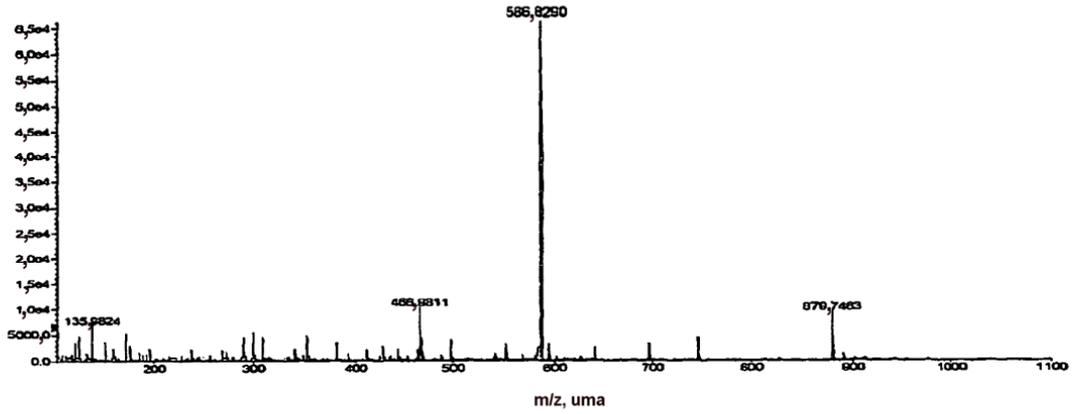


FIGURA 12

TOF MS para VB1-050_Panc-1

+TOF MS: 30 exploraciones MCA de VB1-050_Panc-1.wiff
s=3.56429448729902530e-004, t0= -6.47233171954212590e+000

Máx. 6,6e4 recuentos



Reconstrucción de masa de VB1-050_Panc-1

Reconstrucción de masa de +TOF MS: 30 exploraciones MCA de VB1-050_Panc-1.wiff

Máx. 4,2e5 cps

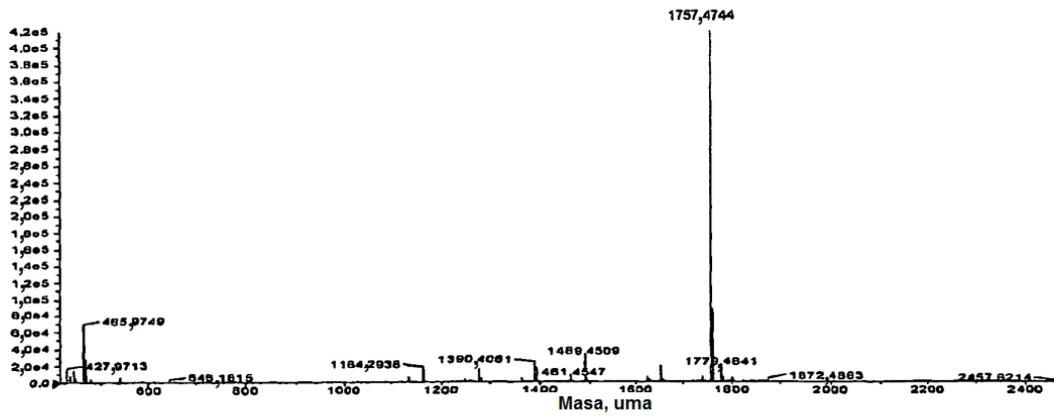
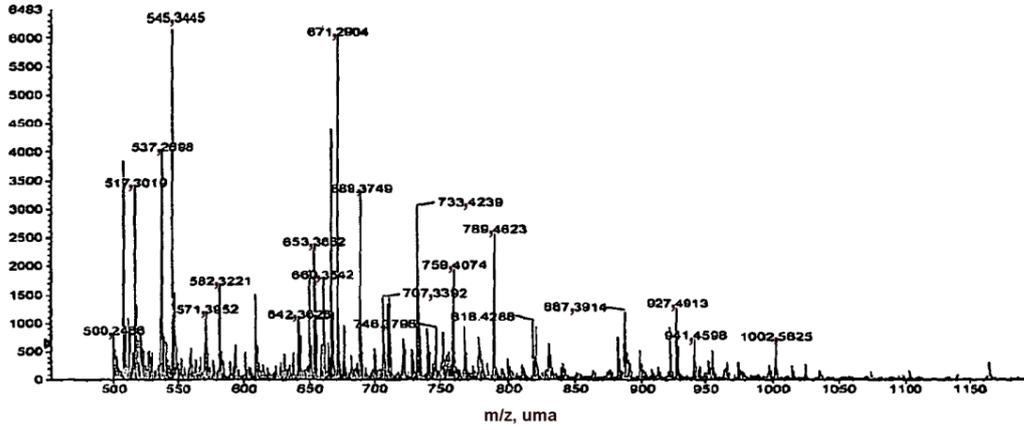


FIGURA 13

TOF-MS VB1-050_MCF-7

+TOF MS: 27 exploraciones MCA de la muestra 2 (TOF MS) de VB1-050_MCF-7.wiff
 s=3,56492179341164940e-004, t0= -7,49816851975377930e+000

Máx. 6843,0 recuentos



Reconstrucción de masa de VB1-050_MCF-7

Reconstrucción de masa de +TOF MS: 27 exploraciones MCA de la muestra 2 (TOF MS) de VB1-050_MCF-7.wiff

Máx. 3.7e4 recuentos

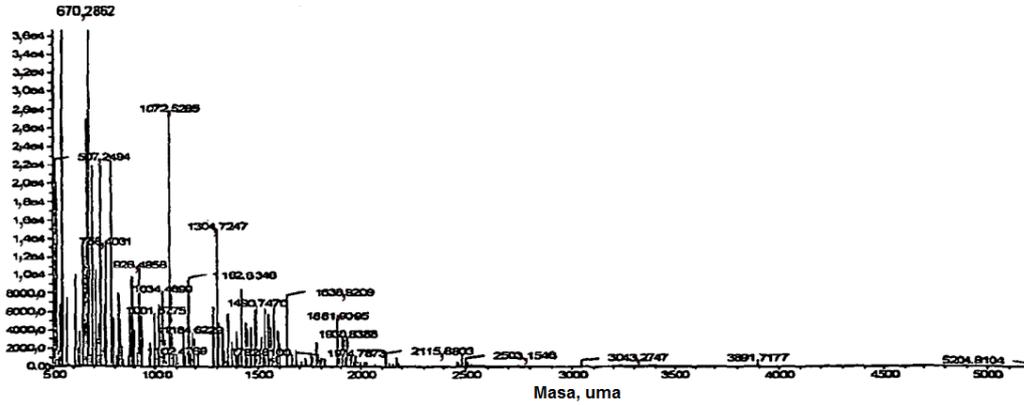
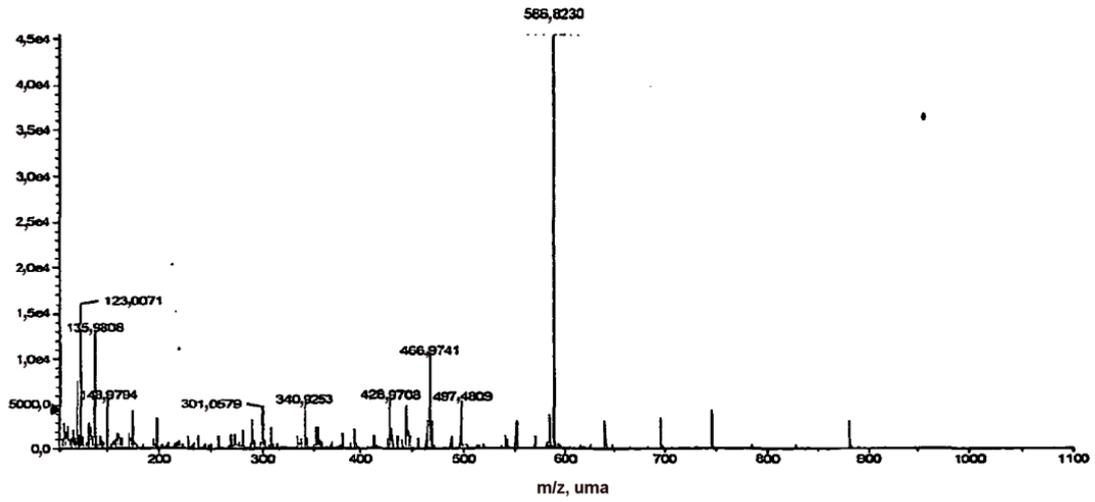


FIGURA 14

TOF MS-VB1-050_C-33A

+ TOF MS: 30 exploraciones MCA de micropulverización iónica de 3 051105.wiff
a=3,56429448728902530e-004, t0=-6,47233171854212590e+000

Máx. 4.6e4 recuentos



Reconstrucción de masa de VB1-050_C33A

Reconstrucción de masa de +TOF MS: 30 exploraciones MCA de micropulverización iónica de 3 051105.wiff

Máx. 2.8e5 cps.

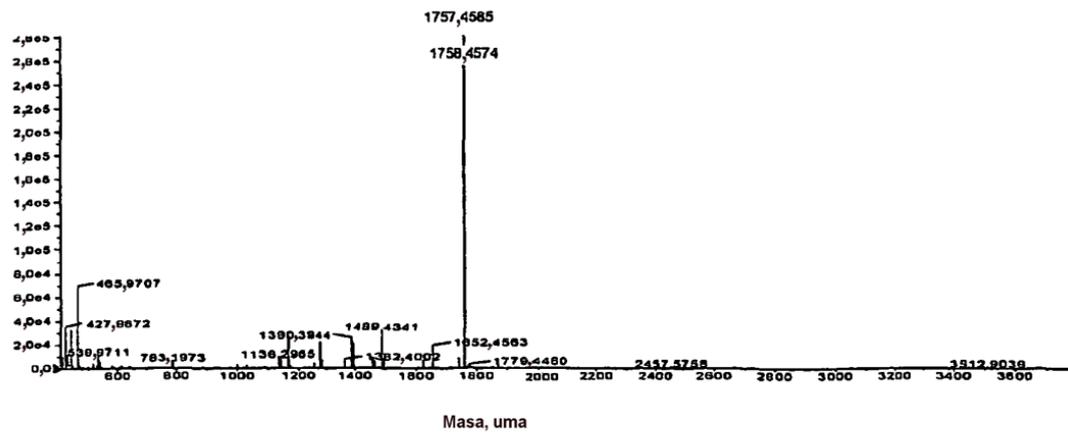


FIGURA 15

SEC ID N°: 11

	<u>MTPEDPSETE</u>	<u>PAAPRPGASA</u>	<u>PRGRRVFLAA</u>	<u>FAAALGPLSF</u>	<u>GFALGYSSPA</u>
51	<u>IPSLQRAAPP</u>	<u>APRLDDAAAS</u>	<u>WFGAVVTLGA</u>	<u>AAGGVLGGWL</u>	<u>VDRAGRKLSL</u>
101	<u>LLCSVPFVAG</u>	<u>FAVITAAQDV</u>	<u>WMLLGGRLLT</u>	<u>GLACGVASLV</u>	<u>APVYISEIAY</u>
151	<u>PAVRGLLGSC</u>	<u>VQLMVVVGIL</u>	<u>LAYLAGWVLE</u>	<u>WRWLAVLGCV</u>	<u>PPSLMLLLMC</u>
201	<u>FMPETPRFLL</u>	<u>TQHRRQEAMA</u>	<u>ALRFLWGSEQ</u>	<u>GWEDPPIGAE</u>	<u>QSFHLALLRQ</u>
251	<u>PGIYKPFIIIG</u>	<u>VSLMAFQQLS</u>	<u>GVNAVVMFYAE</u>	<u>TIFEEAKFKD</u>	<u>SSLASVVVGV</u>
301	<u>IQVLFTAVAA</u>	<u>LIMDRAGRRL</u>	<u>LLVLSGVVMV</u>	<u>FSTSAFGAYF</u>	<u>KLTQGGPGNS</u>
351	<u>SHVAISAPVS</u>	<u>AQPVDASVGL</u>	<u>AWLAVGNMCL</u>	<u>FIAGFAVGWG</u>	<u>PIPWLLMSEI</u>
401	<u>FPLHVKG VAT</u>	<u>GICVLTNWLM</u>	<u>AFLVTKEFSS</u>	<u>LMEVLRPYGA</u>	<u>FWLASAFCIF</u>
451	<u>SVLFTLFCVP</u>	<u>EIKGKTLEQI</u>	<u>TAHFEGR</u>		

FIGURA 16

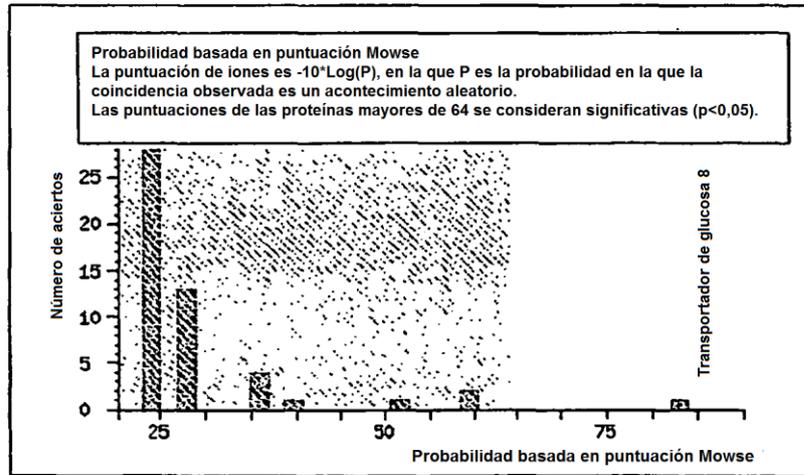
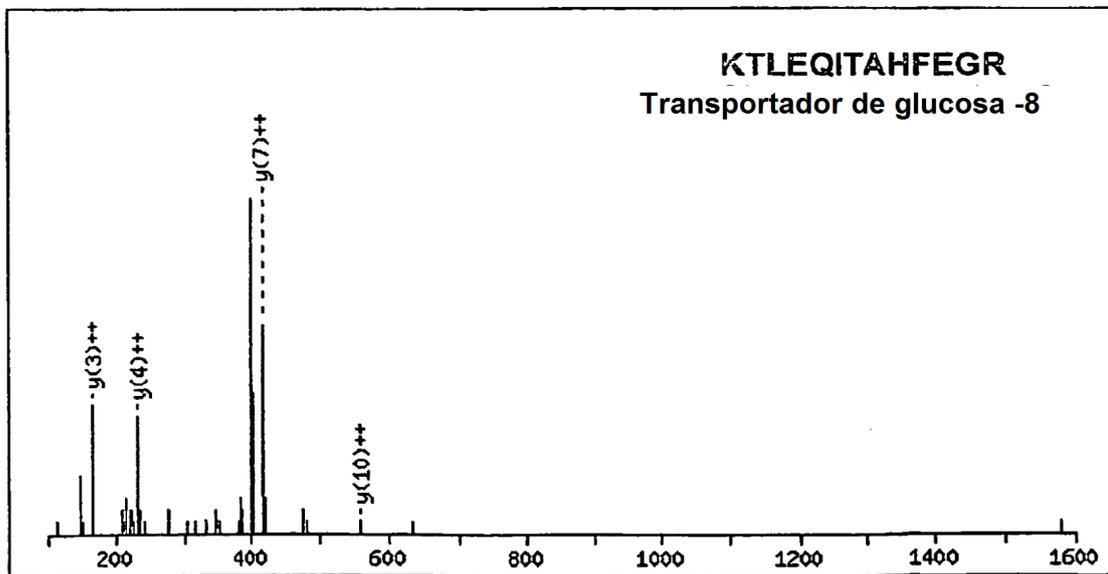


FIGURA 17

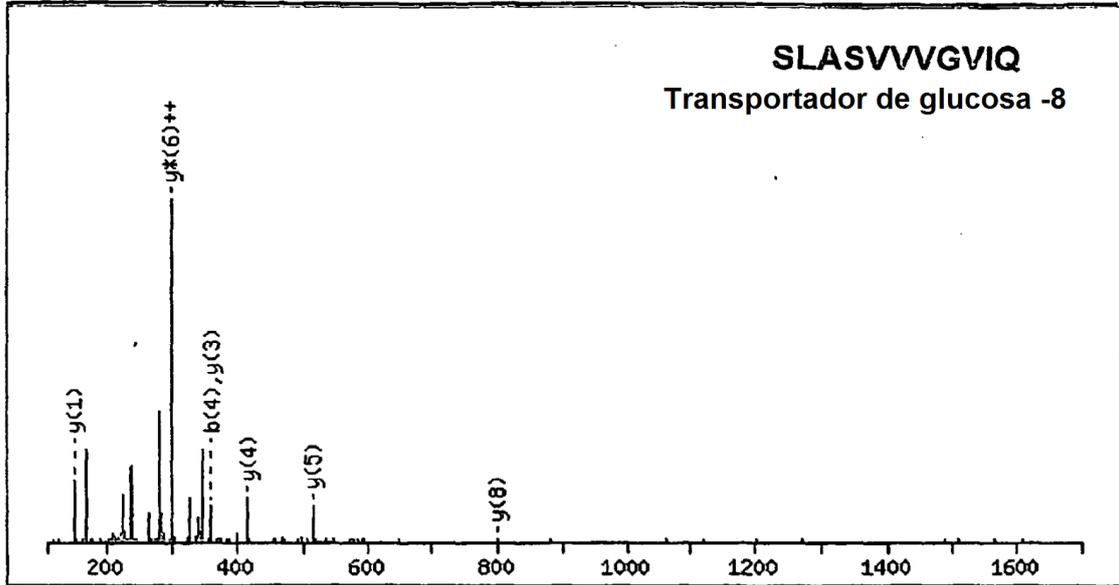
	Registro	Masa	Puntuación	Descripción
1	gi 7018306	50858	83	transportador de glucosa 8 [Homo sapiens]
2	gi 7688146	50792	61	transportador de glucosa 8 [Homo sapiens]
3	qi 21361449	50818	61	soporte de solutos familia 2, (transportador de glucosa facilitado) miembro 8 [Homo sapiens]
4	gi 55665089	43470	52	soporte de solutos familia 2, (transportador de glucosa facilitado) miembro 8 [Homo sapiens]
5	gi 55665088	27790	40	soporte de solutos familia 2, (transportador de glucosa facilitado) miembro 8 [Homo sapiens]
6	qi 22749173	31126	35	proteína hipotética LOC157983 [Homo sapiens]
7	gi 62860046	123247	34	dedo de cinc, dominio de unión-RAN contiene 3 [Homo sapiens]
8	gi 42657033	13184	34	PREVISTO: proteína hipotética XP_379299 [Homo sapiens]
9	gi 21754605	42167	34	producto proteico sin nombre [Homo sapiens]
10	gi 913281	9360	29	receptor de dopamina D4, DRD4 [Homo sapiens]
11	gi 4100821	35815	29	proteína de interacción WASP [Homo sapiens]
12	qi 10863977	10834	28	homólogo LSM2, asociado a ARN pequeño nuclear U6 [Homo sapiens]
13	gi 54695676	22023	28	claudina 11 (proteína transmembrana oligodendroclítica) [Homo sapiens]
14	qi 10938016	21993	28	claudina 11 [Homo sapiens]
15	qi 20372496	12576	28	anti-receptor de acetilcolina región variable de cadena pesada de inmunoglobulina [Homo sapiens]
16	gi 3283415	23363	28	proteína específica de oligodendrocitos [Homo sapiens]
17	qi 609455	14106	28	Esta característica CDS se incluye para mostrar la traducción de la región V correspondiente
18	gi 55957504	26342	27	nueva proteína similar a las semaforinas [Homo sapiens]
19	qi 47077813	59197	27	producto proteico sin nombre [Homo sapiens]
20	gi 57208269	35223	27	fase de lectura abierta 160 del cromosoma 20 [Homo sapiens]

FIGURA 18



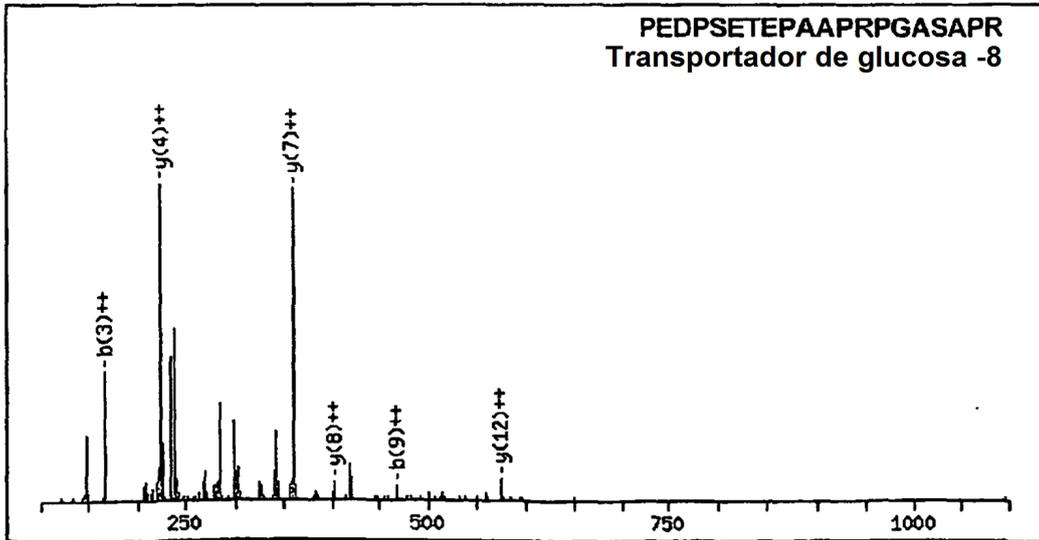
Masa monoisotópica del péptido neutro Mr(calc): 1401,54 Puntuación de iones: 73 Esperada 1,3e+02
Coincidencias (Rojo intenso): iones fragmentados 4/410 usando 12 picos más intensos

FIGURA 19



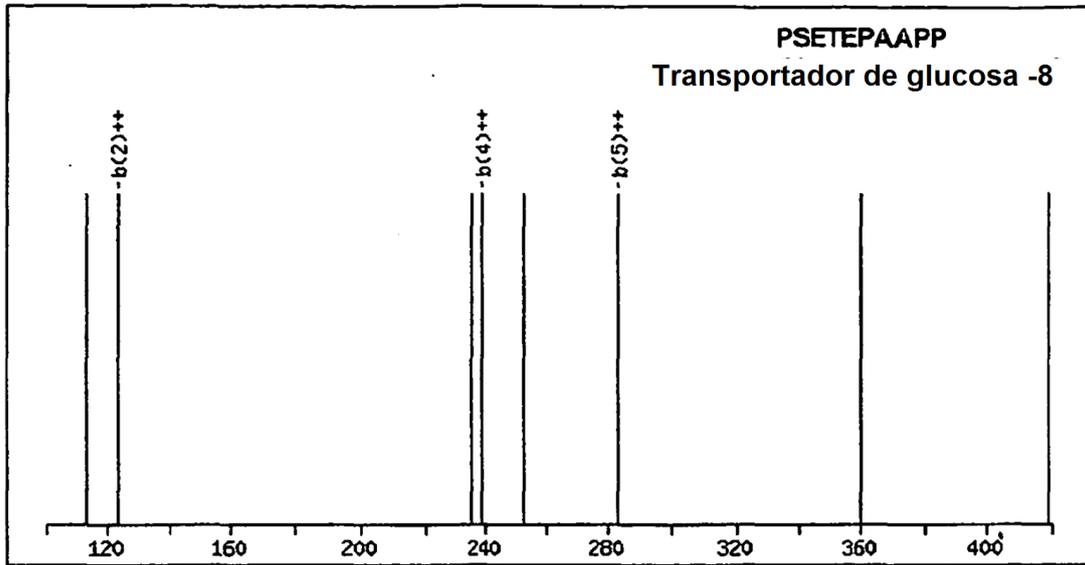
Masa monoisotrópica del péptido neutro Mr(calc): 1070,63 Puntuación de iones: 68
 Esperada: 5,6e+02 Coincidencias (Rojo intenso): iones fragmentados 7/86 usando 36 picos más intensos

FIGURA 20



Masa monoisotrópica del péptido neutro Mr(calc): 1997,9992 Puntuación de iones: 18
 Esperada: 2,6e+02 Coincidencias (Rojo intenso): iones fragmentados 6/172 usando 18 picos más intensos

FIGURA 21



Masa Masa monoisotrópica del péptido neutro Mr(calc): 1176,3547 Modificaciones variables: M3:
 Oxidación (M) Puntuación de iones: 11
 Esperada: 0,64 Coincidencias (Rojo intenso): iones fragmentados 3/100 usando 8 picos más intensos