

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 341**

51 Int. Cl.:

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 31/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.09.2006 E 06790678 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2015 EP 1937815**

54 Título: **Métodos y composiciones para modular la actividad de células tumorales**

30 Prioridad:

13.09.2005 US 716086 P

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

18.08.2015

73 Titular/es:

**NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA
(100.0%)
1200 MONTREAL ROAD
OTTAWA, ON K1A 0R6, CA**

72 Inventor/es:

**O'CONNOR-MCCOURT, MAUREEN D.;
CANTIN, CHRISTIANE y
LENFERINK, ANNE E.G.**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 543 341 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

Métodos y composiciones para modular la actividad de células tumorales

Campo de la invención

5 La invención se refiere a anticuerpos, péptidos y pequeñas moléculas que se unen a clusterina, y a su uso para modular la actividad de células tumorales.

Antecedentes de la invención

10 Los carcinomas, el cáncer humano más habitual, surgen de células epiteliales. La progresión de células epiteliales comienza con la interrupción de los contactos célula-célula, así como con la adquisición de un fenotipo migratorio (similar a mesenquimatoso). Este fenómeno, que se denomina una transición epitelial a mesenquimatosa (EMT), se considera que es un suceso crucial en la progresión tumoral de última etapa y metástasis.

La proteína segregada TGF- β suprime el crecimiento tumoral inicialmente en gran medida debido a su acción inhibidora del crecimiento sobre células tumorales de origen epitelial, y después en etapas posteriores promueve la progresión y metástasis de células tumorales. Un mecanismo mediante el cual TGF- β puede promover la progresión tumoral es a través de la inducción de una EMT.

15 Debido al papel dual que TGF- β desempeña en la carcinogénesis, los inhibidores directos de TGF- β pueden ser arriesgados puesto que, aunque podrían favorecer a tumores de etapa tardía, también podrían acelerar lesiones preneoplásicas. Una sustancia terapéutica mejor sería aquella que inhiba la acción promotora de EMT pro-oncogénica de TGF- β , a la vez que no afecte la acción inhibidora del crecimiento, supresora de tumores, de TGF- β . Para desarrollar tal inhibidor, sería necesario identificar el punto en el que hay una bifurcación de la ruta de señalización de TGF- β , de manera que los mediadores en una ramificación de la ruta participen en la respuesta de EMT, pero no la respuesta inhibidora del crecimiento a TGF- β . Las sustancias terapéuticas que inhiben mediadores que se encuentran exclusivamente en la rama promotora de EMT de la ruta de señalización de TGF- β reducirán la metástasis mientras que tendrán poco o ningún efecto sobre la afectación de lesiones preneoplásicas.

20 No se han identificado generalmente componentes específicos de la ruta de señalización de TGF- β que promuevan o medien la acción promotora de EMT de TGF- β , si bien no están implicados en la acción inhibidora del crecimiento de TGF- β .

Por el contrario, se ha identificado una proteína endógena (el factor nuclear YY1) que es capaz de interferir con (en oposición a promover) la acción de EMT protumorigénica de TGF- β , a la vez que deja intacta la acción supresora de tumores (inhibición del crecimiento) (Kurisaki et al., 2004).

30 Se conocen inhibidores que seleccionan como dianas a ligandos de TGF- β , receptores y las proteínas de señalización Smad. Específicamente, los ectodominios de receptores solubles, los anticuerpos y otras proteínas de unión son capaces de actuar como antagonistas interactuando con ligandos de TGF- β y secuestrándolos de los receptores de la superficie celular. Existen pequeñas moléculas que inhiben la actividad de cinasa del receptor de TGF- β de Tipo I, y también se conocen inhibidores endógenos de las proteínas de señalización Smad. Puesto que todos estos componentes de la ruta de señalización están implicados tanto en las acciones pro- como anti-carcinogénicas de TGF- β , estos inhibidores dirigidas a ellas pueden favorecer tumores de última etapa, sin embargo podrían también acelerar lesiones preneoplásicas.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: TGF- β induce una transición epitelial a mesenquimatosa (EMT) en células JM01

40 (A) Esta transición se caracteriza por una morfología alargada, la relocalización de los marcadores E-cadherina (E-cad), β -catenina (β -Cat) y F-actina, y la disminución del marcador Zona Occludens-1 (ZO-1). (B) Este cambio de morfología va acompañado de un incremento en la movilidad celular, como se muestra en un ensayo de curación de heridas en el que la capacidad de las células para migrar a un área de "rayas" se monitoriza en ausencia o presencia de TGF- β . (C) También se usó un ensayo de movilidad de tinta negra complementario para visualizar y cuantificar la movilidad de células JM01 individuales en ausencia o presencia de TGF- β . La tinta negra que se reviste sobre el plástico se pega a las células que migran, generando de ese modo las huellas blancas. Ambos ensayos muestran que la presencia de TGF- β incrementa la movilidad de las células JM01.

50 Figura 2: Análisis de cambios en la expresión génica inducidos por TGF- β usando tecnología de micromatrices. (A) El análisis exhaustivo de datos de micromatrices obtenidos a partir de 7 puntos de tiempo (0,5, 1, 2, 4, 6, 12, y 24 h) durante la inducción de la EMT de células JM01 mediante TGF- β permitió la identificación de 328 genes que están modulados durante las etapas temprana (0,5, 1 h), central (2, 4, 6 h) o tardía (12, 24 h) de la transición. (B) Solamente 5 de estos genes se ven afectados durante todo el transcurso

de tiempo. (C) Comparando nuestra lista de genes con los datos en los perfiles de expresión génica basales del panel de estirpes celulares NCI-60 (algunas de estas estirpes celulares muestran un fenotipo mesenquimatoso), y con datos de perfiles de expresión procedentes de muestras clínicas, se identificaron 15 genes de nuestra lista que están asociados con un fenotipo de célula tumoral mesenquimatoso y con progresión tumoral clínica.

Figura 3: Validación de la modulación por TGF- β de la expresión génica seleccionada y niveles de proteína. (A) La PCR semicuantitativa confirmó el aumento de clusterina inducido por TGF- β y la disminución de caveolina-1, validando de ese modo el análisis de micromatrices (datos de micromatrices mostrados debajo de los resultados de PCR). (B) El análisis de transferencia Western de lisados de células completas de células JM01 tratadas durante 24 h con TGF- β demostró que estos cambios transcripcionales dan como resultado mayores niveles de proteínas clusterina (p-clu = pre-clusterina; s-clu = clusterina madura segregada) y niveles disminuidos de proteína caveolina-1 (Cav-1). (C) La microscopía inmunofluorescente de células JM01 tratadas durante 24 h con TGF- β confirmó adicionalmente estos cambios en los niveles de las proteínas clusterina y caveolina-1 a través de la visualización de estas proteínas en la célula intacta. Los núcleos están teñidos en azul, caveolina-1 y clusterina están teñidas en verde, y las fibras de F-actina están teñidas en rojo.

Figura 4: Identificación de clusterina segregada como un mediador de la EMT inducida por TGF- β . (A) La microscopía inmunofluorescente indicó que la clusterina está restringida a la ruta secretora en células JM01, y el análisis de transferencia Western de medios acondicionados (CM) indicó que se segrega clusterina (s-clu). (B, C) Se trataron células JM01 durante 24 h con TGF- β , o con CM tomado de células JM01 tratadas con TGF- β , en ausencia o presencia de un anticuerpo provocado contra el término C de la cadena β de clusterina (anti-clu). Usando microscopía inmunofluorescente de ZO-1 como marcador de la EMT, se mostró que el anticuerpo anti-clusterina bloquea la inducción de la EMT tanto por TGF- β como por el CM, indicando que la clusterina segregada es un mediador necesario en la ruta de EMT inducida por TGF- β . También se mostró que la clusterina purificada sola promueve la EMT, indicando que la clusterina no es solo necesaria sino también suficiente para la inducción de EMT (barra blanca: CTL, barra negra: +anti-TGF- β ; barra sombreada: anti-clusterina; barra gris: clusterina purificada). (D) La inducción de la EMT por clusterina sola se confirmó adicionalmente usando análisis de FACS del marcador epitelial E-cadherina para monitorizar la EMT.

Figura 5: La clusterina actúa como un mediador de EMT en estirpes celulares distintas de las células JM01. Se observó que las células tumorales 4T1 (mama) y células tumorales DU 145 (próstata) segregan clusterina y muestran un fenotipo móvil en ausencia de estimulación mediante TGF- β . Usando el ensayo de curación de heridas para monitorizar la movilidad de las células 4T1 y DU145, se observó que un anticuerpo anti-clusterina (anti-clu) inhibe la movilidad de estas células, indicando que la clusterina es importante para el mantenimiento en estas células del fenotipo mesenquimatoso independiente de TGF- β .

Figura 6: La clusterina es un mediador crucial en la ruta que conduce a la inducción de EMT mediante TGF- β , pero no en la ruta que conduce a la inhibición del crecimiento mediante TGF- β . (A) Usando el ensayo de movilidad de la tinta negra para monitorizar la EMT de las células JM01, se confirmó que un anticuerpo anti-clusterina bloquea la EMT inducida por TGF- β , y que la clusterina sola promueve la EMT. (B) Este resultado se confirmó adicionalmente cuantificando el cambio de movilidad como área aclarada en la tinta por célula. (C) Por el contrario, según se monitoriza mediante la incorporación de timidina tritiada, se mostró que el anticuerpo anti-clusterina no bloquea la inhibición del crecimiento inducida por TGF- β , y que la clusterina sola no promueve la inhibición del crecimiento, indicando que la clusterina no es un mediador en las rutas inhibitorias del crecimiento por TGF- β .

Figura 7: La clusterina es un mediador esencial en una ruta promotora de tumores mediante TGF- β , pero no en su ruta supresora de tumores. TGF- β induce secreción de clusterina, y los anticuerpos producidos contra el término C de la cadena β de clusterina bloquean la EMT inducida por TGF- β , pero no la respuesta inhibitoria del crecimiento de las células a TGF- β . Estos resultados indican que la clusterina es un mediador necesario en la ruta de EMT inducida por TGF- β , pero no abordan si otros mediadores inducidos por TGF- β actúan en concierto con clusterina para inducir la EMT; esto es, no abordan la cuestión de si la clusterina sola media una EMT. El hecho de que la clusterina purificada en presencia de TGF- β también promueva una EMT indica que la clusterina es suficiente para inducir esta transición.

Figura 8: Análisis de la actividad neutralizante de anticuerpos policlonales anti-clusterina producidos en BRI. Se confirmó que los sueros recogidos de dos conejos (nº 9 y nº 10) inmunizados con un péptido de clusterina (a.a. 421-437) contienen anticuerpos que interactúan con el péptido usando resonancia de plasmones de superficie (dato no mostrado), y se estudiaron para determinar su capacidad para inhibir la movilidad celular en un ensayo de curación de heridas (dilución 1/25 de suero de conejo). La estirpe celular epitelial mamaria de ratón, 4T1 (parte superior), segrega clusterina y es móvil en ausencia de TGF- β , mientras que la estirpe celular JM01 (parte inferior) requiere estimulación con TGF- β para inducir la producción de clusterina y la movilidad celular. Los sueros tanto del conejo nº 9 como nº 10 inhiben la movilidad, siendo el suero nº 10 más

potente. Como se esperaba, los sueros preinmunes de ambos conejos no afectan a la movilidad. Como control positivo, se muestra un anticuerpo anti-clusterina comercialmente disponible (anti-clu, Santa Cruz).

Figura 9: Análisis de la actividad de los anticuerpos monoclonales anti-clusterina producidos en BRI. (A) Inmunoprecipitaciones de clusterina humana recombinante (500 ng) usando 50 ó 100 ng de cada uno de 12 anticuerpos monoclonales producidos en BRI (como controles positivos, se usaron anticuerpos policlonales (C18) y monoclonales (B5) comerciales). Las muestras se analizaron en un SDS-PAGE reductor al 12%. Se observó que todos los anticuerpos interactúan con clusterina recombinante mediante inmunoprecipitación. (B) Evaluación de la capacidad de los 12 anticuerpos monoclonales producidos en BRI para inhibir la movilidad de células JM01 inducida por TGF- β usando el ensayo de movilidad de tinta negra (como controles positivos se usaron anticuerpos policlonales (C18) y monoclonales (B5) comerciales). La gráfica de barras muestra los valores relativos de la movilidad de células BRI-JM01 tratadas con TGF- β en presencia de los diversos anticuerpos. Cinco anticuerpos monoclonales producidos en BRI (21B12, 20E11, 16C11, 16B5 y 11E2) inhiben la movilidad de las células BRI-JM01 inducida por TGF- β . Los valores se expresan como el aclaramiento/célula/24 h con respecto al de las células (control) tratadas con TGF- β . El * ilustra el valor de corte que se usó cuando se evalúa la capacidad neutralizante. Cuando se usa este valor de corte en el ensayo de movilidad de la tinta negra, hubo una buena concordancia con la evaluación de la capacidad neutralizante de los anticuerpos monoclonales cuando se usa el ensayo de movilidad de curación de heridas (dato no mostrado).

Figura 10: Dos enfoques con sensores de SPR (Biacore) para analizar la relación entre los epítomos de anticuerpos. (A) En el primer enfoque, un anticuerpo anti-Fc de ratón de conejo (RAMFc) se inmovilizó covalentemente sobre la matriz del sensor, y se capturó sobre la superficie un anticuerpo monoclonal (denominado mAb1). Tras unir la clusterina a mAb1, el segundo anticuerpo monoclonal (denominado mAb2) se hizo pasar sobre la superficie. Si los epítomos de los dos anticuerpos solapan, entonces mAb2 no será capaz de unirse a clusterina unida a mAb1. Si los dos anticuerpos tienen epítomos no relacionados, entonces mAb2 será capaz de unirse a clusterina unida a mAb1. (B) En el segundo enfoque, se inmoviliza covalentemente un anticuerpo monoclonal (denominado mAb1) sobre la superficie de la matriz del sensor. La clusterina se incubó entonces con un segundo anticuerpo (monoclonal o policlonal, denominado mAb2) en disolución, y entonces el complejo se hace circular sobre mAb1. Si los epítomos de los dos anticuerpos solapan, entonces la clusterina unida a mAb2 no será capaz de unirse a mAb1.

Figura 11: Resultados de los análisis de la relación de los epítomos de los 5 anticuerpos monoclonales anti-clusterina producidos en BRI neutralizantes de EMT, entre sí y con los epítomos peptídicos de los anticuerpos C18, pAb#10 y B5. Esta tabla resume todos los resultados del cartografiado epitópico obtenidos usando los dos enfoques con biosensores de SPR (Biacore). Un + azul indica que Ab1 compitió con Ab2 por la unión a clusterina en el primer enfoque de Biacore (es decir, la relación de RUs de Ab2 a RUs de clusterina unida fue 0,1 o menos). Un + rojo o \pm indica que Ab2 compitió con Ab1 por la unión a clusterina en el segundo enfoque de Biacore (es decir, la unión de clusterina a Ab1 se inhibió entre 30-100% para +, y entre 10-30% para +/-, cuando se preincubó con Ab2). Es evidente que los cinco anticuerpos monoclonales neutralizantes (21B12, 20E11, 16C11, 16B5 y 11E2) interactúan con los epítomos peptídicos solapantes de pAb#10, pAbC18 y mAb B5, puesto que todos ellos compiten por cada uno de los otros, y por pAb#10, pAbC18 y mAb B5. * Se debería observar que todos los resultados negativos del primer enfoque (- azul) se produjeron cuando se usó Ab 20E11 (ya sea como Ab1 o Ab2), indicando que este Ab no se comportó bien en ese montaje experimental. Por lo tanto, para Ab 20E11, las conclusiones se tomaron principalmente del segundo enfoque experimental.

Fig. 12: Aislamiento de los ADNc de la región variable de Ig. El diagrama de flujo indica las etapas para el aislamiento, secuenciación, análisis de secuencias de las regiones variables del anticuerpo monoclonal.

Fig. 13: Secuencias de aminoácidos de anticuerpos monoclonales

Fig. 14: Alineamiento de CDR1 y CDR2 de VH de Ig de clusterina

Sumario de la invención

Un primer objeto de la invención es identificar un método para inhibir EMT en células tumorales sin inhibir la actividad supresora de tumores de TGF- β .

Un objeto adicional de la invención es identificar moléculas o composiciones que puedan inhibir EMT inducida por TGF- β en células tumorales sin inhibir la actividad supresora de tumores de TGF- β .

Un primer aspecto de la invención proporciona un agente que tiene una afinidad de unión por clusterina, en el que la unión del agente a clusterina inhibe la transición epitelial a mesenquimatosa en células de carcinomas. En particular, el agente se puede unir a la subunidad β de clusterina, y más específicamente, se puede unir a la porción C-terminal de la subunidad β de clusterina. El agente puede ser, por ejemplo, un anticuerpo, incluyendo un anticuerpo monoclonal o policlonal.

Un segundo aspecto de la invención proporciona un método para modular la actividad de células de carcinomas, que comprende las etapas de exponer las células a un agente que tiene una afinidad de unión por clusterina.

5 Un aspecto adicional de la invención proporciona el uso de una secuencia de aminoácidos en la generación de agentes que tienen una afinidad de unión por clusterina, en el que la secuencia comprende SEC ID NO.: 4 o una porción de la misma. En particular, la secuencia puede comprender porciones más cortas de SEC ID NO.: 4, incluyendo SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 2, SEC ID NO.: 3, y SEC ID NO.: 5.

10 Un aspecto adicional de la invención proporciona una vacuna que comprende clusterina o una porción de la misma que está implicada en la transición epitelial a mesenquimatosa en células de carcinomas, y un vehículo farmacéuticamente adecuado. La porción de clusterina puede comprender SEC ID NO.: 4, o una porción de la misma.

Un aspecto adicional de la invención proporciona el uso de una secuencia de aminoácidos en la preparación de una vacuna, en el que la secuencia comprende SEC ID NO.: 4 o una porción de la misma. En particular, la secuencia puede comprender porciones más cortas de SEC ID NO.: 4, incluyendo SEC ID NO.: 1, SEC ID NO.: 2, SEC ID NO.: 3, y SEC ID NO.: 5.

15 Un aspecto adicional de la invención proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una de SEC ID NO.: 1 a SEC ID NO.: 30.

Un aspecto adicional de la invención proporciona el uso de un agente con una afinidad de unión por clusterina como herramienta de diagnóstico, en el que la unión del agente a clusterina inhibe la transición epitelial a mesenquimatosa en células de carcinomas.

20 Descripción detallada de la invención

25 La clusterina se ha identificado como diana potencialmente interesante para estrategias terapéuticas (Cervellera et al., 2000, J Biol Chemistry, vol. 275, nº 28, p. 21055-21060; July et al., 2002, Prostate, vol. 50, nº 3, p. 179-188; Trougakos et al., 2005, Free Radical Biology and Medicine, vol. 38, nº 4, p.436-449), y se han identificado anticuerpos anti-clusterina específicos, por ejemplo por Spagnoli et al. (documento WO 2005080434), o incluso están comercialmente disponibles, por ejemplo por Santa Cruz Biotechnology Inc. desde 1999 - "Clusterin-alpha (C-18): sc-6419".

30 Sin embargo, por primera vez se ha descrito aquí que la clusterina es una diana terapéutica cuya inhibición bloquea EMT sin evitar la acción supresora de tumores antiproliferativa de la TGF- β . La clusterina se identificó en primer lugar como una proteína implicada posiblemente en EMT usando análisis transcriptómico, y después se analizó para identificar sitios de unión potenciales en clusterina. En consecuencia, se crearon péptidos sintéticos, y se produjeron o adquirieron preparaciones de anticuerpos dirigidas contra estos péptidos. Adicionalmente, se aislaron doce anticuerpos monoclonales usando como antígeno clusterina recombinante de longitud completa. Se confirmó que tanto las preparaciones de anticuerpos anti-péptidos como los doce anticuerpos monoclonales se unen a clusterina recombinante. Se mostró que las preparaciones de anticuerpos policlonales anti-péptidos y cinco de los doce anticuerpos monoclonales inhiben EMT. Se mostró que estos cinco anticuerpos monoclonales neutralizantes interactúan con el mismo epítipo peptídico que los anticuerpos anti-péptidos.

35 Usando RT-PCR semicuantitativa, análisis de transferencia Western y análisis de microscopía inmunofluorescente, se confirmó que varios de los cambios transcripcionales asociados a EMT que se detectaron mediante análisis de micromatrices se reflejaron en cambios en el mensaje y la abundancia de proteína (clusterina y caveolina, como se muestra en la Fig. 3). Los anticuerpos anti-péptidos se usaron para demostrar que clusterina es un mediador esencial de la EMT que no está implicado en rutas inhibitorias del crecimiento mediadas por TGF- β (Figs. 4-6). Estos resultados indican que la clusterina es una diana terapéutica accesible cuya inhibición bloquea EMT sin evitar la acción supresora de tumores anti-proliferativa de la TGF- β .

45 El epítipo en la clusterina que es importante para la generación de agentes inhibidores de EMT se elucidó usando preparaciones de anticuerpos anti-péptidos en ensayos de neutralización. Se usaron dos preparaciones de anticuerpos policlonales comerciales diferentes dirigidos contra péptidos sintéticos que corresponden a las secciones del término C de la subunidad β de clusterina. El primer anticuerpo (de RDI Research Diagnostics Inc.) se dirigió contra el péptido sintético que corresponde a los aminoácidos 421-437 de clusterina (**VEVSRKNPKF METVAEK**, SEC ID NO 1) (denominado RDI), y el segundo anticuerpo (de Santa Cruz Biotechnology Inc.) se dirigió contra el péptido sintético que corresponde a los aminoácidos 432-443 de clusterina (**ETVAEKALQ EYR**, SEC ID NO 2) (denominado C-18). También se adquirió un anticuerpo monoclonal anti-péptido (denominado B5) contra el mismo péptido (SEC ID NO 2). A continuación se muestra el solapamiento entre estos dos epítipos. La capacidad de estas preparaciones de anticuerpos para bloquear EMT indica la importancia de la porción C-terminal de la subunidad β de clusterina a la hora de inducir EMT (Fig. 4-6, que muestra los resultados de C-18; se obtienen resultados similares con RDI).

LTQGED QYYLRVTTVA SHTSDSDVPS GVTEVVVKLF DSDPITVTVP VEVSRKNPKF METVAEKALQ EYRKKHREE

Anticuerpo 1

Anticuerpo 2

Predicción de subdominios funcionales putativos en clusterina en base a bioinformática estructural

Generalmente, se piensa que la clusterina es una proteína que está solo parcialmente estructurada, que contiene fragmentos de glóbulos fundidos. Adicionalmente, se ha clasificado como una proteína intrínsecamente desordenada. Se postula que la clusterina contiene varias clases independientes de sitios de unión capaces de interactuar con otras parejas de unión numerosas.

La secuencia de clusterina se ha examinado usando programas de bioinformática, a saber:

- PredictProtein (Rost, 1996).
- GenTHREADER (Jones, 1999).
- COILS (Lupas, 1996).
- PONDR (Li et al., 1999)

El fragmento C-terminal de la subunidad β se identificó como una región de unión putativa. El fragmento (a.a. 375-449, SEC ID NO.: 4), que comienza después de la segunda región de espiral enrollada, está probablemente desplegado pero tiene cierta tendencia a la formación de lámina β .

Se produjo un péptido sintético que corresponde a a.a. 421-437 de clusterina, a fin de generar preparaciones de anticuerpos policlonales en BRI que son similares a la preparación de anticuerpo 1 comercial (RDI) (estas nuevas preparaciones policlonales se denominan pAb#9 y #10). Adicionalmente, clusterina humana de longitud completa se expresó en células 293 y se purificó a fin de usarla como antígeno para generar anticuerpos monoclonales frente a clusterina humana de longitud completa. Se crearon doce anticuerpos monoclonales contra clusterina de longitud completa, y se demostró mediante ELISA que interactúan con clusterina. Estos doce anticuerpos se denominan 6E12, 7B7, 21B12, 20G3, 20E11, 18F4, 16C11, 16B5, 11E2, 8F6, 7D6, 7C12.

Se confirmó que las preparaciones de anticuerpos policlonales creadas contra el epítipo de a.a. 421-437 (pAb#9 y #10) inhiben la EMT (Fig. 8).

Se confirmó que las doce preparaciones de anticuerpos monoclonales creadas contra clusterina humana de longitud completa interactúan con clusterina humana recombinante, según se evidencia por su capacidad para inmunoprecipitar clusterina (Fig. 9A). Se mostró que cinco de los doce anticuerpos monoclonales son capaces de neutralizar la acción promotora de EMT de la clusterina en el ensayo de movilidad celular de tinta negra (Fig. 9B) y en el ensayo de movilidad celular de curación de heridas (no mostrado). Los cinco anticuerpos monoclonales neutralizantes son 11E2, 21B12, 20E11, 16C11, 16B5.

Se usaron dos ensayos de cartografiado epitópico con biosensores a base de resonancia de plasmones de superficie (SPR) (Fig. 10) para determinar si los cinco anticuerpos monoclonales neutralizantes generados usando clusterina de longitud completa interactuaron con el mismo epítipo peptídico de clusterina que las preparaciones de anticuerpos anti-péptidos.

A continuación se describen los dos enfoques que se usaron:

1) Los anticuerpos monoclonales se capturaron individualmente en una superficie de matriz de sensor CM5 en la que se inmovilizó covalentemente un anticuerpo de conejo anti-Fc de ratón (cuando se capturó, el mAb se denominó mAb1 en este enfoque experimental). Entonces se dejó que la clusterina se uniese a mAb1. Entonces se inyectaron secuencialmente los cinco anticuerpos monoclonales sobre clusterina unida a mAb1 (el mAb inyectado se denominó mAb2 en este enfoque experimental), a fin de determinar si tanto mAb1 como mAb2 son capaces de interactuar simultáneamente con clusterina (Fig. 11). Se encontró que los cinco mAbs neutralizantes (excepto 20E11 en algunos casos) compitieron entre sí por la unión a clusterina (cuando se usó tanto mAb1 como mAb2). Adicionalmente, se encontró que compiten con los anticuerpos anti-péptidos C18, pAb#10 y B5, sugiriendo que los cinco mAbs neutralizantes interactúan con los epítopos peptídicos solapantes de pAb#10, pAbC18 y mAb B5. Se debería observar que, aunque parece que Ab 20E11 tiene en algunos casos un epítipo distinto (cuando se usa como mAb1 o como mAb2), esta conclusión no estaba apoyada por los resultados del segundo enfoque experimental.

2) Los anticuerpos monoclonales se inmovilizaron individualmente de forma covalente sobre una superficie de matriz de sensor CM5 usando acoplamiento de aminas (cuando se inmovilizó, el mAb se denominó mAb1 en

este enfoque experimental). Para demostrar la competición por la unión a clusterina, se incubó entonces un Ab (denominado Ab2 en este enfoque) con clusterina antes de la inyección del complejo sobre la superficie de mAb1 (Fig. 11). Se confirmó que los cinco mAbs neutralizantes compitieron entre sí por la unión a clusterina, y con los anticuerpos anti-péptidos C18, pAb#10 y B5. Esto confirma que los cinco mAbs neutralizantes interactúan con los epítomos peptídicos solapantes de pAb#10, pAbC18 y mAb B5.

Se secuenciaron las regiones determinantes de la complementariedad (CDRs) hipervariables de los doce Abs monoclonales. Las Igs de cadena ligera y de cadena pesada de mamífero contienen regiones conservadas adyacentes a las CDRs, y el uso de conjuntos de cebadores oligonucleotídicos apropiadamente diseñados permitió que se amplificasen específicamente las CDRs usando PCR (Fig.12). Estos productos se secuenciaron entonces directamente (SEC ID NO 8-30; véase la Figura 13).

Alineando las secuencias de las CDR de cuatro de los cinco anticuerpos monoclonales neutralizantes (11E2, 21B12, 20E11, 16C11), fue posible determinar una secuencia de consenso para CDR1 y CDR2 de VH de estos anticuerpos anti-clusterina (véase la Figura 14). Se determinaron las siguientes secuencias de consenso: CDR-1: G-Y-S/T-F-T-X-Y-X (SEC ID NO.: 6) y CDR-2: I-N/D-P/T-Y/E-X-G-X-P/T (SEC ID NO.: 7).

Los anticuerpos o péptidos que interactúan con el epítomo de clusterina definido aquí se pueden aplicar como agentes terapéuticos, es decir, pueden actuar como una sustancia terapéutica por derecho propio debido a su capacidad intrínseca para neutralizar la actividad promotora de EMT de clusterina. Adicionalmente, estos anticuerpos y péptidos se pueden usar como una sustancia terapéutica debido a su capacidad para dirigir toxinas, genes suicidas u otros agentes con actividad antitumoral a la vecindad de células tumorales a través de su interacción con clusterina segregada.

Las pequeñas moléculas que interactúan con el epítomo de clusterina definido aquí también pueden actuar como sustancias terapéuticas bloqueando la actividad promotora de EMT de la clusterina. Estos anticuerpos, péptidos y pequeñas moléculas que ejercen su actividad terapéutica interactuando con este epítomo de clusterina pueden mostrar menos toxicidad o efectos secundarios en comparación con otros agentes que eliminan todas las actividades de clusterina, es decir, agentes antisentido o RNAi, puesto que, aunque la actividad de EMT de clusterina se neutraliza cuando se bloquea este epítomo, las otras actividades de la clusterina siguen intactas.

Otras aplicaciones de los anticuerpos y péptidos que interactúan con el epítomo de clusterina definido aquí pueden ser como 1) sustancias de diagnóstico no formadoras de imagen, es decir, pueden detectar clusterina como un biomarcador en fluidos corporales accesibles o en muestras de tejidos/tumores para aplicaciones de diagnóstico y de pronóstico en cáncer, y 2) sustancias de diagnóstico formadoras de imagen, es decir, se pueden usar para dirigir agentes de contraste hacia tumores para la formación de imágenes in vivo debido a su interacción con clusterina segregada.

Se espera que los anticuerpos que comprenden las secuencias pesada y ligera identificados aquí, los anticuerpos que comprenden las CDRs (regiones determinantes de la complementariedad) identificados aquí (Figura 13) y los anticuerpos que comprenden las secuencias de consenso (Figura 14) sean útiles para los fines mencionados anteriormente.

La propia clusterina, o sus porciones que contienen el epítomo reconocido por los anticuerpos y péptidos explicados anteriormente, se puede usar como una vacuna. Preferiblemente, la clusterina se debería de combinar con un vehículo adecuado. La clusterina o porciones de clusterina que contienen el epítomo también se pueden usar en la generación de vacunas. De forma similar, también serán útiles las secuencia de aminoácidos que tienen al menos 90% de identidad con SEC ID NO. 4 o el epítomo de clusterina identificado aquí, puesto que probablemente tengan funcionalidad similar a las secuencias específicas identificadas aquí.

Cultivo celular, anticuerpos y reactivos

Las células BRI-JM01 se aislaron y caracterizaron como se describió (Lenferink et al., Breast Cancer Res., 6, R514-30 (2004)). Las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂, y se cultivaron en DF/5% de FBS (mezcla 1:1 de F12 de Ham y Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) con 5% de suero fetal bovino (FBS) y antibióticos/antimicóticos (ambos de Wisent Inc.)).

TGF-β1 recombinante humana y anticuerpo neutralizante de TGF-β pan-específico 1D11 se reconstituyeron según las instrucciones del fabricante (R&D Systems). La clusterina de suero humano purificada fue proporcionada amablemente por Dr MR Wilson (Wilson y Easterbrook-Smith, 1992). La clusterina recombinante humana purificada se produjo en células HEK-293 (sistema de expresión general descrito en Durocher et al, 2002). Los anticuerpos contra las siguientes proteínas se adquirieron y se usaron en las diluciones v/v indicadas: E-cadherina (E-cad, clon anti-uvomorulina Decma-1; Sigma), Zona Occludens-1 (ZO-1; Chemicon), anticuerpos policlonales creados contra el término C de la cadena β de clusterina humana (cluβ; RDI y Santa Cruz), y caveolina-1 (cav-1; Santa Cruz). Los anticuerpos conjugados a peroxidasa de rábano picante (HRP) se obtuvieron de Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., y los anticuerpos marcados con Alexa-488 y la faloidina marcada con Rojo Texas se adquirieron de Molecular Probes. Todos los experimentos se llevaron a cabo con monocapas 75-80% confluentes de células

BRI-JM01 en DF/5%. Cuando se indicó, las células se trataron durante 24 h o 48 h con TGF- β 1 o clusterina purificada a una concentración final de 100 pM o 200 nM, respectivamente.

Aislamiento y marcaje de ARN

5 Monocapas de células BRI-JM01 se hicieron crecer en ausencia o presencia de TGF- β 1 durante 30 min., 1, 2, 4, 6, 12 ó 24 h. ARNm poliA+ se extrajo (4 x cápsulas de 150 mm por punto de tiempo) usando el kit FastTrack™ 2.0 (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. El ARN se aisló y se marcó según Schade et al., 2004.

Hibridación y análisis de datos

10 Las micromatrices de ADNc (15.264 ESTs de ratón de secuencias verificadas; NIA 15K Mouse cDNA Clone Set of the National Institute of Aging, National Institutes of Health, USA, <http://lgsun.grc.nia.nih.gov/cDNA/15k.html>) se obtuvieron de la University Health Network Microarray Center en Toronto, Ontario Canadá (<http://www.microarrays.ca/>). Los portaobjetos se hibridaron con ADNc marcado con Cy3 o Cy5 como se describió (Enjalbert et al., 2003), se escanearon usando un ScanArray 5000 (Perkin Elmer v2.11) a una resolución de 10 micrómetros, y los archivos TIFF de 16 bits se cuantificaron usando software QuantArray (Perkin Elmer, v3.0). La normalización y análisis de los datos de micromatrices se llevaron a cabo como se describió (Enjalbert et al., 2003).

15 Análisis de transferencia northern y de RT-PCR semicuantitativa (SQ-RT-PCR)

20 Para SQ-RT-PCR, se amplificaron 3-5 μ g de ARN total en una reacción de RT-PCR de primera hebra de 20 μ l usando 50 U de SuperScript II (Invitrogen) según las directrices del fabricante con modificaciones. Las muestras se preincubaron (2 min., 42°C) antes de añadir SuperScript II, y se omitió el tratamiento de RNaseOUT. Las muestras se incubaron (90 min., 42°C) y después se enfriaron en hielo. Se añadieron dos μ l de reacción de primera hebra a la mezcla de PCR (2,5 U de Taq polimerasa (New England Biolabs), 10 μ M de cebadores directos/inversos) en un volumen final de 50 μ l, que se calentó (2 min., 94°C) antes de la amplificación mediante PCR. En la Tabla 1 se dan los cebadores para la generación de las sondas usadas para transferencia northern y SQ-RT-PCR.

Análisis de transferencia western

25 Células BRI-JM01 que crecieron en cápsulas de 35 mm se trataron con TGF- β 1 (24 h). Las células se lisaron en SDS al 2% caliente. Cincuenta μ g de proteína total o 30 μ l de medio acondicionado se resolvió mediante SDS-PAGE (10%), en condiciones reductoras. Las proteínas se transfirieron a nitrocelulosa, y las membranas se incubaron con anticuerpos primarios (clu β , cav-1; 1/500) en TBS-T (Tris-HCl 20 mM (pH 7,6), NaCl 137 mM, Tween 20 al 0,1% (v/v)) que contiene 5% de leche desnatada (toda la noche, 4°C). Las membranas se lavaron con TBS-T, se incubaron con anticuerpo secundario conjugado con HRP (1/20.000) en TBS-T + 5% de leche (1 h), y se lavaron con TBS-T. Las bandas inmunorreactivas se visualizaron usando quimioluminiscencia mejorada (ECL; Perkin Elmer).

30

Microscopía de inmunofluorescencia

35 Células BRI-JM01 se sembraron en portaobjetos de cámaras de vidrio (Lab-Tek) y se trataron con clusterina purificada o TGF- β 1 preincubada (30 min.) con o sin anticuerpo anti-clu β (8 μ g/ml) o 1D11 (100 nM). El medio acondicionado, obtenido de células BRI-JM01 no tratadas y tratadas con TGF- β 1 (24 h), se preincubó (30 min.) con estos anticuerpos antes de la incubación con células BRI-JM01 no tratadas. Tras 24 h de exposición, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% (10 min.), se enjuagaron dos veces (PBS), se permeabilizaron (2 min., Triton X-100 al 0,2% en PBS), se enjuagaron nuevamente, y los sitios no específicos se bloquearon con FBS al 10% en PBS (40 min.). Las células fijadas con paraformaldehído se incubaron entonces (1 h) con anticuerpo primario (E-cad, 1/200; ZO-1, 1/100; clu β , cav-1; 1/50) en PBS/FBS al 10%, se enjuagaron (4 x en PBS), y finalmente se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados fluorescentemente (Molecular Probes). Simultáneamente, filamentos de F-actina se marcaron con faloidina marcada con Rojo Texas (1/100), y los núcleos se contratiñeron con 0,4 μ g/ml de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Sigma). Los portaobjetos se enjuagaron (PBS) y se montaron usando Prolong anti-fade (Molecular Probes). Las imágenes fluorescentes se capturaron usando una cámara digital con CCD Coolsnap de Princeton Instrument montada en un microscopio Leitz Aristoplan, y se analizaron usando el software Eclipse (Empix Imaging Inc.) y Photoshop (Adobe).

40

45

Ensayos de proliferación celular

50 Células BRI-JM01 (2,5 x 10⁴ células/pocillo) se sembraron en placas de 24 pocillos. Al día siguiente, el medio se repuso y se añadió a las células clusterina purificada, TGF- β 1, o TGF- β 1 preincubada durante 30 min. con anticuerpo 1D11 (100 nM) o anticuerpo anti-clu β (8 μ g/ml). Después de 24 h, las células se marcaron mediante pulsos con 0,5 μ Ci/ml de [³H]timidina (Amersham), se enjuagaron (PBS, 4°C), se tripsinizaron, y la incorporación de [³H]timidina se evaluó mediante recuento por centelleo líquido.

Ensayos de movilidad celular

Se sembraron células (2 x 10⁴ células/pocillo) en placas de 12 pocillos revestidas con tinta según Al-Moustafa et al.

(1999), en ausencia o presencia de TGF- β 1, TGF- β 1+anticuerpo anti-clu β , o clusterina purificada. Las imágenes se capturaron después de 24 h usando una cámara digital Nikon Coolpix 995 montada en un microscopio Leitz Aristoplan, y las huellas libres de partículas se cuantificaron usando el software gratuito ImageJ (National Institute for Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

5 Ensayo de movilidad de tinta negra

Se sembraron células (2×10^4 células/pocillo) en placas de 12 pocillos revestidas con tinta según Al-Moustafa et al. (1999), en ausencia o presencia de TGF- β 1, TGF- β 1+anticuerpo anti-clu β , o clusterina purificada. Las imágenes se capturaron después de 24 h usando una cámara digital Nikon Coolpix 995 montada en un microscopio Leitz Aristoplan, y las huellas libres de partículas se cuantificaron usando el software gratuito ImageJ (National Institute for Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

10

Ensayo de movilidad de curación de heridas

Monocapas de células confluentes (placas de 12 pocillos) se "hirieron" usando una punta de pipeta de 2 μ l. El medio se repuso entonces, para eliminar el desecho celular, y se añadieron los mAbs anti-clusterina (concentración final de 4 μ g/ml) en ausencia o presencia de TGF- β 100 pM. Las imágenes de la herida se capturaron antes y después de 24 h de incubación usando una cámara digital Nikon Coolpix 995 montada en un microscopio Leitz Aristoplan.

15

Producción de anticuerpos policlonales

El péptido (a.a. 421-437 de la proteína clusterina) se produjo y purificó en la Universidad de Calgary (Integrated Peptide Services, Facultad de Medicina, Universidad de Calgary, Calgary, Alberta, Canadá, <http://peplab.myweb.med.ucalgary.ca/>). Se añadió una cisteína extra al término C del péptido para facilitar el acoplamiento orientado en la superficie de las matrices del sensor CM-5 que se usaron para la identificación de los antisueros de conejo mediante resonancia de plasmones de superficie (SPR, Biacore™ 2000). El péptido se acopló a hemocianina de lapa californiana (KLH, Imject Mariculture KLH; Pierce) usando glutaraldehído (Sigma) o 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida HCl (Pierce), y se dializó frente a PBS (toda la noche a 4°C). Las preparaciones del péptido que se conjugaron mediante los dos métodos se mezclaron (1:1). El suero preinmune se extrajo de dos conejos blancos de Nueva Zelanda hembras (10 ml), que entonces se inyectaron con la preparación de péptido acoplado a KLH (1,25 μ g de péptido por pata/0,5 ml de adyuvante incompleto de Freund o PBS). Los animales se estimularon (1,25 μ g de péptido por pata/0,5 ml de adyuvante incompleto de Freund o PBS) cada tres semanas, y el suero se extrajo (6 ml/kg) cada 10 días después de cada estimulación hasta que el título del anticuerpo no aumentó, en cuyo momento los animales se eutanasiaron y se desangraron.

20

25

30 Los sueros se ensayaron para determinar la actividad de los anticuerpos usando SPR. Para esto, el péptido se acopló a una matriz de sensor CM-5 (Biacore Inc.) usando el método de acoplamiento de tiol (como se describe por el fabricante), y se hicieron pasar sobre la superficie del péptido diluciones (1/50) de los sueros preinmunes, los sueros que contienen anticuerpos, y el anticuerpo anti-clusterina comercialmente disponible (Santa Cruz).

Producción de anticuerpos monoclonales

35 Cuatro ratones BALB/c se inyectaron subcutáneamente (s.c.) e intraperitonealmente (i.p.) con 35 μ g de clusterina humana purificada emulsionada en adyuvante TiterMax (Pierce). Los animales se volvieron a inyectar i.p. tres semanas más tarde, y el título del suero se evaluó 10 días más tarde. Diez semanas más tarde, los ratones respondedores se estimularon nuevamente mediante inyecciones i.p. (50 μ g de clusterina purificada), y se sacrificaron tres días más tarde. Se recogieron las células del bazo, se fusionaron con células de mieloma NS0, y se colocaron inmediatamente en placas (5×10^4 células/pocillo en microplacas de 96 pocillos; Costar) en medio de Iscove suplementado con FBS al 20%, hipoxantina 100 μ M, aminopterina 0,4 μ M y timidina 16 μ M (medio HAT), IL-6 murina (1 ng/ml), penicilina (50 U/ml) y estreptomina (50 μ g/ml). Los sobrenadantes (10-20 días después de la fusión) se ensayaron para determinar la actividad anti-clusterina en clusterina purificada inmovilizada mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Las células productoras de anticuerpo se clonaron y se volvieron a ensayar dos veces para determinar la actividad anti-clusterina. Se generaron trece clones productores de anticuerpo anti-clusterina, de los cuales se prepararon lotes congelados y se inició una producción de anticuerpo a gran escala.

40

45

Cartografiado epitópico mediante biosensor a base de SPR (Biacore)

Enfoque 1:

- 50
- Tampón de pasada:
 - HBS (Hepes 20 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, EDTA 3,4 mM, Tween 20 al 0,005%)
 - Todos los experimentos se realizaron a 5 μ l/min.
 - Acoplamiento amínico estándar de la inmunoglobulina anti-Fc de ratón:

- Inyéctense 35 μ l de una mezcla de NHS 0,05 M y EDC 0,2 M
 - Inyéctense anticuerpos diluidos en NaAc 10 mM pH 5,0 a concentración de 30 μ g/ml hasta que se captura una cantidad apropiada
 - Inyéctense 35 μ l de etanolamina-HCl 1 M pH 8,5
- 5
- Cartografiado epitópico:
 - Inyéctense 25 μ l de mAb1 a una concentración de 25 ó 50 μ g/ml.
 - Inyéctense 25 μ l de una mezcla de IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, cada uno a una concentración de 25 μ g/ml.
 - Inyéctense 25 μ l de clusterina recombinante humana, a una concentración de 30 μ g/ml.
 - Inyéctense 25 μ l de mAb2, a una concentración de 25 ó 50 μ g/ml.
- 10
- Control:
 - Para cada par de anticuerpos, la unión no específica de mab2 se determinó repitiendo todas las inyecciones descritas en la sección del cartografiado epitópico, pero inyectando tampón de pasada en lugar de clusterina.
 - La respuesta (RU) obtenida 20 s después del final de la inyección de mab2 en el control se restó de la respuesta obtenida en presencia de clusterina.
- 15
- Regeneración de la superficie:
 - Al final de cada ciclo, inyéctense 10 μ l de glicina 20 mM pH 1,7, seguido de 10 μ l de HCl 100 mM.

Enfoque 2:

- Tampón de pasada:
 - HBS (Hepes 20 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, EDTA 3,4 mM, Tween 20 al 0,005%)
- 20
- Acoplamiento amínico estándar de los anticuerpos:
 - Inyéctense 35 μ l de una mezcla de NHS 0,05 M y EDC 0,2 M
 - Inyéctense anticuerpos diluidos en NaAc 10 mM (pH 4,5 ó 5,0 a una concentración que oscila desde 20 hasta 80 μ g/ml hasta que se captura una cantidad apropiada
 - Inyéctense 35 μ l de etanolamina-HCl 1 M pH 8,5
- 25
- Preparación de la superficie de control:
 - Inyéctense 35 μ l de una mezcla de NHS 0,05 M y EDC 0,2 M
 - Inyéctense 35 μ l de etanolamina-HCl 1 M pH 8,5
 - Competición:
 - Mézclese clusterina recombinante humana a 50 nM con anticuerpos 250 nM o 500 nM en PBS (sin Mg⁺⁺ y Ca⁺⁺)
- 30
- Prepárese un tubo con anticuerpo solo
 - Inyéctense, a un caudal de 5 μ l/min., 25 μ l de clusterina sola, anticuerpo solo, o clusterina preincubada con anticuerpos, sobre las superficies del anticuerpo y del control.
- 35
- Réstese la respuesta obtenida para la disolución de anticuerpo solo de la respuesta obtenida para clusterina preincubada con el mismo anticuerpo.
 - Calcúlese el % de inhibición de la unión dividiendo la respuesta obtenida para la clusterina preincubada con anticuerpo entre la respuesta obtenida para la clusterina sola.
 - Disolución de regeneración:
 - Al final de cada ciclo, inyéctense 10 μ l de HCl 10 mM a un caudal de 20 μ l/min.

Inmunoprecipitación

5 Se incubaron 50 ó 100 ng de los diversos anticuerpos monoclonales o de la preparación de anticuerpo policlonal (C18) con 20 µl de proteína G (1:1 en PBS) toda la noche a 4°C. Después, se añadieron 500 ng de clusterina recombinante humana, y la muestra se incubó durante otras 2 h a 4°C. Los inmunocomplejos se lavaron 3 veces con 1 ml de tampón (NaCl 150 mM, Tris 50 mM pH 8,0, NP-40 al 0,55%, fluoruro de sodio 50 mM), y se añadieron 20 µl de tampón de muestra reductor. Las muestras se hirvieron durante 5 min. antes de cargarlas en un SDS-PAGE al 12%. Las proteínas separadas se transfirieron entonces a nitrocelulosa, y las membranas se sondaron con anticuerpos anti-clusterina como se describió.

Secuenciación de la región variable del anticuerpo monoclonal

10 Se aisló ARN total a partir de los 12 hibridomas, y se preparó ADNc de primera hebra con transcriptasa inversa y el cebador de la región constante de Ig-3, seguido de la amplificación con el cebador de Ig-5' apropiado. Los conjuntos de cebadores usados conjuntamente con KOD Hot Start DNA Polymerase amplifican específicamente las regiones variables de los ADNc de cadena ligera y pesada. Los productos de la PCR se pueden clonar directamente con el kit de clonación de Novagen pSTBlue-1 Perfectly Blunt™, o se trataron con el Single dA™ Tailing Kit y se clonaron en el vector pSTBlue-1 AccepTor™. Para detalles, véase la Figura 13.

15

Tabla 1: Conjuntos de cebadores usados para la validación de algunos de los 328 genes modulados por TGF-β en las células BRI-JM01

Gen	Nº de GeneBank	Inverso	Directo	tamaño (pb)
Eef1a1	AW556381	CTGGCTTCACTGCTCAGGT	TGGCCAATTGAGACAAACAG	457
Clusterina	AU041878	TGGTGAAAGCTGTTTGACTCTG	AAGGCGGCTTTTATTGGATT	355
Integrina α6	AW556992	ATGTGCCATTGTTGCTTTGA	CAAGCGATGAGCACTTTTGT	517
Caveolina-1	AU016590	GTGCAGGAAGGAGAGAATGG	GCACACCAAGGAGATTGACC	247
Ptpn13	AW548343	CCTGCAATGGTTCTTGTTTT	GGGAAAATCGATGTTGGAGA	300
14-3-3σ	AA410123	GGGCTGTTGGCTATCTCGTA	AGAGACCGAGCTCAGAGGTG	297

La inclusión de una referencia no es ni una admisión ni una sugerencia de que es relevante para la patentabilidad de lo descrito aquí

Bailey et al., *Biochemistry*. 2001; 40:11828-40

20 Dunker et al., *J Mol Graph Model*. 2001; 19 (1):26-59

Li et al., *Genome Inform. Ser. Workshop Genome Inform.* 1999; 10: 30-

Jones, J. *Mol. Biol.* 1999; 287: 797-815

Lupas, *Meth. in Enzym.* 1996; 266: 513-525

Rost, *Meth. in Enzym.* 1996; 266: 525-539

25 Singh et al., *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2004: 437-445

Al-Moustafa et al., *Biotechniques*, 1999: 60-62

Durocher et al., *Nucleic Acids Res* 2002: E9

Enjalbert et al., *Mol Biol Cell*. 2003: 1460-1467

Schade et al., *Mol Biol Cell* 2004: 5492-5502

30 Wilson y Easterbrook-Smith, *Biochim Biophys Acta* 1992: 319-326

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo que se une específicamente a un sitio entre los aminoácidos 421 a 443 de una porción C-terminal de una subunidad β de clusterina humana para uso en el tratamiento de cáncer mediante la modulación de la actividad de células de carcinoma, que comprende inhibir transiciones epiteliales a mesenquimatosas en las células de carcinoma.
2. El anticuerpo para el uso según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es monoclonal o policlonal.
3. El anticuerpo para el uso según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo tiene una secuencia de aminoácidos que comprende SEC ID NO.:6.
- 10 4. El anticuerpo para el uso según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácidos que comprende una o más de SEC ID NO.:8, SEC ID NO.:9, SEC ID NO.:10, SEC ID NO.:11, SEC ID NO.:12, SEC ID NO.:20, SEC ID NO.:21, SEC ID NO.:22, SEC ID-NO.:23 o SEC ID NO.:24.
- 15 5. El anticuerpo para el uso según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácidos que corresponde a una o más regiones determinantes de la complementariedad de SEC ID NO.:8, SEC ID NO.:9, SEC ID NO.:10, SEC ID NO.:11, SEC ID NO.:12, SEC ID NO.:20, SEC ID NO.:21, SEC ID NO.:22, SEC ID NO.:23 o SEC ID NO.:24.
- 20 6. Un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a clusterina y que comprende una combinación seleccionada de:
 - a. Una región variable de cadena ligera como se define en SEC ID NO.:8 o SEC ID NO.:9, y una región variable de cadena pesada como se define en SEC ID NO.:20;
 - b. Una región variable de cadena ligera como se define en SEC ID NO.:10, y una región variable de cadena pesada como se define en SEC ID NO.:21;
 - c. Una región variable de cadena ligera como se define en SEC ID NO.:11, y una región variable de cadena pesada como se define en SEC ID NO.:22;
 - 25 d. Una región variable de cadena ligera como se define en SEC ID NO.:12, y una región variable de cadena pesada como se define en SEC ID NO.:23;
 - e. Una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de SEC ID NO.:8 o SEC ID NO.:9, y una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de SEC ID NO.:20;
 - 30 f. Una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de SEC ID NO.:10, y una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de SEC ID NO.:21;
 - g. Una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de SEC ID NO.:11, y una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de SEC ID NO.:22;
 - 35 h. Una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de SEC ID NO.:12, y una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de SEC ID NO.:23;
 - 40 i. Una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de SEC ID NO.:8 o SEC ID NO.:9, y una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 seleccionada del grupo que consiste en GYSFTGYN, GYTFTDYS, y GYTFTNYG, una CDR2 seleccionada del grupo que consiste en IDPYYGTP, INTETGEP, INTYTGEP, IDPYNGDT y una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos ALNSLLRLNAMDY;
 - 45 j. Una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de SEC ID NO.:10, y una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 seleccionada del grupo que consiste en GYSFTGYN, GYTFTDYS, y GYTFTNYG, una CDR2 seleccionada del grupo que consiste en IDPYYGTP, INTETGEP, INTYTGEP y una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos ARTGSSGYFDC; o
 - 50 k. Una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de SEC ID NO.:11, y una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 seleccionada del grupo que consiste en GYSFTGYN, GYTFTDYS, y GYTFTNYG, una CDR2 seleccionada del grupo que consiste en IDPYYGTP, INTETGEP, INTYTGEP y una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos

ARDGFLYFFDY.

7. El anticuerpo monoclonal de la reivindicación 6, en el que la unión del anticuerpo a clusterina inhibe la transición epitelial a mesenquimatososa en células de carcinoma.
- 5 8. Una vacuna para tratar carcinomas, que comprende la inhibición de la transición epitelial a mesenquimatososa, que comprende un vehículo farmacéuticamente adecuado y un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en SEC ID NO.:4 o una porción de SEC ID NO.:4 que comprende SEC ID NO.:1, SEC ID NO.:2 o los aminoácidos 431 a 443 de una porción C-terminal de una subunidad β de clusterina humana, acoplado a una proteína portadora.
- 10 9. La vacuna según la reivindicación 8, en la que la secuencia de aminoácidos consiste en SEC ID NO.:1, SEC ID NO.:2, o los aminoácidos 421 a 443 de una porción C-terminal de una subunidad β de clusterina humana.
- 15 10. Uso de un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que consiste en o que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con SEC ID NO.:1, SEC ID NO.:2, SEC ID NO.:4, o una porción de SEC ID NO.:4 que comprende SEC ID NO.:1, SEC ID NO.:2 o aminoácidos 421 a 443 de una porción C-terminal de una subunidad β de clusterina humana, para preparar una vacuna para inhibir transiciones epiteliales a mesenquimatosas en células de carcinoma para tratar carcinoma, en el que dicho péptido está acoplado a una proteína portadora.
11. El uso según la reivindicación 10, en el que la secuencia de aminoácidos consiste en SEC ID NO.:4, SEC ID NO.:1, SEC ID NO.:2, o aminoácidos 421 a 443 de una porción C-terminal de una subunidad β de clusterina humana.
- 20 12. Una molécula de ácido nucleico que codifica un aminoácido que consiste en SEC ID NO.:1, SEC ID NO.:2, SEC ID NO.:4, o los aminoácidos 421-443 de una porción C-terminal de una subunidad β de clusterina humana, para tratar carcinomas, que comprenden la inhibición de la transición epitelial a mesenquimatososa.
13. Una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno que se une específicamente a clusterina y que comprende una combinación seleccionada de:
- 25 a. Una región variable de cadena ligera como se define en SEC ID NO.:8 o SEC ID NO.:9, y una región variable de cadena pesada como se define en SEC ID NO.:20;
- b. Una región variable de cadena ligera como se define en SEC ID NO.:10, y una región variable de cadena pesada como se define en SEC ID NO.:21;
- c. Una región variable de cadena ligera como se define en SEC ID NO.:11, y una región variable de cadena pesada como se define en SEC ID NO.:22;
- 30 d. Una región variable de cadena ligera como se define en SEC ID NO.:12, y una región variable de cadena pesada como se define en SEC ID NO.:23;
- e. Una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de SEC ID NO.:8 o SEC ID NO.:9, y una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de SEC ID NO.:20;
- 35 f. Una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de SEC ID NO.:10, y una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de SEC ID NO.:21;
- g. Una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de SEC ID NO.:11, y una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de SEC ID NO.:22;
- 40 h. Una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de SEC ID NO.:12, y una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de SEC ID NO.:23;
- i. Una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de SEC ID NO.:8 o SEC ID NO.:9, y una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 seleccionada del grupo que consiste en GYSFTGYN, GYTFTDYS, y GYTFTNYG, una CDR2 seleccionada del grupo que consiste en IDPYYGTP, INTETGEP, INTYTGEP y una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos ALNSLLRLNAMDY;
- 45 j. Una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de SEC ID NO.:10, y una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 seleccionada del grupo que consiste en GYSFTGYN, GYTFTDYS, y GYTFTNYG, una CDR2 seleccionada del grupo que consiste en IDPYYGTP, INTETGEP, INTYTGEP y una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos
- 50

ARTGSSGYFDC; o

- 5 k. Una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de SEC ID NO.:11, y una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 seleccionada del grupo que consiste en GYSFTGYN, GYTFTDYS, y GYTFTNYG, una CDR2 seleccionada del grupo que consiste en IDPYYGTP, INTETGEP, INTYTGEP y una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos ARDGFLYFFDY.
14. El anticuerpo para uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el anticuerpo comprende una combinación seleccionada del grupo que consiste en:
- 10 a. Una región variable de cadena ligera como se define en SEC ID NO.:8 o SEC ID NO.:9, y una región variable de cadena pesada como se define en SEC ID NO.:20;
- b. Una región variable de cadena ligera como se define en SEC ID NO.:10, y una región variable de cadena pesada como se define en SEC ID NO.:21;
- c. Una región variable de cadena ligera como se define en SEC ID NO.:11, y una región variable de cadena pesada como se define en SEC ID NO.:22;
- 15 d. Una región variable de cadena ligera como se define en SEC ID NO.:12, y una región variable de cadena pesada como se define en SEC ID NO.:23;
- e. Una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de SEC ID NO.:8 o SEC ID NO.:9, y una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de SEC ID NO.:20;
- 20 f. Una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de SEC ID NO.:10, y una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de SEC ID NO.:21;
- 25 g. Una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de SEC ID NO.:11, y una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de SEC ID NO.:22;
- h. Una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de SEC ID NO.:12, y una región variable de cadena pesada que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de SEC ID NO.:23;
- 30 i. Una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de SEC ID NO.:8 o SEC ID NO.:9, y una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 seleccionada del grupo que consiste en GYSFTGYN, GYTFTDYS, y GYTFTNYG, una CDR2 seleccionada del grupo que consiste en IDPYYGTP, INTETGEP, INTYTGEP y una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos ALNSLLRLNAMDY;
- 35 j. Una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de SEC ID NO.:10, y una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 seleccionada del grupo que consiste en GYSFTGYN, GYTFTDYS, y GYTFTNYG, una CDR2 seleccionada del grupo que consiste en IDPYYGTP, INTETGEP, INTYTGEP y una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos ARTGSSGYFDC; o
- 40 k. Una región variable de cadena ligera que comprende tres regiones determinantes de la complementariedad de SEC ID NO.:11, y una región variable de cadena pesada que comprende una CDR1 seleccionada del grupo que consiste en GYSFTGYN, GYTFTDYS, y GYTFTNYG, una CDR2 seleccionada del grupo que consiste en IDPYYGTP, INTETGEP, INTYTGEP y una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos ARDGFLYFFDY.
- 45 15. El anticuerpo 21B12, en el que el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera como se define en SEC ID NO.:11, y una región variable de cadena pesada como se define en SEC ID NO.:22.
16. El anticuerpo 16B5, en el que el anticuerpo comprende una región variable de cadena ligera como se define en SEC ID NO.:12, y una región variable de cadena pesada como se define en SEC ID NO.:23.
17. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 6, 7, 15 ó 16, para uso en el tratamiento de carcinoma, con lo que dicho anticuerpo inhibe transiciones epiteliales a mesenquimatosas en células de carcinoma, uniéndose específicamente el anticuerpo a un sitio entre los aminoácidos 421 y 443 de una porción C-terminal de una subunidad β de clusterina humana.
- 50 18. Una composición que comprende el anticuerpo para uso según las reivindicaciones 1 a 5, o 17, y un diluyente

farmacéuticamente adecuado.

19. La composición según la reivindicación 18, que comprende el anticuerpo para uso, en la que el anticuerpo se usa para dirigir agentes que tienen actividad antitumoral hacia células tumorales.

20. Una célula aislada que expresa el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 6, 7, 15 ó 16.

5 21. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10, 11, o 14 a 16, en el que las células de carcinoma son células de carcinoma de mama o células de carcinoma de próstata.

22. El anticuerpo para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o 17, en el que las células de carcinoma son células de carcinoma de mama o células de carcinoma de próstata.

10 23. Uso de un anticuerpo, que se une específicamente a un sitio entre los aminoácidos 421 y 443 de una porción C-terminal de una subunidad β de clusterina humana, para detectar transición epitelial a mesenquimatoso en células de carcinoma.

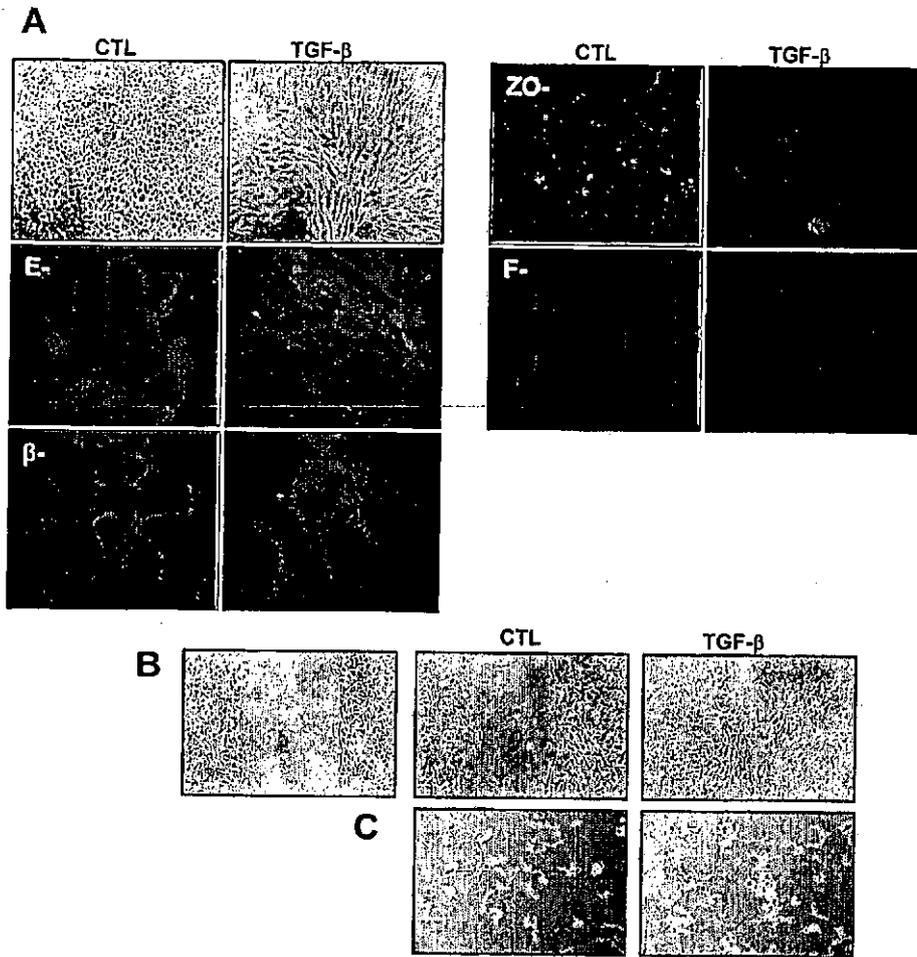


Fig.1

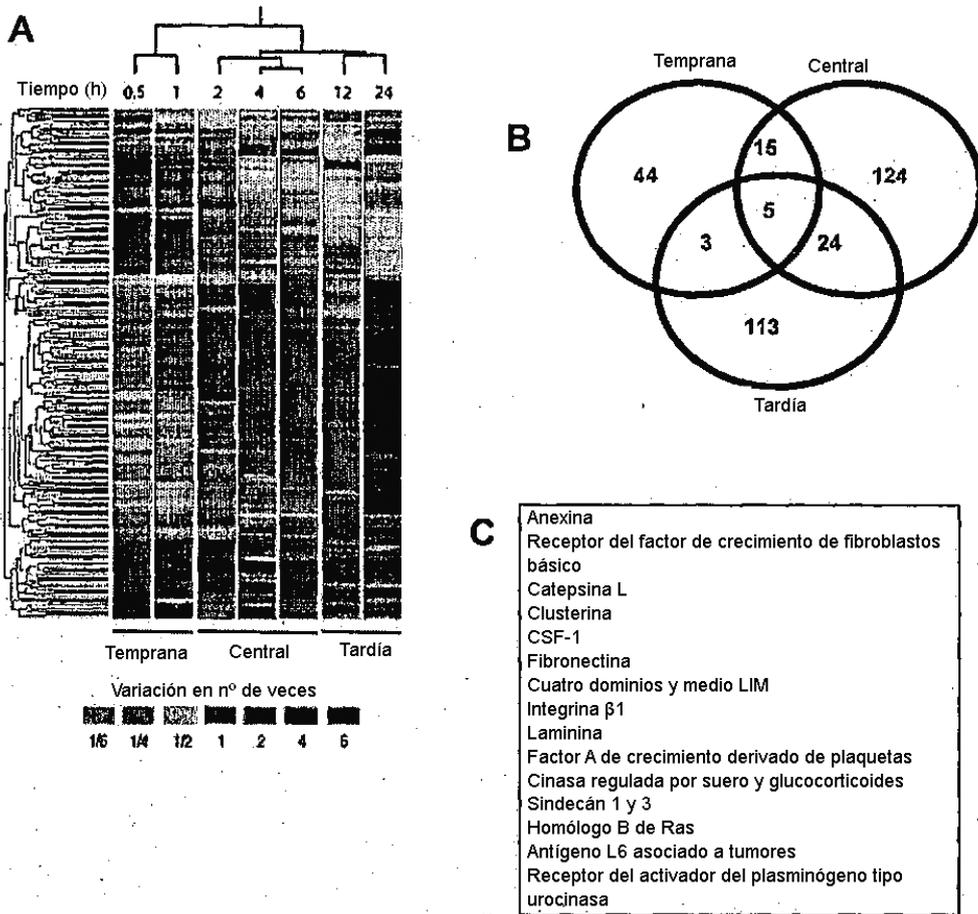


Fig.2

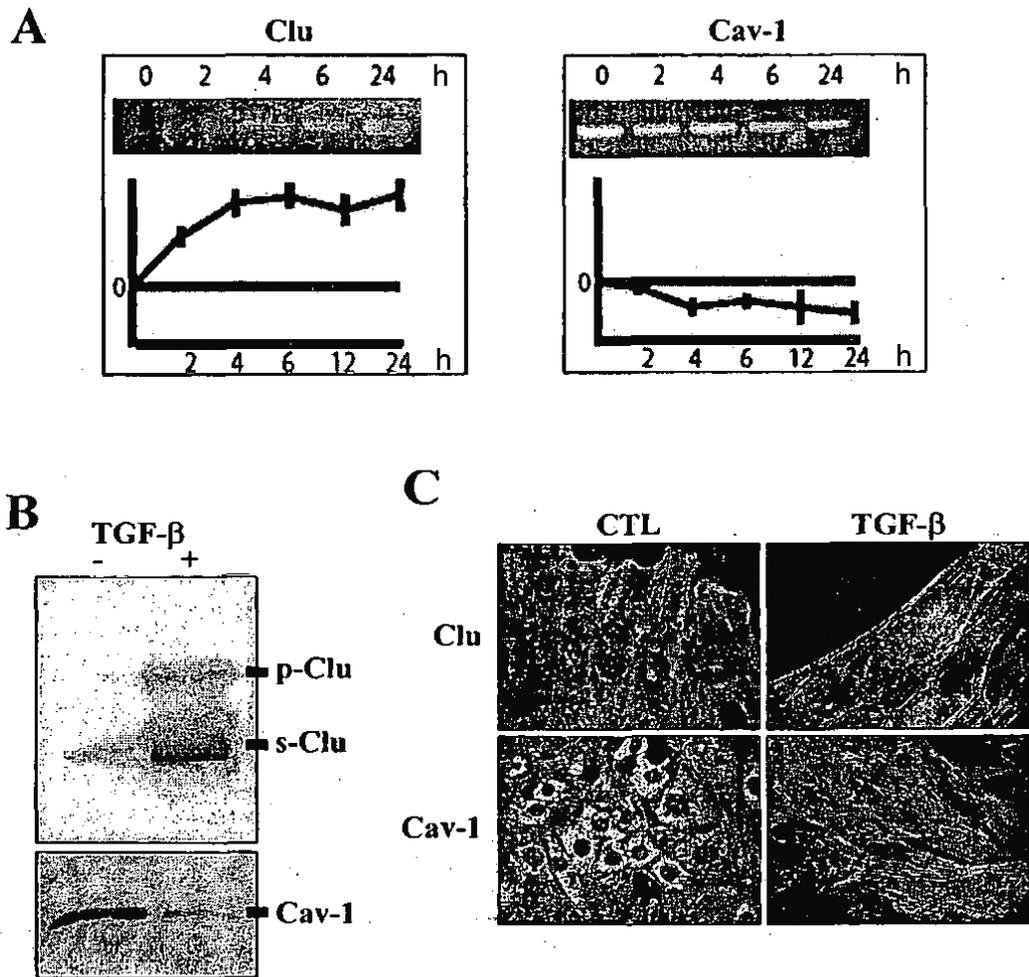


Fig. 3

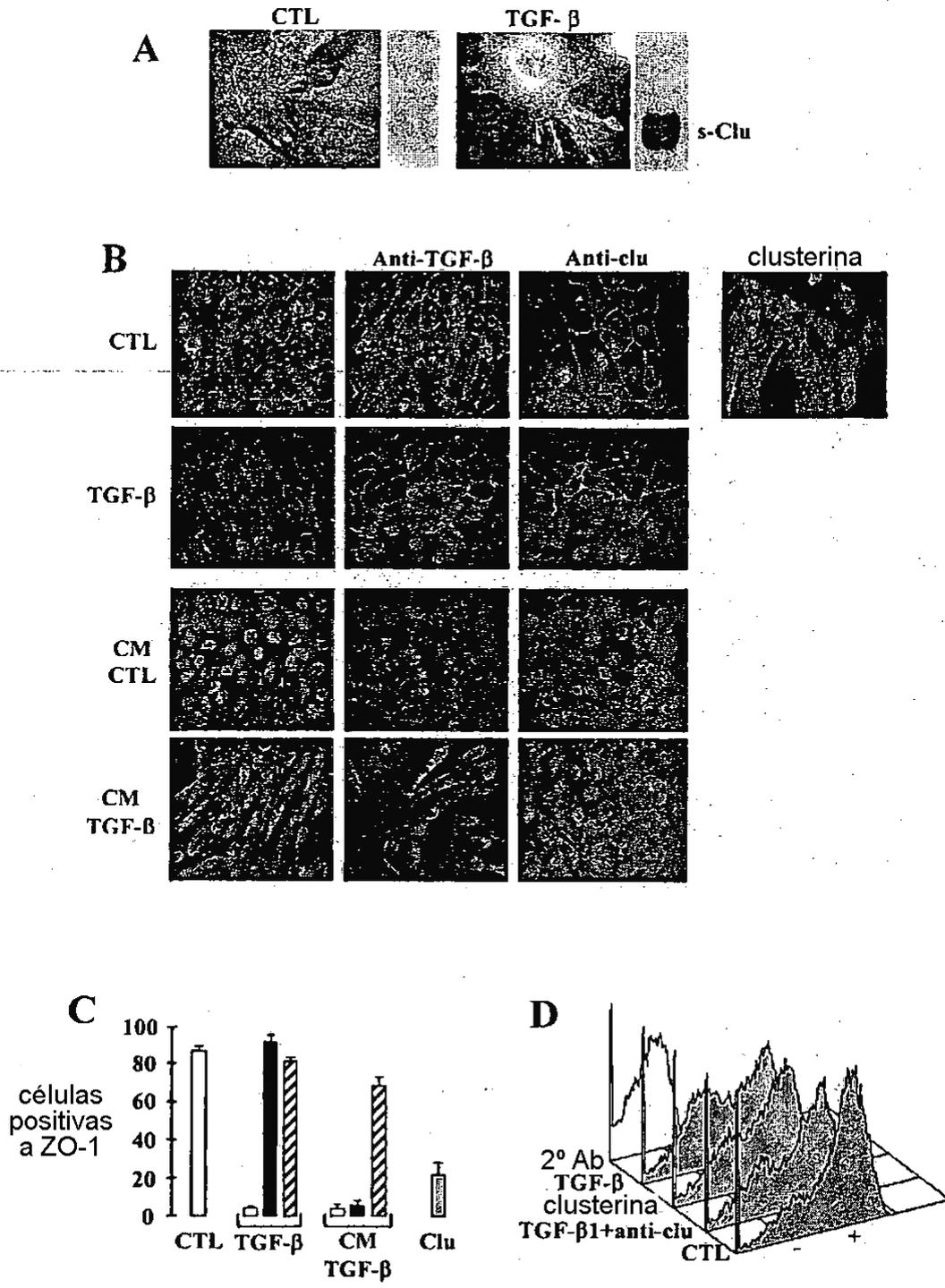
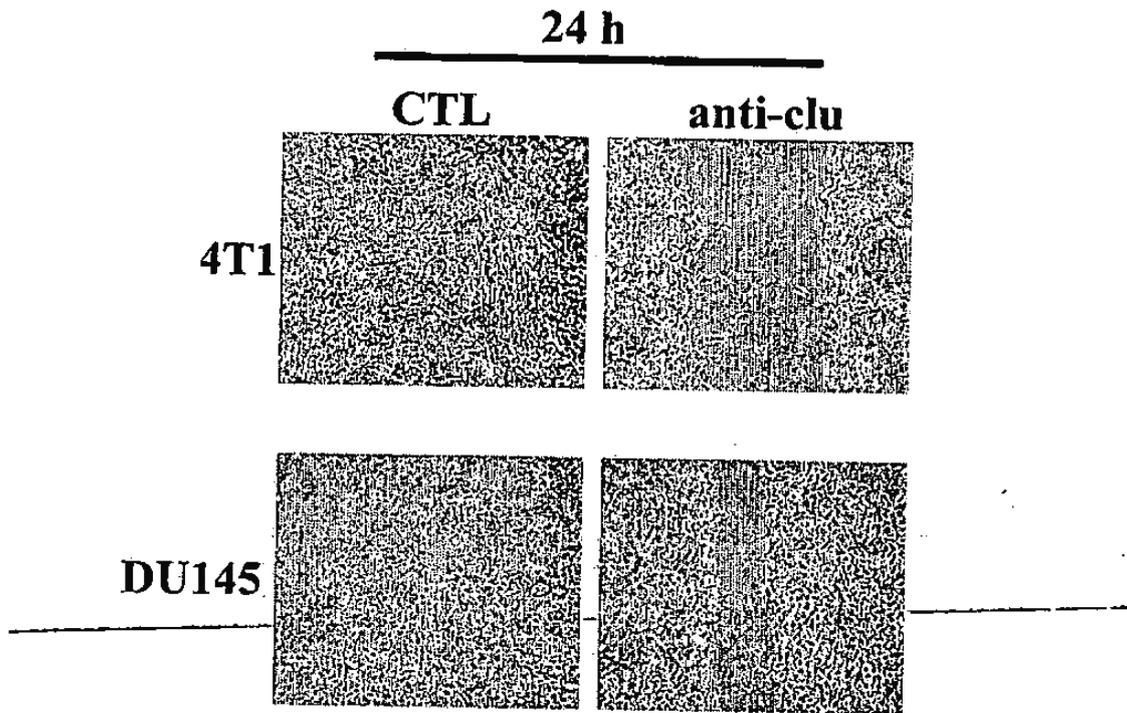


Fig. 4



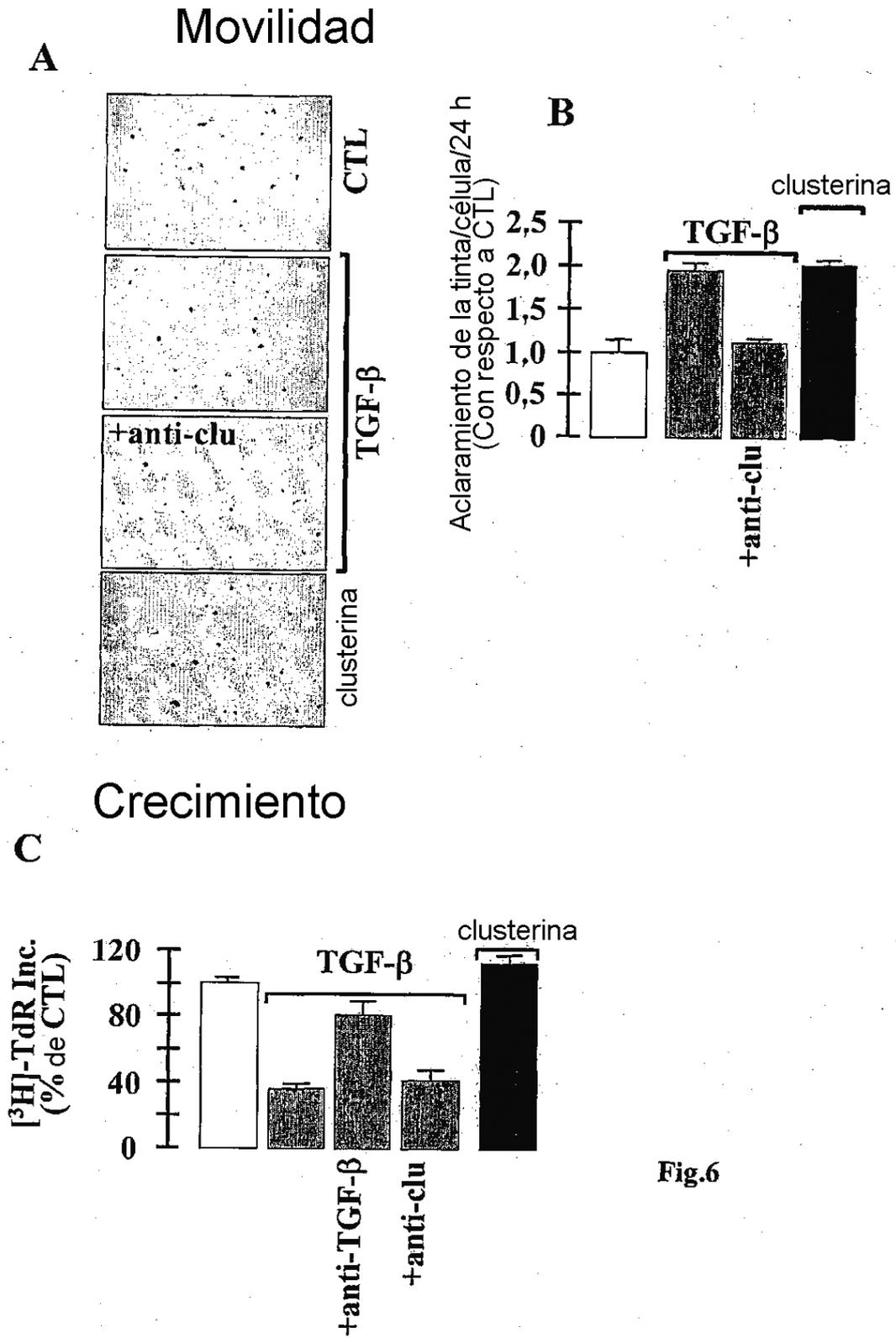


Fig.6

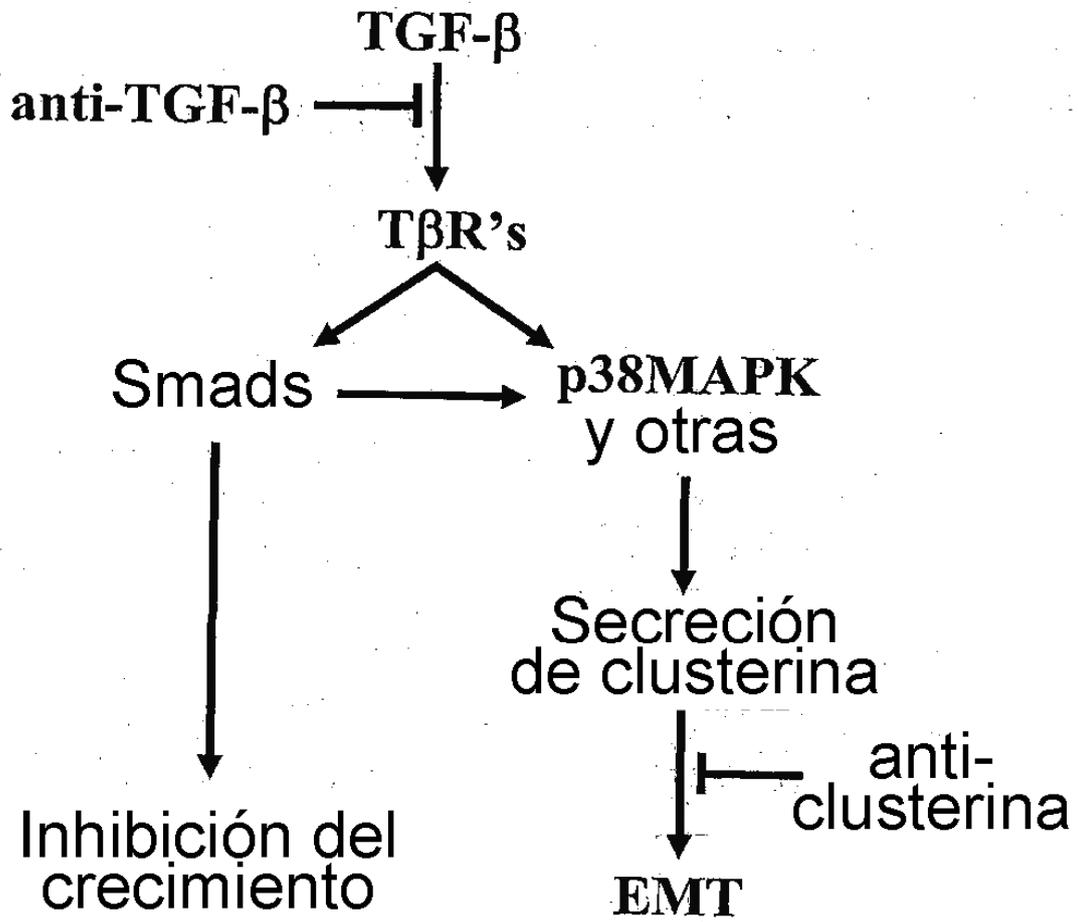
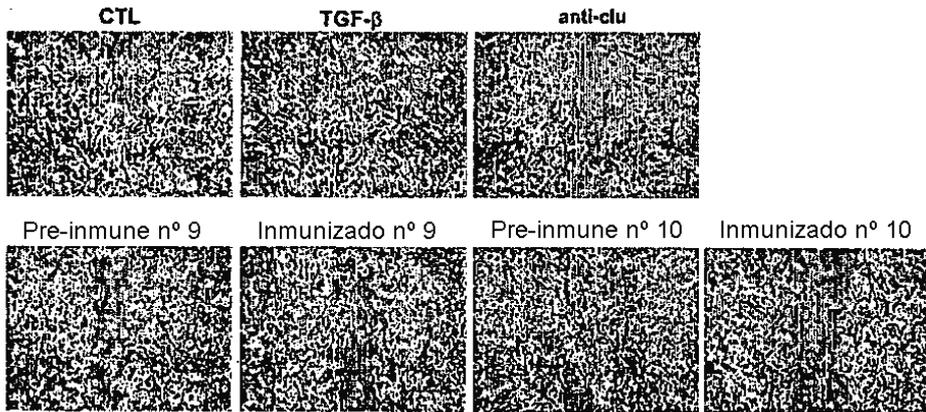


Fig.7

4T1



BRI-JM01

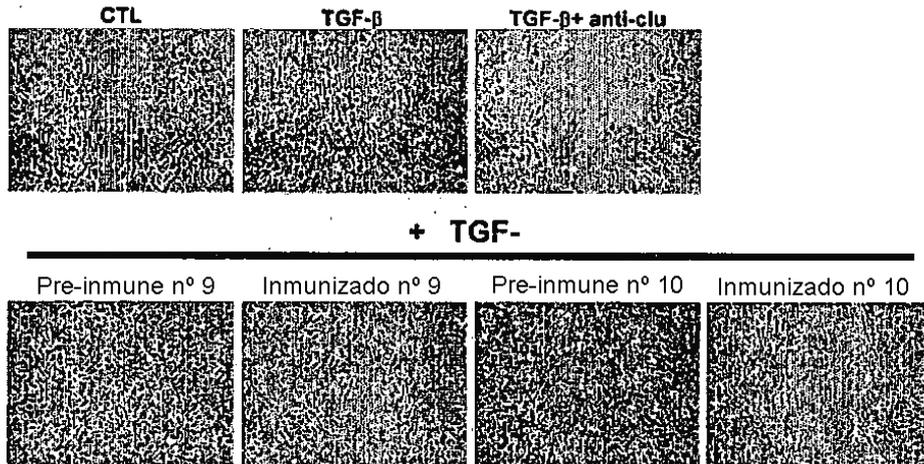


Fig.8

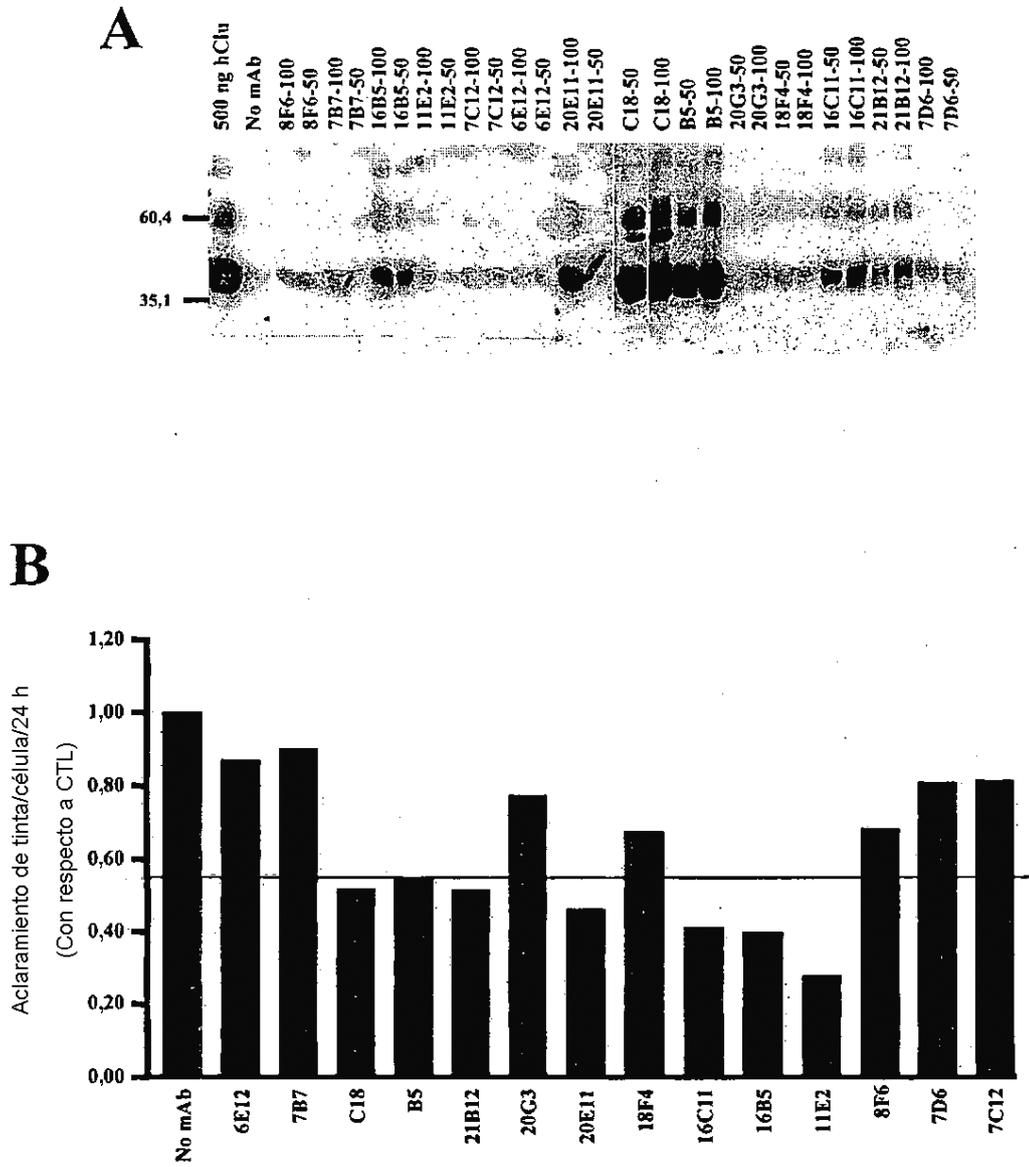


Fig. 9

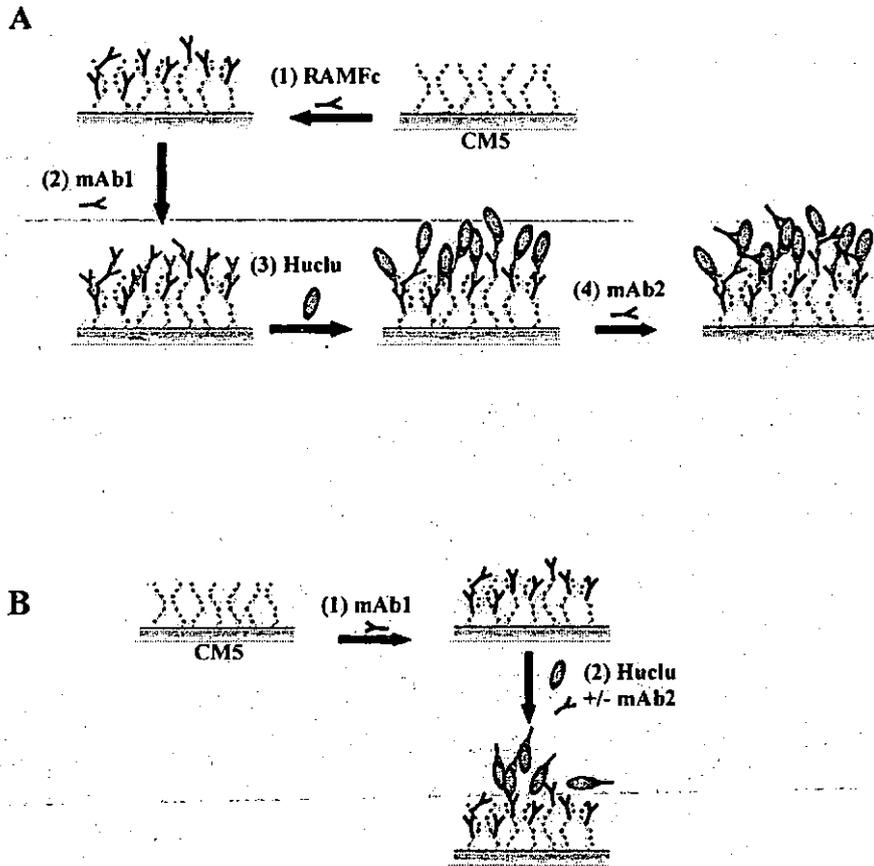


Fig. 10

	Anticuerpo 1 (inmovilizado directamente o indirectamente)			
	16B5	16C11	20 E 11	21B12
Anticuerpo 2 - que interactúa con clusterina (en disolución o capturado en Ab1)				
mAb neutralizante				
16B5	++	++	+ -*	++
16C11	++	++	+ -*	++
20 E 11	+ -*	± +	++	++
21B12	++	++	++	++
B5	++	± +	++	++
11E2	+	+	-*	+
pAb neutralizante				
C18	+	+	+	+
pAb#10	<u>±</u>	<u>±</u>	<u>±</u>	<u>±</u>

Fig. 11

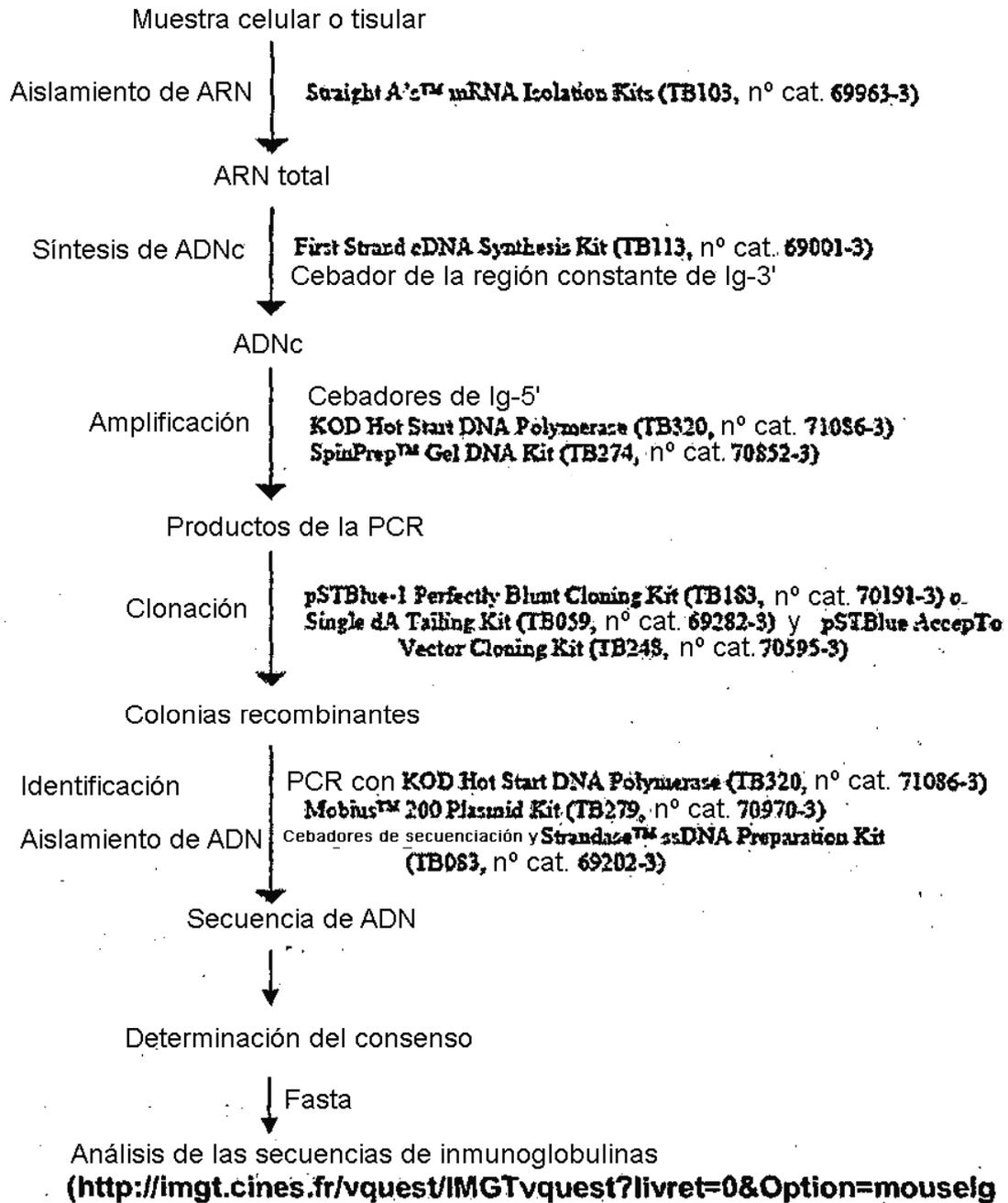


Fig. 12.

ES 2 543 341 T3

CLON	Secuencia	SEC ID NO.
11E2 VL Gr1	ENVLTQSPAIMASASPGEKVTMTCSASSSVS YMHWYQQKSSTSPKLWIYDTSKLAGVPG RFSGSGSGNSYSLTISSMEAEDVATYYGF QGSGYPFTFGSGTKLEIK	SEC ID NO.: 8
11E2 VL Gr2	DIQMTQSPSSLSASLGGKVTITCKASQDINK YIAWYQHKPGKGPRLLIHYTSTLQPG1PSR FSGSGSGRDYSFISISNLEPEDIATYYCLQY DNLLRTFGGGTKLEIK	SEC ID NO.: 9
20E11-VL	DIVLTLSPASLAVSLGQRATISCRASQSVNS SNYSYMHWYQQKPGQPPKLLIKYASNLES GVPARFSGSGSGTHFTLNIHPVEEEDTATY YCQHSWEIPWTFGGGTKLEIK	SEC ID NO.: 10
21B12 VL	DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSL YSSNQKNYLAWYQQRPGQSPKLLIYWAST RESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDL AVYYCQYYIYPRTFGGGTKLEIK	SEC ID NO.: 11
16B5 VL	DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSL NSRTRKIMYLAWYQQKPGQSPKLLIYWAST RESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDL AVYYCKQSYNLWTFGGGTKLEFK	SEC ID NO.: 12
7C12 VL	DVLMQTPLSLPVSPGDQASISCRSSQSIV HSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNR SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGV YYCFQGSHPYTFGGGTKLEIK	SEC ID NO.: 13
6E12 VL	DVVLQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLV HSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNR SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGV YFCSQSTHVPRTFGGGTKLEIK	SEC ID NO.: 14
7B7 VL	DIVMTQSPSSLAMSVGQRVTMSCKSSQSL LNSNNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVYFAS TRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAED LADYFCQQHYNTPLTFGAGTKLELK	SEC ID NO.: 15
7D6 VL	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLV HSNGDTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNR SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGV YFCSQSTHVPRTFGGGTKLEIK	SEC ID NO.: 16

Fig. 13

ES 2 543 341 T3

CLON	Secuencia	SEC ID NO.
8F6 VL	DVLLTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLV HSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKFSNR FSGVPDRFSGSGSGTDFTLNISRVEAEDL GVYFCSQSTHVPRTFGGGTKLEIK	SEC ID NO.: 17
18F4 VL	DIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQSSIS DYLHWYQQKSHESPRLLIKYASQSIGIPS RFSGSGSGSDFTLIIMSVPEPEDVGVYYC QNGHSFPYTFGGGKLEIK	SEC ID NO.: 18
20G3 VL	EIVLTQSPDTMTASPGÉKITITCSASSSISN FLHWYQQKPGFSPKLLIYRTSNLPSGVPP RFSGSGSGTSYSLTIGTMEAEDVATYYCQ QGSSLPRTFGAGTKLALK	SEC ID NO.: 19
16C11 VL		

Fig. 13

ES 2 543 341 T3

CLON	Secuencia	SEC ID NO.
11E2 VH	EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSF TGYNMNWWKQNNNGKSLEWIGNIDPYYGT PNYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLKSL TSEDSAVYYCALNSLLRLNAMDYWGQGT SVTVSS	SEC ID NO.: 20
20E11 VH	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFT DYSMHWWKQAPGKGLKWMGWINTETGE PTYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLIK NEDTATYFCARTGSSGYFDCWGGQTTLT VSS	SEC ID NO.: 21
21B12 VH	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFT NYGMHWWKQAPGKGLKWMGWINTYTGE PTYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLIK NEDTATYFCARDGFLYFFDYWGQGTTLTV SS	SEC ID NO.: 22
16B5 VH	EVQLQQSGAELVKPGASVRLSCTTSGFNI KDIYMHWWKQRPEQGLEWIGRIDPAYGNT KYDPKFQGKATITADTSSNTAYLQLSSLTS EDTAVYYCARRYDTAMDYWGQGTSVTVS S	SEC ID NO.: 23
16C11 VH	EVQLQQSGPELGKPGASVKISCKASGYSF TGYNMYWVKQSHRKSLEWIGYIDPYNGDT SYNQKSKGKATLTADRSSSTAYMHLNSLT SEDSGIYYCARGAYGSSYAYWGQGTTLVA VSA	SEC ID NO.: 24
7C12 VH	EVQLVESGGGLVLPKPGGSLKLSAASGFTF SSYAMSWVRQSPEKRLEWVAEISSGGTY TYYPDVTVGRFTISRDNANTLYLEMSSLR SEDTAMYYCTRIYYDYGSWDGFAYWGQG TLVTVSA	SEC ID NO.: 25
6E12 VH	QVQLQQSGPQLVRPGASVKISCKASDYSF TTYWMHWWKQRPGQGLEWIGMIDPSDSE TRLNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSP TSEDSAVYYCSRDNRYRYTLDLFWGQGT SVTVSS	SEC ID NO.: 26
7B7 VH	TCKLVESGGGLVLPKPGGSLKLSAASGFTF SSYSMSWVRQTPEKRLEWVATISTIGSYT DYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMSLTK SEDTAMYCCTREDYRYAWFAYWGQGTLV TVSA	SEC ID NO.: 27
8F6 VH	QVQLQQSGPQLVRPGASVKISCKASDYSF TTYWMHWWKQRPGQGLEWIGMIDPSDSE TRLNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSP TSEDSAVYYCSRDNRYRYTMDYWGQGT SVTVSS	SEC ID NO.: 28

Fig. 13

ES 2 543 341 T3

CLON	Secuencia	SEC ID NO.
18F4 VH	EVQLVESGGGLVVKPGGSLKFSCAASGFTFI NYAMSWVRQSPEKRLEWIAEISSGGSDTY YPDTVTGRFTISRDNKNTL*LEMSSLRSE DTAMYYCARDGNWDGGSLTTGAKAPLS	SEC ID NO.: 29
20G3 VH	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTLT DYSMHWVKQAPGKGLKWMGWINTETGE PTYVDDFKRRFAFSLETSASAAYLQINNLIK NEDTATYFCTRDGSSTWFSYWGQGLVT VSA	SEC ID NO.: 30

Fig. 13

ES 2 543 341 T3

CLON	MARCO 1	CDR1
11E2 VLGr1	ENVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSAS	SSVSY
11E2 VL Gr2	DIQMTQSPSSLSASLGGKVTITCKAS	QDINKY
20E11 VL	DIVLTLSPASLAVSLGQRATISCRAS	QSVNSSNYSY
21B12 VL		QSLLYSSNQKNY
16B5 VL	DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSS	QSLLSNRTRKNY
7C12 VL	DVLMQTPLSLPVSPGDQASISCRSS	QSIVHSNGNTY
6E12 VL	DVVLQTPLSLPVSLGDQASISCRSS	QSLVHSNGNTY
7B7 VL	DIVMTQSPSSLAMSVGQRVTMSCKSE	QSLLSNQNQKNV
7D6 VL	DVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSS	QSLVHSNGDTY

Fig. 13

ES 2 543 341 T3

CLON	Marco 1	CDR1
8F6 VL	DVLLTQTPLSLPVSLGDQASISCRSS	QSLVHSNGNTY
18F4 VL	DIVMTQSPATLSVTPGDRVSLSCRAS	QSISDY
20G3 VL	EIVLTQSPTTMTASPGEKITITCSAS	SSISSNF
16C11 VL		

Fig. 13

ES 2 543 341 T3

CLON	Marco 1	CDR1
11E2 VH	EVQLQQSGPELEKPGASVKISCKAS	GYSFTGYN
20E11 VH	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKAS	GYTFDYS
21B12 VH	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKAS	GYTFTNYG
16B5 VH	EVQLQQSGAELVKPGASVRLSCTTS	GFNIKDIY
16C11 VH	EVQLQQSGPELGKPGASVKISCKAS	GYSFTGYN
7C12 VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAAS	GFTFSSYA
6E12 VH	QVQLQQSGPQLVRPGASVKISCKAS	DYSFTTYW
7B7 VH	TCKLVESGGGLVKPGGSLKLSAAS	GFTFSSYS
8F6 VH	QVQLQQSGPQLVRPGASVKISCKAS	DYSFTTYW

Fig. 13

ES 2 543 341 T3

CLON	Marco 1	CDR1
18F4 VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLKFSCAAS	GFTFINYA
20G3 VH	QIQLVQSGPELKKRGETVKISCKAS	GYTLTDYS

Fig. 13

ES 2 543 341 T3

CLON	Marco 2	CDR2
11E2 VL Gr1	MHWYQQKSSTSPKLWIY	DTS
11E2 VL Gr2	IAWYQHKPGKGPRLIH	YTS
20E11 VL	MHWYQQKPGQPFLIK	YAS
21B12 VL	LAWYQQRPGQSPKLLIY	WAS
16B5 VL	LAWYQQKPGQSPKLLIY	WAS
7C12 VL	LEWYLQKPGQSPKLLIY	KVS
6E12 VL	LHWYLQKPGQSPKLLIY	KVS
7B7 VL	LAWYQQKPGQSPKLLVY	FAS
7D6 VL	LHWYLQKPGQSPKLLIY	KVS

Fig. 13

ES 2 543 341 T3

CLON	Marco 2	CDR2
8F6 VL	LHWYLQKPGQSPKLLIY	KVS
18F4 VL	LHWYQQKSHESPRLLIK	YAS
20G3 VL	LHWYQQKPGFSPKLLIY	RTS
16C11 VL		

Fig. 13

ES 2 543 341 T3

CLON	Marco 2	CDR2
11E2 VH	MNWVKQNNNGKSLEWIGN	IDPYYGTP
20E11 VH	MHWVKQAPGKGLKWMGW	INTETGEP
21B12 VH	MHWVKQAPGKGLKWMGW	INTYTGEP
16B5 VH	MHWVKQRPEQGLEWIGR	IDPAYGNT
16C11 VH	MYWVKQSHRKSLEWIGY	IDPYIMGDT
7C12 VH	MSWVRQSPEKRLEWVAE	ISSGGTYT
6E12 VH	MHWVKQRPGQGLEWIGM	IDPSDSET
7B7 VH	MSWVRQTPEKRLEWVAT	ISTIGSYT
8F6 VH	MHWVKQRPGQGLEWIGM	IDPSDSET

Fig. 13

ES 2 543 341 T3

CLON	Marco 2	CDR2
18F4 VH	MSWVRQSPEKRLEWIAE	ISSGGSDT
20G3 VH	MHWVKQAPGKGLKWMGW	INTETGEP

Fig. 13

ES 2 543 341 T3

CLON	Marco 3	CDR3 (región D)
11E2 VL Gr1	KLASGVPGRFSGSGSGNSYSLTISSMEAEDVATYYC	FQSGGYPFT
11E2 VL Gr2	TLQPGIPSRFSGSGSGRDYSFSISNLEPEDIATYYC	LQYDNLRLT
20E11 VL	NLESGVPARFSGSGSGTHFTLNHPVEEEDTATYYC	QHSWEIPWT
21B12 VL	TRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKÁEDLAVYYC	QQYYIYPRT
16B5 VL	TRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYC	KQSYNLWT
7C12 VL	NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC	FQGSHPYPT
6E12 VL	NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFC	SQSTHIPRT
7B7 VL	TRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFC	QQHYNTPLT
7D6 VL	NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFC	SQSTHVPRT

Fig. 13

ES 2 543 341 T3

CLON	Marco 3	CDR3 (D región)
8F6 VL	NRFSGVPDRFSGSGSGDFTLNISRVEAEDLGVYFC	SQSTHVPRT
18F4 VL	QSIGIPSRFSGSGSGSDFTLSINSVEPEDVGVYYC	QNGHSFPYT
20G3 VL	NLPSGVPPRFSGSGSGTSYSLTIGTMEAEDVATYYC	QQGSSLPRT
16C11VL		

Fig. 13

ES 2 543 341 T3

CLON	Marco 3	CDR3 (D región)
11E2 VH	NYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYY	ALNSLLRLNAMDY
20E11 VH	TYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLIKNETATYFC	ARTGSSGYFDC
21B12 VH'	TYADDFKGRFAFSLETSASTAYLQINNLIKNETATYFC	ARDGFLYFFDY
16B5 VH	KYDPKFQGGKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYC	ARRYDTAMDY
16C11 VH	SYNQKSKGKATLTADRSSSTAYMHLNSLTSEDSGIYY<	ARGAYGSSYAY
7C12 VH	YYPDTVTGRFTISRDNANTLYLEMSSLRSEDAMYYC	TRIIYDYGSWDGFAY
6E12 VH	RLNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYYi	SRDGNRYRYTLDF
7B7 VH	DYPDSVKGRFTISRDNANTLYLQMSSLKSEDAMYC	TREDYRYAWFAY
8F6 VH	RLNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYY*	SRDGNYSYTM DY

Fig. 13

ES 2 543 341 T3

CLON	Marco 3	CDR3 (D región)
18F4 VH	YYPDTVTGRFTISRDNKNTL*LEMSSLRSED TAMYYC	ARDGNWDGGSLT
20G3 VH	TYVDDFKRRFAFSLETSASAAYLQINN LKNEDTATYFC	TRDGSSTWFSY

Fig. 13

CLON	Marco 4 (región J)		
11E2 VL Gr1	GSGTKLEIK		
11E2 VL Gr2	FGGGTKLEIK		
20E11VL	FGGGTKLEIK		
21B12 VL	FGGGTKLEIK		
16B5 VL	FGGGTKLEFK		
7C12 VL	FGGGTKLEIK		
6E12 VL	FGGGTKLEIK		
7B7VL	FGAGTKLELK		
7D6 VL	FGGGTKLEIK		

Fig. 13

CLON	Marco 4 (región J)		
8F6 VL	FGGGTKLEIK		
18F4 VL	FGGGTKLEIK		
20G3 VL	FGAGTKLALK		
16C11 VL			

Fig. 13

ES 2 543 341 T3

CLON	Marco 4 (región J)	Región J (desplazamiento del marco)	
11E2 VH	WGQGTSVTVSS		
20E11 VH	WGQGTTLVSS	GAKAPLSQSPQ	
21B12 VH	WGQGTTLVSS		
16B5 VH	WGQGTSVTVSS	LWTTGVKEPQSPSPQ	
16C11 VH	WGQGTLVAVSA	LLGPRDSGRCLC	
7C12 VH	WGQGTLVTVSA		
6E12 VH	WGQGTSVTVSS		
7B7 VH	WGQGTLVTVSA		
8F6 VH	WGQGTSVTVSS	ILWTTGVKEPQSPSPQ	

Fig. 13

CLON	Marco 4 (región J)	Región J (desplazamiento del marco)	
18F4 VH	WGQGTTLVSS	LTTGAKAPLSQSPQ	
20G3 VH	WGQGTLVTVSA		

Fig. 13

CDR1: G-Y-S/T-F-T-X-Y-X
 CDR2: I-D/N-P/T-Y/E-X-G-X-P/T

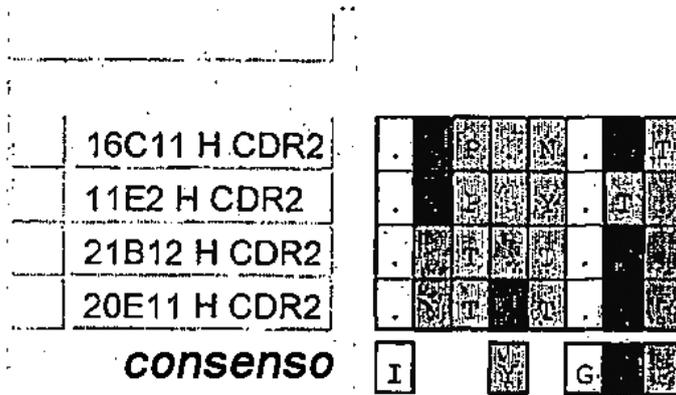
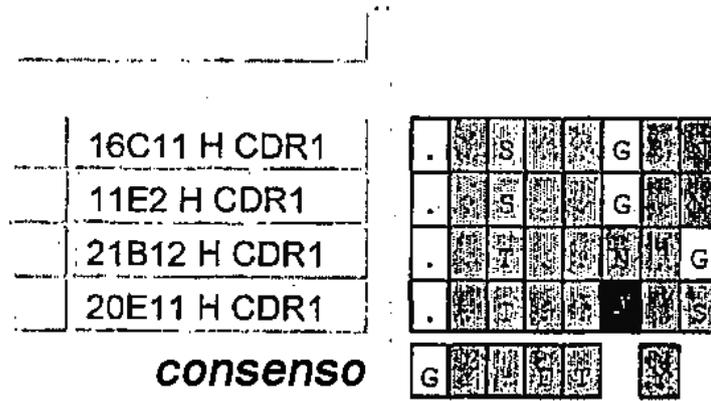


Figura 14