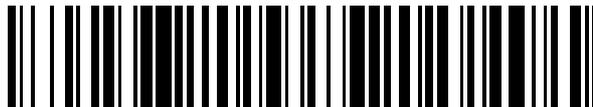


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 595 362**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 31/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 51/10 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
A61K 41/00 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.06.2009 PCT/IB2009/007082**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **14.01.2010 WO10004438**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2009 E 09794069 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2016 EP 2303924**

54 Título: **Anticuerpos LM, fragmentos funcionales, antígeno diana LM-1 y métodos para prepararlos y usarlos**

30 Prioridad:

08.01.2009 US 143351 P
16.06.2008 US 61881 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.12.2016

73 Titular/es:

PATRY'S LIMITED (100.0%)
Level 6, Suite 614 343 Lt Collins Street
Melbourne, Victoria 3000

72 Inventor/es:

VOLLMERS, HEINZ, PETER;
BRANDLEIN, STEPHANIE, UTE;
THALHEIMER, ANDREAS;
ILAG, LEODEVICO, L.;
POWER, BARBARA;
UDABAGE, LISHANTHI;
HENSEL, FRANK;
SCHOENEN, FRANK;
KELTER, ARNDT-RENE y
HOSKING, CHRISTOPHER, GARTH

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 595 362 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 LM, fragmentos funcionales, antígeno diana LM-1 y métodos para prepararlos y usarlos

5 Campo de la invención

La invención se refiere a un anticuerpo, conocido como LM-1 y a una diana, conocida como diana o antígeno de LM-1. El anticuerpo denotado LM-1 es una IgM y se une a diferentes tipos de neoplasia, cáncer, tumor y metástasis. LM-1 inhibe el crecimiento de diversos tipos de células cancerosas y estimula o induce la apoptosis de diversos tipos de células cancerosas. LM-1 reduce también la formación o el establecimiento de la metástasis en uno o más sitios que surgen de una neoplasia, un tumor o un cáncer primarios, o crecimiento o proliferación de una metástasis que se ha formado o se ha establecido en uno o más sitios.

15 Introducción

Enfermedad metastásica en los sitios periféricos del cáncer primario que contribuyen potencialmente a la progresión y recidiva del cáncer. Por consiguiente, la inhibición o el establecimiento o formación de la metástasis, o la reducción o disminución del crecimiento de la metástasis, proliferación de o progresión de tumores metastásico que se han establecido es probable que reduzca o inhiba la progresión y la recidiva del cáncer. La invención satisface esta necesidad y proporciona también beneficios relacionados.

El documento WO 2004/081027 A2 describe anticuerpos para el uso en el tratamiento contra el cáncer que induzcan la apoptosis de las células neoplásicas pero que no induzcan la apoptosis de las células no neoplásicas. El documento US 6 159 702 describe un sistema de métodos de ensayo diagnósticos proporcionados para el diagnóstico de un tumor de mama primario procedente de un sujeto individual que es un tumor clínicamente metastásico Sumario

La invención proporciona un anticuerpo sin conjugar o uno de sus fragmentos funcionales que comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera:

- (a) la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera comprenden una secuencia que es al menos un 90 % idéntica a la región variable de la cadena pesada y una secuencia que es al menos un 90 % idéntica a la región variable de la cadena ligera del anticuerpo LM-1 producido por una línea celular DSMZ depositada como N.º de registro DSM ACC 2623; y
- (b) la región variable de la cadena pesada comprende las tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 1 y la región variable de la cadena ligera comprende las tres CDR de la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 11, y en la que,

el anticuerpo o su fragmento funcional se une a la proteína NONO/nmt55,

para uso en el tratamiento de la metástasis de una neoplasia, tumor o cáncer en un sujeto que necesita tratamiento, o reducir o inhibir la metástasis de una neoplasia, un tumor o un cáncer primarios en uno o más sitios, localizaciones o regiones distintas de una neoplasia, un tumor o un cáncer primarios en un sujeto que necesita tratamiento, o reducir o inhibir el crecimiento, la proliferación, la movilidad o la invasividad de las células neoplásicas, tumorales o cancerosas que pueden desarrollarse en o proporcionar un aumento de una metástasis en un sujeto que necesita tratamiento.

En aspectos concretos, un anticuerpo o fragmento funcional compite con el anticuerpo LM-1, como se representa por un anticuerpo producido por la línea celular DSMZ N.º de depósito. DSM ACC 2623, o se representa por las secuencias de la cadena pesada y ligera que se muestran como SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 o 9, y 11 o 13, para la unión a un antígeno (por ejemplo, proteína NONO/nmt55) en uno o más de un adenocarcinoma de estómago (por ejemplo, difuso o intestinal), cáncer colorrectal tal como adenocarcinoma, carcinoma de ovario, cáncer de pulmón, tal como adenocarcinomas de pulmón, carcinoma de pulmón escamocelular y carcinoma microcítico, melanoma, carcinomas de mama lobulares y ductales, cáncer de mama tal como cáncer ductal o lobular invasivo, cáncer gástrico, cáncer de páncreas, tales como adenocarcinomas de páncreas (por ejemplo, ductal), sarcomas, cáncer gastrointestinal tal como cáncer de estómago, tumor de tejido nervioso o tumor cerebral tal como un glioma, cáncer de esófago tal como carcinoma escamocelulares esofágicos y adenocarcinomas, osteosarcoma, fibrosarcomas, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de próstata tal como adenocarcinomas de próstata, cáncer de riñón tal como carcinoma renal, cáncer de ovario tal como adenocarcinomas, cáncer de testículo, cáncer de endometrio, cáncer de cuello de útero tal como escamocelular y adenocarcinomas, cánceres de útero tales como adenocarcinomas, enfermedad de Hodgkin, linfomas, y leucemias. Dichos polipéptidos son particularmente útiles para la detección y el tratamiento del adenocarcinoma de estómago (por ejemplo, difuso o intestinal) cáncer colorrectal tal como adenocarcinoma, carcinoma de ovario, cáncer de pulmón, tal como adenocarcinomas de pulmón, carcinoma de pulmón escamocelular y carcinoma de pulmón microcítico, melanoma, carcinomas mamaros lobulares y ductales, cáncer de mama tal como cáncer ductal o lobular invasivo, cáncer gástrico, cáncer de páncreas, tal como adenocarcinomas

pancreáticos (por ejemplo, ductal) sarcomas, cáncer gastrointestinal tal como cáncer de estómago, tumor de tejido nervioso o cerebral tal como glioma, cáncer de esófago tal como carcinomas y adenocarcinomas escamocelulares esofágicos, osteosarcoma, fibrosarcomas, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de próstata tal como adenocarcinomas de próstata, cáncer de riñón tal como carcinoma renal, cáncer de ovario tales como adenocarcinomas, cáncer de testículo, cáncer de endometrio, cáncer de cuello de útero tal como escamocelular y adenocarcinomas, cánceres de útero tales como adenocarcinomas, enfermedad de Hodgkin, linfomas, y leucemias.

En otra realización, un anticuerpo o fragmento funcional compite con el anticuerpo LM-1, como se representa por un anticuerpo producido por la línea celular DSMZ N.º de depósito. DSM ACC 2623, o se representa por las secuencias de la cadena pesada y ligera que se muestran como SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 o 9, y 11 o 13, para la unión a un adenocarcinoma de estómago (por ejemplo, difuso o intestinal), cáncer colorrectal tal como adenocarcinoma, carcinoma de ovario, cáncer de pulmón, tal como adenocarcinomas de pulmón, carcinoma de pulmón escamocelular y carcinoma microcítico, melanoma, carcinomas de mama lobulares y ductales, cáncer de mama tal como cáncer ductal o lobular invasivo, cáncer gástrico, cáncer de páncreas, tales como adenocarcinomas de páncreas (por ejemplo, ductal), sarcomas, cáncer gastrointestinal tal como cáncer de estómago, tumor de tejido nervioso o tumor cerebral tal como un glioma, cáncer de esófago tal como carcinoma escamocelulares esofágicos y adenocarcinomas, osteosarcoma, fibrosarcomas, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de próstata tal como adenocarcinomas de próstata, cáncer de riñón tal como carcinoma renal, cáncer de ovario tal como adenocarcinomas, cáncer de testículo, cáncer de endometrio, cáncer de cuello de útero tal como escamocelular y adenocarcinomas, cánceres de útero tales como adenocarcinomas, enfermedad de Hodgkin, linfomas, o leucemia.

En una realización adicional, un anticuerpo o fragmento funcional compite con un anticuerpo LM-1, como se representa por un anticuerpo producido por una línea de células DSMZ con N.º de registro DSM ACC 2623, o representado por las secuencias de la cadena pesada y ligera que se muestran en las SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 o 9, y 11 o 13, para la unión de uno de la línea de células de adenocarcinoma de pulmón DV-90 (DSMZ número de registro ACC 307) línea de células EPLC-272H de carcinoma de pulmón epidermoide (DSMZ número de registro ACC 383), línea de células LOU-NH91 de carcinoma de pulmón escamocelular (DSMZ número de registro ACC 393), células HT-29 (ATCC N.º de registro HTB-38; DSMZ N.º de registro ACC 299), A549 (DSMZ N.º de registro ACC 107) o BXP-3 (ATCC N.º de registro CRL-1687). En una realización, un anticuerpo o su fragmento funcional inhibe o reduce la proliferación o estimula o induce la apoptosis, de uno o más de un adenocarcinoma de estómago (por ejemplo, difuso o intestinal) cáncer colorrectal tal como adenocarcinoma, carcinoma de ovario, cáncer de pulmón, tal como adenocarcinomas de pulmón, carcinoma de pulmón escamocelular y carcinoma de pulmón microcítico, melanoma, carcinomas mamarios lobulares y ductales, cáncer de mama tal como cáncer ductal o lobular invasivo, cáncer gástrico, cáncer de páncreas, tal como adenocarcinomas pancreáticos (por ejemplo, ductal) sarcomas, cáncer gastrointestinal tal como cáncer de estómago, tumor de tejido nervioso o cerebral tal como glioma, cáncer de esófago tal como carcinomas y adenocarcinomas escamocelulares esofágicos, osteosarcoma, fibrosarcomas, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de próstata tal como adenocarcinomas de próstata, cáncer de riñón tal como carcinoma renal, cáncer de ovario tales como adenocarcinomas, cáncer de testículo, cáncer de endometrio, cáncer de cuello de útero tal como escamocelular y adenocarcinomas, cánceres de útero tales como adenocarcinomas, enfermedad de Hodgkin, linfoma, o leucemia o uno de una línea de células Colo-699 de adenocarcinoma de pulmón (DSMZ número de registro ACC 196), línea de células DV-90 de adenocarcinoma de pulmón (DSMZ número de registro ACC 307), línea de células EPLC-272H de carcinoma de pulmón epidermoide (DSMZ número de registro ACC 383), o línea de células LOU-NH91 de carcinoma de pulmón escamocelular (DSMZ número de registro ACC 393)

La invención proporciona también anticuerpos aislados y purificados y sus fragmentos funcionales que se unen a células o a un antígeno (por ejemplo, proteína NONO/nmt55) que se unen al anticuerpo LM-1, como se representa por una línea de células DSMZ N.º de registro DSM ACC 2623, o representada por las secuencias de la cadena pesada y ligera que se muestran como las SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 o 9, y 11 o 13. En una realización, un anticuerpo o fragmento funcional se une a una célula de adenocarcinoma o a un carcinoma escamocelular al cual se une el anticuerpo LM-1, que se representa por un anticuerpo producido por una línea de células DSMZ N.º de registro DSM ACC 2623, o representada por las secuencias de la cadena pesada y ligera que se muestran como las SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 o 9, y 11 o 13. En aspectos concretos, un anticuerpo o fragmento funcional se une a uno o más de un adenocarcinoma de estómago (por ejemplo, difuso o intestinal) cáncer colorrectal tal como adenocarcinoma, carcinoma de ovario, cáncer de pulmón, tal como adenocarcinomas de pulmón, carcinoma de pulmón escamocelular y carcinoma de pulmón microcítico, melanoma, carcinomas mamarios lobulares y ductales, cáncer de mama tal como cáncer ductal o lobular invasivo, cáncer gástrico, cáncer de páncreas, tal como adenocarcinomas pancreáticos (por ejemplo, ductal) sarcomas, cáncer gastrointestinal tal como cáncer de estómago, tumor de tejido nervioso o cerebral tal como glioma, cáncer de esófago tal como carcinomas y adenocarcinomas escamocelulares esofágicos, osteosarcoma, fibrosarcomas, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de próstata tal como adenocarcinomas de próstata, cáncer de riñón tal como carcinoma renal, cáncer de ovario tales como adenocarcinomas, cáncer de testículo, cáncer de endometrio, cáncer de cuello de útero tal como escamocelular y adenocarcinomas, cánceres de útero tales como adenocarcinomas, enfermedad de Hodgkin, linfoma, o leucemia al cual se une el anticuerpo LM-1 como se representa por el anticuerpo producido por una línea de células DSMZ número de registro ACC 2623 o representada por las secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera que se muestran como SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 o 9, y 11 o 13. En otra realización, un anticuerpo o fragmento funcional se une a un adenocarcinoma de estómago (por ejemplo, difuso o intestinal) cáncer colorrectal tal como adenocarcinoma, carcinoma de ovario, cáncer de

pulmón, tal como adenocarcinomas de pulmón, carcinoma de pulmón escamocelular y carcinoma microcítico, melanoma, carcinomas de mama lobulares y ductales, cáncer de mama tal como cáncer ductal o lobular invasivo, cáncer gástrico, cáncer de páncreas, tales como adenocarcinomas de páncreas (por ejemplo, ductal), sarcomas, cáncer gastrointestinal tal como cáncer de estómago, tumor de tejido nervioso o tumor cerebral tal como un glioma, 5
 10
 15
 20

En una realización, un anticuerpo de las invenciones o sus derivados incluye una secuencia al menos un 95 % o más idéntica a una secuencia de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo producido por una línea de células DSMZ n.º de registro. DSM ACC 262, o una secuencia al menos un 95 % o más idéntica a la secuencia de una región variable de la cadena ligera del anticuerpo producido por una línea de células DSMZ N.º de registro DSM ACC 262. 25

Los anticuerpos de la invención incluyen IgG, IgA, IgM, IgE e IgD. En diversos aspectos, un IgG es una IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4. En aspectos concretos, un fragmento funcional o un derivado es un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fd, Fvs (sdFv) unido a disulfuro, V_L, V_H, trispecifico (Fab₃), biespecifico (Fab₂), diacuerpo ((V_L-V_H)₂ o (V_H-V_L)₂), triacuerpo (trivalente), tetracuerpo (tetravalente), minicuerpo ((scFv-CH3)₂), Fv monocatenario biespecifico (Bis-scFv), IgGdeltaCH2, scFv-Fc y (scFv)₂-Fc. En aspectos adicionales, un fragmento funcional o un derivado de longitud completa de la cadena pesada o ligera, o una región variable de la cadena pesada o ligera, incluye una o más CDR de una secuencia de la cadena pesada o ligera del anticuerpo LM-1, como se representa por las secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera que se muestra como las SEQ ID NO:1, y 11 (por ejemplo, los aminoácidos 24-35, 52-67 o 100-118 de la SEQ ID NO:1, o los aminoácidos 23-35, 51-58 o 90-101 de la SEQ ID NO:11). En aspectos 30
 35
 40

La invención proporciona también anticuerpos y sus derivados, que incluyen un dominio heterólogo. En una realización, un dominio heterólogo incluye, una marca, etiqueta o agente citotóxico detectable. En aspectos concretos, una marca o etiqueta detectable es una enzima, sustrato de enzima, ligando, receptor, radionucleido, una etiqueta T7-, His-, myc-, HA- o FLAG, reactivo denso en electrones, molécula de transferencia de energía, marca paramagnética, fluoróforo, cromóforo, agente quimioluminiscente, o un agente bioluminiscente. 45

Se describen también en el presente documento secuencias de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos y sus fragmentos funcionales. En una realización, una secuencia de ácido nucleico es al menos un 75-100 % complementaria o idéntica a una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de la región variable de la cadena pesada o ligera del anticuerpo LN-1, que se representa por el anticuerpo producido por una línea de células DSMZ N.º de registro DSM ACC 2623 o representado por las secuencias de la cadena pesada y ligera que se muestran como las SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 o 9, y 11 o 13 o una de sus derivadas (por ejemplo, los aminoácidos 24-35, 52-67 o 100-118 de SEQ ID NO:1, 3, 5 o 7, o los aminoácidos 23-35, 51-58 o 90-101 of SEQ ID NO:9). En otra realización un ácido nucleico codifica un derivado del anticuerpo LM-1, que se representa por un anticuerpo producido por una línea de células DSMZ N.º de registro DSM ACC 2623 o representado por las secuencias de la 50
 55
 60
 65

200-250, 250-300, 300-400, 400-500, 500-1000, 1000-2000 nucleótidos y tener al menos un 90 % de complementariedad o ser idénticos a una secuencia de ácido nucleico que codifica las SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 o 9, y 11 o 13 o uno de sus derivados (por ejemplo, 24-35, 52-67 o 100-118 de la SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 o 9, o los aminoácidos 23-35, 51-58 o 90-101 de la SEQ ID NO:11 o 13). En otros aspectos más, la secuencia de ácido nucleico puede incluir una secuencia control de la expresión o un vector (por ejemplo, un vector vírico, bacteriano, fúngico o de mamífero).

Se describen kits. En diversas realizaciones, un kit incluye un anticuerpo o su fragmento funcional que compite con el anticuerpo LM-1 que se representa por el anticuerpo produce una línea de células DSMZ N.º de registro DSM ACC 2623 o representado por las secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera que se muestran como las SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 o 9, y 11 o 13 para la unión a un antígeno (por ejemplo, la proteína NONO/nmt55) o a una célula (por ejemplo, una célula neoplásica, cancerosa, tumoral o metastásica). En aspectos concretos, un kit incluye un anticuerpo o su fragmento funcional que compite con el anticuerpo LM-1, como se representa por un anticuerpo producido por la línea celular DSMZ N.º de registro DSM ACC 2623, o se representa por las secuencias de la cadena pesada y ligera que se muestran como SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 o 9, y 11 o 13, para la unión a un adenocarcinoma de estómago (por ejemplo, difuso o intestinal), cáncer colorrectal tal como adenocarcinoma, carcinoma de ovario, cáncer de pulmón, tal como adenocarcinomas de pulmón, carcinoma de pulmón escamocelular y carcinoma microcítico, melanoma, carcinomas de mama lobulares y ductales, cáncer de mama tal como cáncer ductal o lobular invasivo, cáncer gástrico, cáncer de páncreas, tales como adenocarcinomas de páncreas (por ejemplo, ductal), sarcomas, cáncer gastrointestinal tal como cáncer de estómago, tumor de tejido nervioso o tumor cerebral tal como un glioma, cáncer de esófago tal como carcinoma escamocelulares esofágicos y adenocarcinomas, osteosarcoma, fibrosarcomas, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de próstata tal como adenocarcinomas de próstata, cáncer de riñón tal como carcinoma renal, cáncer de ovario tal como adenocarcinomas, cáncer de testículo, cáncer de endometrio, cáncer de cuello de útero tal como escamocelular y adenocarcinomas, cánceres de útero tales como adenocarcinomas, enfermedad de Hodgkin, linfomas, o leucemia. En una realización adicional, un kit incluye un anticuerpo o su fragmento funcional que compite con un anticuerpo LM-1, como se representa por un anticuerpo producido por una línea de células DSMZ con N.º de registro DSM ACC 2623, o representado por las secuencias de la cadena pesada y ligera que se muestran en las SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 o 9, y 11 o 13, para la unión a un antígeno (por ejemplo, la proteína NONO/nmt55) o una de la línea de células de adenocarcinoma de pulmón Colo-699 (DSMZ número de registro ACC 196), la línea de células de adenocarcinoma de pulmón DV-90 (DSMZ número de registro ACC 307) línea de células EPLC-272H de carcinoma de pulmón epidermoide (DSMZ número de registro ACC 383), línea de células LOU-NH91 de carcinoma de pulmón escamocelular (DSMZ número de registro ACC 393), células HT-29 (ATCC N.º de registro HTB-38;

El kit incluye también anticuerpos y sus fragmentos funcionales que se unen a células o a un antígeno (por ejemplo, proteína NONO/nmt55) que se unen al anticuerpo LM-1, como se representa por una línea de células DSMZ N.º de registro DSM ACC 2623, o representado por las secuencias de la cadena pesada y ligera que se muestran como las SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 o 9, y 11 o 13. En una realización, un kit incluye un anticuerpo o fragmento funcional que se une a una célula de adenocarcinoma o a una célula de carcinoma escamocelular a la cual se une el anticuerpo LM-1 que se representa por el anticuerpo producido por una línea de células DSMZ n.º de registro DSM ACC 2623 o representado por las secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera que se muestran como las SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 o 9, y 11 o 13, tal como una célula de adenocarcinoma de estómago (por ejemplo, difuso o intestinal, una célula de adenocarcinoma de páncreas, una célula de adenocarcinoma de colon, una célula de adenocarcinoma de mama, una célula de carcinoma escamocelular de esófago, a la cual se une el anticuerpo LM-1, que se representa por el anticuerpo producido por una línea de células DSMZ con N.º de registro DSM ACC 2623, o representada por las líneas de la cadena pesada y la cadena ligera que se muestran como las SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 o 9, y 11 o 13. En otra realización, un kit incluye un anticuerpo o fragmento funcional que se une a un adenocarcinoma de estómago (por ejemplo, difuso o intestinal) cáncer colorrectal tal como adenocarcinoma, carcinoma de ovario, cáncer de pulmón, tal como adenocarcinomas de pulmón, carcinoma de pulmón escamocelular y carcinoma microcítico, melanoma, carcinomas de mama lobulares y ductales, cáncer de mama tal como cáncer ductal o lobular invasivo, cáncer gástrico, cáncer de páncreas, tales como adenocarcinomas de páncreas (por ejemplo, ductal), sarcomas, cáncer gastrointestinal tal como cáncer de estómago, tumor de tejido nervioso o tumor cerebral tal como un glioma, cáncer de esófago tal como carcinoma escamocelulares esofágicos y adenocarcinomas, osteosarcoma, fibrosarcomas, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de próstata tal como adenocarcinomas de próstata, cáncer de riñón tal como carcinoma renal, cáncer de ovario tal como adenocarcinomas, cáncer de testículo, cáncer de endometrio, cáncer de cuello de útero tal como escamocelular y adenocarcinomas, cánceres de útero tales como adenocarcinomas, enfermedad de Hodgkin, linfoma, o leucemia, al cual se une el anticuerpo LM1, o se representa por el anticuerpo producido por la línea de células DSMZ con N.º de registro DSM ACC 2623, o representada por las secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera que se muestran como las SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 o 9, y 11 o 13. En una realización adicional, un kit incluye un anticuerpo o fragmento funcional que se une a una línea de células Colo-699 de adenocarcinoma de pulmón (DSMZ número de registro ACC 196), línea de células DV-90 de adenocarcinoma de pulmón (DSMZ número de registro ACC 307), línea de células EPLC-272H de carcinoma de pulmón epidermoide (DSMZ número de registro ACC 383), o línea de células LOU-NH91 de carcinoma escamocelular de pulmón (DSMZ número de registro ACC 393) a las que se une el anticuerpo LM-1, como se representa por un anticuerpo producido por una línea de células DSMZ con N.º de registro DSM ACC 2623, o representado por las secuencias de la cadena pesada y ligera que se muestran como SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 o 9, y 11 o 13.

El kit incluye también anticuerpos y sus fragmentos funcionales que incluyen una secuencia de la región variable de la cadena pesada o ligera con aproximadamente un 60 % o más de identidad con las regiones variables de la secuencia de la cadena pesada o ligera del anticuerpo LM-1, como se representa por un anticuerpo producido por una línea de células DSMZ con N.º de registro DSM ACC 2623, o representado por las secuencias de la cadena pesada y ligera que se muestran como las SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 o 9, y 11 o 13. En una realización, un kit incluye un anticuerpo o su derivado con una secuencia al menos del 60 % o más (por ejemplo 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, etc.) idéntica de la secuencia de la región variable de la cadena pesada que se muestra como la SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 o 9, o a una secuencia al menos un 60 % o más (por ejemplo, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, etc.) idéntica a una secuencia de la región variable de la cadena ligera que se muestra como la SEQ ID NO:11 o 13. En otra realización, un kit incluye un anticuerpo o un derivado con una secuencia al menos del 60 % o más (por ejemplo, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, etc.) idéntica a una secuencia de la región variable de la cadena pesada que se muestra como la SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 o 9, y a una secuencia al menos un 60 % o más (por ejemplo, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, etc.) idéntica a la secuencia de la región variable de la cadena pesada que se muestra como la SEQ ID NO:11 o 13. En realizaciones adicionales, un kit incluye un anticuerpo o derivado con una secuencia al menos 80-85 %, 85-90 %, 90-95 %, 95-100 % idéntica a una o más de las CDR en la secuencia de la región variable de la cadena pesada que se muestra como SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 o 9, (por ejemplo, los aminoácidos 24-35, 52-67 o 100-118 de la SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 o 9), o una o más de las CDR en la región variable de la cadena pesada del anticuerpo producido por una línea de células DSMZ con N.º de registro DSM ACC 262, o una secuencia al menos un 80-85 %, 85-90 %, 90-95 %, 95-100 % idéntica a una o más CDR en la secuencia de la región variable de la cadena ligera que se muestra como la SEQ ID NO:11 o 13 (por ejemplo, los aminoácidos 23-35, 51-58 o 90-101 de la SEQ ID NO:11), o una o más CDR en la región variable de la cadena ligera del anticuerpo producido por una línea de células DSMZ con N.º de registro DSM ACC 262.

En realizaciones adicionales, un kit incluye también un tratamiento proliferativo anticelular o un tratamiento inmunopotenciador o el agente terapéutico, o un agente antineoplásico un agente anticanceroso o un agente antitumoral o un agente antimetastásico, o un artículo de fabricación (por ejemplo, para la administración del anticuerpo, un tratamiento o terapia proliferativa anticelular o un tratamiento o terapia inmunopotenciadora en un sujeto por vía local, regional o sistémica). En aspectos concretos, las instrucciones son para tratar la proliferación celular indeseable o un trastorno proliferativo celular (por ejemplo, una neoplasia, cáncer o metástasis tumoral).

Los anticuerpos, fragmentos funcionales y el antígeno (por ejemplo, la proteína NONO/nmt55), y las formas modificadas son útiles para tratar un sujeto que necesita tratamiento. La invención proporciona por tanto métodos de utilizar anticuerpos, fragmentos funcionales, un antígeno (por ejemplo, la proteína NONO/nmt559 en el tratamiento (por ejemplo, terapéutico o profiláctico) de un sujeto que tiene o está en riesgo de tener una proliferación células indeseable, tal como un trastorno proliferativo celular o un trastorno hiperproliferativo. En una realización, un método incluye administrar un anticuerpo o su fragmento funcional (por ejemplo, un anticuerpo LM-1, que se representa por el anticuerpo produce una línea de células DSMZ con N.º de registro DSM ACC 2623 o representado por las secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera que se muestran como las SEQ ID NO:1, 5, 7 o 9, y 11 o 13 o un antígeno (por ejemplo, la proteína NONO/nmt55) a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener una proliferación celular indeseable (por ejemplo, un trastorno proliferativo celular) una cantidad eficaz para tratar la proliferación celular indeseable. En aspectos concretos, un trastorno proliferativo celular es una neoplasia maligna, tumor o cáncer, sólido o líquido, metastásico o no metastásico. En diversos aspectos, la proliferación celular indeseable (por ejemplo, un trastorno proliferativo celular) afecta o está presente al menos en parte en el cerebro, cabeza o cuello, mama, esófago, boca, nasofaringe, nariz o senos, estómago, duodeno, íleon, yeyuno, pulmón, hígado, páncreas, riñón, glándula adrenal, tiroides, vejiga, colon, recto, próstata, útero, endometrio, cuello del útero, ovario, médula ósea, ganglios linfáticos, sangre, huesos, testículos, piel o músculo, o sistema hematopoyético. En aspectos adicionales, la proliferación celular indeseable (por ejemplo, un trastorno proliferativo celular) incluye una neoplasia, tumor, cáncer o metástasis que afecta o está al menos en parte presente en la mama, pulmón, tiroides, cabeza y cuello, nasofaringe, nariz o senos, cerebro, médula espinal, glándula adrenal, ganglios linfáticos, tracto gastrointestinal boca, esófago, estómago, duodeno, íleon, yeyuno, intestino delgado, colon, recto, tracto genitourinario, útero, endometrio, ovario, cuello del útero, vejiga, testículo, pene, próstata, riñón, páncreas, glándula adrenal, hígado, hueso, médula ósea, ganglios linfáticos, sangre, músculo, piel o es hematopoyético. En aspectos más concretos, una neoplasia, tumor, cáncer o metástasis es un sarcoma, carcinoma, adenocarcinoma, melanoma, mieloma, blastoma, glioma, linfoma o leucemia. En aspectos concretos adicionales, una neoplasia, tumor o cáncer es un adenocarcinoma de estómago (por ejemplo, difuso o intestinal) cáncer colorrectal tal como adenocarcinoma, carcinoma de ovario, cáncer de pulmón, tal como adenocarcinomas de pulmón, carcinoma de pulmón escamocelular y carcinoma de pulmón microcítico, melanoma, carcinomas mamarios lobulares y ductales, cáncer de mama tal como cáncer ductal o lobular invasivo, cáncer gástrico, cáncer de páncreas, tal como adenocarcinomas pancreáticos (por ejemplo, ductal) sarcoma, cáncer gastrointestinal tal como cáncer de estómago, tumor de tejido nervioso o cerebral tal como glioma, cáncer de esófago tal como carcinoma y adenocarcinoma escamocelular esofágico, osteosarcoma, fibrosarcoma, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de próstata tal como adenocarcinoma de próstata, cáncer de riñón tal como carcinoma renal, cáncer de ovario tal como adenocarcinoma, cáncer de testículo, cáncer de endometrio, cáncer de cuello de útero tal como escamocelular o adenocarcinoma, cáncer de útero tal como adenocarcinoma, enfermedad de Hodgkin, o una de sus metástasis.

65

En otra realización, se describe en el presente documento administrar un anticuerpo o fragmento funcional (por ejemplo, un anticuerpo LM-1, como se representa por un anticuerpo producido por una línea de células DSMZ con N.º de registro DSM ACC 2623, o representado por las secuencias de la cadena pesada y ligera que se muestran como SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 o 9, y 11 o 13) o un antígeno (por ejemplo, la proteína NONO/nmt55) a un sujeto que tiene o está en riesgo de tener una metástasis, una cantidad eficaz para reducir o inhibir la dispersión o diseminación de un tumor, cáncer o neoplasia a otros sitios, localizaciones o regiones en el sujeto. En diversos aspectos, el método reduce o inhibe la metástasis de un tumor o un cáncer primarios en uno o más sitios diferentes, la formación o el establecimiento de una metástasis en uno o más sitios diferentes, inhibiendo o reduciendo por tanto la recidiva del tumor o el cáncer o la progresión del tumor o el cáncer, En aspectos adicionales, el método reduce o inhibe el crecimiento, la proliferación, la movilidad o la invasividad de las células tumorales o cancerosas que potencialmente o desarrollan, forman o establecen las metástasis; reduce o inhibe la formación o el establecimiento de las metástasis que surgen de un tumor o un cáncer primarios en uno o más sitios, localizaciones o regiones diferentes distintas del tumor o del cáncer primarios; reduce o inhibe el crecimiento o la proliferación de la metástasis en uno o más sitios, localizaciones o regiones distintas del tumor o del cáncer primarios después de la metástasis que se ha formado o se ha establecido, o reduce o inhibe la formación o el establecimiento de metástasis adicionales después que se ha formado o establecido la metástasis.

En otros aspectos concretos, la neoplasia, tumor o cáncer, o la metástasis empeora progresivamente o está en remisión En aspectos más adicionales, el tratamiento da como resultado el alivio o la mejora de uno o más síntomas físicos adversos asociados con un trastorno proliferativo celular, o una neoplasia, tumor o cáncer, o reduce o disminuye el volumen de la neoplasia, tumor o cáncer, inhibe o previene un aumento en el volumen de la neoplasia, tumor o cáncer, inhibe la progresión o el empeoramiento de la neoplasia, tumor o cáncer, estimula la lisis o apoptosis de las células de la neoplasia, tumor o cáncer, o inhibe, reduce o disminuye la proliferación o metástasis de la neoplasia, tumor o cáncer, o prolonga o amplía el lapso de vida del sujeto, o mejora la calidad de vida del sujeto.

Los métodos incluyen la administración a un sujeto por vía local, regional, o sistémica. Los sujetos ilustrativos (por ejemplo, mamíferos tales como seres humanos) incluyen candidatos para, y aquellos que experimentan, o que han experimentado un trastorno proliferativo anticelular o un trastorno antihiperproliferativo (por ejemplo, antineoplásico, antitumoral, anticanceroso o antimetastásico) o un tratamiento o terapia inmunopotenciador.

En diversos aspectos, un tratamiento proliferativo anticelular o un tratamiento o terapia inmunopotenciador incluye la resección quirúrgica, radioterapia, tratamiento con radiación, quimioterapia, inmunoterapia, hipertermia, un agente alquilante, antimetabolitos, extractos vegetales, alcaloides vegetales, nitrosourea, hormona, análogos de nucleósidos o nucleótidos, un linfocito, una célula plasmática, un macrófago, una célula dendrítica, un linfocito NK o un linfocito B, un anticuerpo, un factor de crecimiento celular, un factor de supervivencia celular, un factor diferenciativo celular, una citoquina, un interferón o una quimioquina.

Los anticuerpos y sus fragmentos funcionales son útiles para detectar, seleccionar para e identificar la presencia de células o un antígeno (por ejemplo, la proteína NONO/nmt55) que se une al anticuerpo LM-1. Se describen en el presente documento métodos para detectar o seleccionar células y antígenos (por ejemplo, la proteína NONO/nmt55) que se une al anticuerpo LM-1, como se representa por el anticuerpo por la línea celular DSMZ con N.º de registro DSM ACC 2623, o representado por las secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera que se muestran como las SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 o 9, y 11 o 13 y los métodos para identificar un sujeto que sean respetuosos con el tratamiento de acuerdo con los métodos de la invención. En una realización, el método incluye poner en contacto un material o muestra biológica con un anticuerpo o fragmento funcional en condiciones que permitan al unión entre el anticuerpo o fragmento celular y la célula o el antígeno que se une al anticuerpo LM-1, como se representa por el anticuerpo producido por una línea de células DSMZ con n.º de registro DSM ACC 2623 o representado por las secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera que se muestran como las SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 o 9, y 11 o 13, y evaluar la unión del anticuerpo o fragmento funcional a una célula o antígeno que se une al anticuerpo LM-1, como se representa por el anticuerpo producido por una línea de células DSMZ con N.º de registro DSM ACC 2623, o representada por las secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera que se muestran como las SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 o 9, y 11 o 13 La unión del anticuerpo o fragmento funcional a una célula o antígeno que se une al anticuerpo LM-1, como se representa por el anticuerpo producido por una línea de células DSMZ con n.º de registro DSM ACC 2623 o representado por las secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera que se muestran como las SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 o 9, y 11 o 13, indica que el material biológico contiene la célula o antígeno que se une al anticuerpo LM-1, como se representa por el anticuerpo producido por una línea de células DSMZ con N.º de registro DSM ACC 2623, o representada por las secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera que se muestran como las SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 o 9, y 11 o 13 En otra realización, el método incluye analizar una muestra biológica para la presencia de un antígeno al cual se une LM-1 (por ejemplo, NONO/nmt55). La presencia de una célula o antígeno (por ejemplo, NONO/nmt55) que se une a LM-1 identifica a un sujeto que es adecuado para el tratamiento de acuerdo con los métodos de la invención. En un aspecto, el material o muestra biológica se obtiene de un sujeto mamífero (por ejemplo, primate, tal como un ser humano).

Se describen en el presente documento métodos para diagnosticar un sujeto que tiene o está en riesgo aumentado de tener una proliferación celular indeseable o un trastorno proliferativo celular (por ejemplo, neoplasia, tumor o

cáncer, o metástasis), métodos para determinar o discernir la presencia o la extensión de una proliferación celular indeseable o anómala o un trastorno hiperproliferativo celular (por ejemplo, neoplasia, tumor o cáncer, o metástasis), así como los métodos para identificar un sujeto adecuado para el tratamiento con un anticuerpo LM-1, o un anticuerpo que se une a un antígeno de LM-1 (por ejemplo, NONO/nmt55). En diversas realizaciones, el método incluye poner en contacto un material o muestra biológica de un sujeto con un anticuerpo o fragmento funcional que compite con el anticuerpo LM-1, como se representa por el anticuerpo producido por la línea de células DSMZ con N.º de registro DSM ACC 2623) o representado por las secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera que se muestran como las SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 o 9, y 11 o 13 para la unión o un anticuerpo o fragmento funcional que se une a una célula o antígeno (por ejemplo, NONO/nmt55) al cual se une el anticuerpo LM-1, como se representa por el anticuerpo producido por la línea de células DSMZ con N.º registro. DSM ACC 2623, o representado por las secuencias de la cadena pesada y ligera que se muestra como las SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 o 9, y 11 o 13, o un anticuerpo o fragmento funcional que incluye la secuencia de la región variable de la cadena pesada o la cadena ligera, como se representa por el anticuerpo producido por la línea de células DSMZ con N.º de registro. DSM ACC 2623, o representada por las secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera que se muestran como las SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 o 9, y 11 o 13 en condiciones que permitan la unión del anticuerpo o fragmento funcional, y evaluar la unión del anticuerpo a una célula o antígeno (por ejemplo, NONO/nmt55) que se une al anticuerpo LM-1, como se representa por un anticuerpo producido por una línea de células DSMZ con N.º de registro DSM ACC 2623, o representada por las secuencias que se muestran como las SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 o 9, y 11 o 13. La presencia o la cantidad de una célula o un antígeno de LM-1 (por ejemplo, NONO/nmt55) puede estar correlacionada con la presencia o extensión de una neoplasia, tumor o cáncer, diagnosticando por tanto a un sujeto que tiene o está en riesgo aumentado de tener una proliferación celular indeseable o un trastorno proliferativo (por ejemplo, neoplasia, tumor o cáncer, o metástasis), o establecer la presencia o extensión de una neoplasia, tumor o cáncer. La presencia o cantidad de una célula o un antígeno (por ejemplo, NONO/nmt55) pueden identificar también un sujeto adecuado para el tratamiento con un anticuerpo LM-1, o un anticuerpo que se une a un antígeno de LM-1 (por ejemplo, NONO/nmt55), debido a una probabilidad de responder a tratamiento. En aspectos concretos, los métodos para diagnosticar a un sujeto identifican aquellos que tienen (por ejemplo, la presencia o extensión) o están en riesgo creciente de tener una proliferación celular indeseable o un trastorno proliferativo celular (por ejemplo neoplasia, tumor o cáncer, o metástasis). En un aspecto, el material o muestra biológica se obtiene de un sujeto mamífero (por ejemplo, primate, tal como un ser humano). En aspectos adicionales, el material o la muestra biológica comprende una biopsia, tal como biopsia de pulmón, páncreas, estómago, mama, esófago, ovario o útero.

Descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra una gráfica que representa el análisis funcional del anticuerpo LM-1 *in vitro*. Se midieron las consecuencias del tratamiento con el anticuerpo sobre la proliferación de líneas de células de carcinoma diferentes utilizando un ensayo de proliferación del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difeniltetrazolio ("MTT"), que muestra una inhibición dependiente de la concentración de la proliferación celular de LM-1 en la línea de células LOU-NH91 de carcinoma de pulmón o carcinoma de páncreas. El control para estos estudios agotó el sobrenadante del cultivo celular con anticuerpos IgM no relacionados añadidos a concentraciones similares.

Las Figuras 2A y 2B muestran una serie de gráficas de los resultados de los ensayos de reducción de MTT para la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial que muestra que el anticuerpo monoclonal LM-1 inhibe la proliferación celular y disminuye la supervivencia, o induce la apoptosis del carcinoma de células epidermoide EPLC-272H de las células pulmonares tras A) 24 horas de incubación; y B) 48 horas de incubación.

La Figura 3 muestra una gráfica que muestra que el anticuerpo LM-1 induce la apoptosis. En estos estudios se detectó la apoptosis de la línea de células LOU-NH91 de carcinoma de pulmón utilizando el ensayo de apoptosis ELISA.sup.PLUS para la detección de la muerte celular. El control en estos estudios agotó el sobrenadante del cultivo celular a una concentración similar.

Las Figuras 4A y 4B muestran una serie de gráficas de los resultados de un ELISA de muerte celular que muestran que el anticuerpo monoclonal LM-1 induce la apoptosis de las células LOU-NH91 después de A) 24 horas de incubación; y B) 48 horas de incubación.

Las Figuras 5A-5F muestran A) los espectros MALDI-TOF para LM-1; y los resultados de la selección para la unión del anticuerpo LM-1 a B) monosacáridos, C) disacáridos, D) trisacáridos, E) tetrasacáridos y F) oligosacáridos.

La Figura 6 muestra el peso corporal de ratones a los que se había inyectado LM-1, que se mantuvo durante 8 semanas después de la inyección. El peso corporal en el control sin inyección y el control inyectado sin IgM específica se redujo en casi un 20 % debido a la mala salud producida por la metástasis del hígado

La Figura 7 muestra los datos que indican que el anticuerpo LM-1 puede reducir el establecimiento de la metástasis, formación, o proliferación tumoral (crecimiento).

5 **La Figura 8A-8B** muestra el análisis de preparación de la membrana de células BxPC3 mediante electroforesis en gel de poliacrilamida 2D (PAGE). A) Proteínas fraccionadas transferidas a una membrana de PVDF y teñidas con anticuerpo LM-1; y B) Manchas de la membrana de PVDF que se unen a LM-1, que se superpusieron sobre un PAGE teñido de plata, y las manchas correspondientes se escindieron del gel y se sometieron a un análisis MALDI-TOF.

10 **Las Figuras 9A-9D** muestran la identificación de la diana de LM-1. A) Cromatografía en gel de extractos de BxPC-3; B)-D) se seleccionaron las fracciones 9 y 10 y se sometieron a cromatografía de intercambio aniónico y a la inmunotransferencia posterior con el anticuerpo LM-1.

15 **Las Figuras 10A-10C** muestran el ARNip transfectado a células BxPc-3 para regular por defecto la expresión de NONO/nmt55 y la unión reducida de LM-1. A) expresión de NONO/nmt55 regulada por defecto por el ARNip; B) Se redujo la unión de LM-1 a las células transfectadas con ARNip (flecha) y C) Control de la carga.

20 **Las Figuras 11A-11D** muestran la inmunoprecipitación de las células MKN con un anticuerpo dirigido contra nmt55, y la posterior tinción con A) mAb dirigido contra NONO/nmt55 de ratón/ HRP dirigido contra IgG de ratón; B), HRP dirigido contra IgG de ratón; C), LM-1 / HR dirigido contra IgM humana y D) HRP dirigido contra IgM humana. La flecha superior (peso molecular más elevado) es NONO, y la flecha inferior (peso molecular más bajo) es la cadena pesada de ratón.

25 **Las Figuras 12A-12B** muestran la inmunoprecipitación de las células BxPC-3 con anti nmt55, y la posterior tinción con A) LM1; y B) anti NONO/nmt55. Las flechas indican nmt55 y la cadena pesada de la IgG de ratón.

30 **Las Figuras 13A-13B** muestran la inmunoprecipitación de las células A549 con anti nmt55 y la posterior tinción con A) anti NONO/nmt55; y B) LM-1. Las flechas indican las posiciones de nmt55 y la cadena pesada de la IgG de ratón.

35 **Las Figuras 14A-14B** muestran los datos indicativos de la unión de LM-1 a la proteína NONO/nmt55-6xHis expresada de forma recombinante.

40 **La Figura 15** muestra los datos indicativos de la unión de LM-1 a la proteína NONO/nmt55-6xHis expresada de forma bacteriana.

45 **Las Figuras 16A-16C** muestran el análisis de electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) de A) expresión de nmt55 Banda 1) marcador de pesos moleculares Novex Sharp Banda 2) Muestrear el nivel del valor inicial que muestra la expresión de la proteína, Banda 3) T_{FINAL} que muestra el nivel de expresión de nmt55 posterior a la inducción térmica; B) nmt55 tras la purificación de Profina™ Banda 1) Marcador de pesos moleculares Novex Sharp, Banda 2) nmt55 purificado y concentrado a partir de la expresión periplásmica; y C) transferencia western de nmt55 tras la purificación con Profina™ Banda 1) marcador de pesos moleculares Novex Sharp, Banda 2) nmt55 purificado y concentrado detectado utilizando LM-lopt scFv.

Descripción detallada

50 La invención se basa, al menos en parte, en los anticuerpos que se unen a diversas células neoplásicas, cancerosas, tumorales y metastásicas.

55 La invención se basa también, al menos en parte, en la identificación de una diana de LM-1, es decir, un antígeno que se une a LM-1. Como se divulga en el presente documento, el anticuerpo LM-1 se une a la proteína de unión al octámero que contiene el dominio non-pou (NONO), conocida también como proteína de unión al ADN y al ARN nuclear de 54 kDa (p54nrb) y proteína nuclear de 55 kDa (nmt55) NONO/nmt55 se puede dirigir para el tratamiento de una neoplasia, cáncer, tumor o metástasis. NONO/nmt55 puede ser un indicador diagnóstico de una neoplasia, cáncer, tumor o metástasis. Por ejemplo, la detección de NONO/nmt55 sobre la superficie celular puede indicar la presencia de una neoplasia, cáncer, tumor o metástasis. NONO/nmt55 puede ser también una vacuna. Por ejemplo, NONO/nmt55 puede administrarse a un sujeto con una neoplasia, cáncer, tumor o metástasis que expresa la superficie celular de NONO/nmt55 a fin de estimular una respuesta inmunitaria contra una neoplasia, cáncer, tumor o metástasis.

60 Los anticuerpos de la invención incluyen anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos son proteínas que incluyen aminoácidos, o "restos" unidos covalentemente mediante un enlace amida o equivalente. El término "monoclonal", cuando se usa en referencia a un anticuerpo, se refiere a un anticuerpo que se basa en, obtenido o derivado de un clon único, incluyendo cualquier clon eucariota, procarriota, o fago. Un anticuerpo "monoclonal" se define por tanto en el presente documento estructuralmente, y no el método por el cual se produce.

65 Los anticuerpos de la invención pueden pertenecer a cualquier clase de anticuerpo, IgM, IgG, IgE, IgA, IgD, o a cualquier subclase. Las subclases ilustrativas de IgG son IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

Los anticuerpos de la invención pueden tener secuencias de la cadena ligera kappa lambda tanto de anticuerpos de longitud completa como de anticuerpos que se producen naturalmente, sus mezclas (es decir, fusiones de secuencias de cadenas kappa y lambda), y sus subsecuencias/fragmentos. Las moléculas de anticuerpos que se producen naturalmente contienen dos cadenas ligera kappa o dos cadenas ligeras lambda

5 Las secuencias de aminoácidos y las secuencias de ácidos nucleicos del anticuerpo LM-1, como se representan por diversas secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera, las SEQ ID Nos:1-10, son como sigue:

10 La región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal humano LM-1, como se representa por las secuencias de aminoácidos (SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 y 9) y las secuencias de ácidos nucleicos (SEQ ID NO:2, 4, 6, 8 y 10), respectivamente, con diferencias que se muestran en negra:

15 La secuencia de aminoácidos de la secuencia de la región variable de la cadena pesada (VH) de LM-1, como se representa por la SEQ ID NO:1:

**QVQLQESGPGLVKPSPTLSLTCVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLE
WIGYIYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY
CARVDARYDYVWGSYRYDAFDIWGQGTMTVSS**

20 La secuencia de aminoácidos de la secuencia de la región variable de la cadena pesada (VH) de LM-1, como se representa por la SEQ ID NO:3 (1BTA1.16VH):

**QVQLQESGPGLVKPSQTLSTLTCVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLE
WIGYIYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC
ARVDARYDYVWGSYRYDAFDIWGQGTMTVSS**

La secuencia de aminoácidos de la secuencia de la región variable de la cadena pesada (VH) de LM-1, como se representa por la SEQ ID NO:5 (1BTA1.7VH):

**QVQLQESGPGLVKPSPTLSLTCVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLE
WIGYIYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC
ARVDARYDYVWGSYRFDIAFDIWGQGTMTVSS**

25 La secuencia de aminoácidos de la secuencia de la región variable de la cadena pesada (VH) de LM-1, como se representa por la SEQ ID NO:7 (1BTA2.5 VH):

**QLQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGGSISSGGYYWSWIRQHPGKGLE
WIGYIYSGSTYYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC
ARVDARYDYVWGSYRYDAFDIWGQGTMTVSS**

30 La secuencia de aminoácidos de la secuencia de la región variable de la cadena pesada (VH) de LM-1, como se representa por la SEQ ID NO:9 (VHL1opt):

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGGSISSGGYYWSWIRQAPGKGL
EWVIGYIYSGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA
VYYCARVDARYDYVWGSYRYDAFDIWGQGTMTVSS**

35 La secuencia de nucleótidos de la secuencia de la región variable de la cadena pesada (VH) de LM-1, como se representa por la SEQ ID NO:2:

ES 2 595 362 T3

CCGACCCCTGT CCCTCACCTG CGCTGTCTCT GTGGCTCCA TCAGCAGTGG TGGTTACTAC	60
TGGAGCTGGA TCCGCCAGCA CCCAGGGAAG GGCCTGGAGT GGATTGGGTA CATCTATTAC	120
AGTGGGAGCA CCTACTACAA CCCGTCCCTC AAGAGTCGAG TTACCATATC AGTAGACACG	180
TCTAAGAACC AGTTCTCCCT GAAGCTGAGC TCTGTGACTG CCGCGGACAC GGCCGTGTAT	240
TACTGTGCGA GAGTTGATGC GCGATATGAT TACGTTTGGG GGAGTTATCG TTATGATGCT	300
TTTGATATCT GGGGCCAAGG AACCTGGTC ACGTCTCTT CA	333

La secuencia de nucleótidos de la secuencia de la región variable de la cadena pesada (VH) de LM-1, como se representa por la SEQ ID NO:4:

5

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCA
 CAGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCA
 GTGGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGG
 GCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTACTA
 CAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCT
 AAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACA
 CGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGTTGATGCGCGATATGATTACGT
 TTGGGGGAGTTATCGTTATGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGG
 ACAATGGTCACCGTCTCTTCA

La secuencia de nucleótidos de la secuencia de la región variable de la cadena pesada (VH) de LM-1, como se representa por la SEQ ID NO:6:

10

CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCA
 CCGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCA
 GTGGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGG
 GCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTACTA
 CAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCT

 AAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACA
 CGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGTTGATGCGCGATATGATTACGT
 TTGGGGGAGTTATCGTTTGGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGG
 ACAATGGTCACCGTCTCTTCA

ES 2 595 362 T3

La secuencia de nucleótidos de la secuencia de la región variable de la cadena pesada (VH) de LM-1, como se representa por la SEQ ID NO:8:

CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCA
CAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCA
GTGGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCACCCAGGGAAGG
GCCTGGAGTGGATTGGGTACATCTATTACAGTGGGAGCACCTACTA
CAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTTACCATATCAGTAGACACGTCT
AAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACTGCCGCGGACA
CGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGTTGATGCGCGATATGATTACGT
TTGGGGGAGTTATCGTTATGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGG
ACAATGGTCACCGTCTCTTCA

- 5 La secuencia de nucleótidos de la secuencia de la región variable de la cadena pesada (VH) de LM-1, como se representa por la SEQ ID NO:10:

GAGGTGCAGCTGGTCGAGAGCGGGGGAGGCCTGGTGCAGC
CAGGGGGATCTCTGAGACTGAGCTGCGCCGTGAGCGGCGGATCTAT
TTCCAGCGGGGGATATTATTGGTCTTGGATCAGACAGGCTCCCGGA
AAGGGGCTGGAATGGGTACATCGGCTACATCTACTACAGCGGCAGC
ACCTACTACGCCGACAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGG
GACAACAGCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGG
GCCGAGGACACCGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGTGGACGCCAGA
TACGACTACGTGTGGGGCAGCTACAGATACGACGCCTTCGACATCT
GGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGTCTTCT

- 10 Las regiones variables de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal humano LM-1, como se representa por las secuencias de aminoácidos (SEQ ID NO: 11 y 13) y las secuencias de ácidos nucleicos (SEQ ID NO:12 y 14), respectivamente, son como sigue

- 15 La secuencia de aminoácidos de la secuencia de la región variable de la cadena ligera (VL) de LM-1, como se representa por la SEQ ID NO:11:

QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQLPGTAPKLLI

YDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLS
AGWVFGGGTKLTVLGQ

- 20 La secuencia de aminoácidos de la secuencia de la región variable de la cadena ligera (VL) de LM-1, como se representa por la SEQ ID NO:13 (VKL1opt):

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRSGSSSNIGNNYVSWYQQKPKAPK
LLIYDNNKEPSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQGTWD
SSLSAGWVFGQGTKVEIKR

La secuencia de aminoácidos de la secuencia de la región variable de la cadena ligera (VL) de LM-1, como se representa por la SEQ ID NO: 15:

MACPGFLWALVISTCLEFSMASWAQSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSG
 SSSNIGNNNYVSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSAT
 LGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSAGWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSV
 TLFPPS
 SEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSN
 N KYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

5 La secuencia de nucleótidos de la secuencia de la región variable de la cadena ligera (VL) de LM-1, como se representa por la SEQ ID NO: 12 (1BTA1.16 VL):

CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCCAGGAC
 AGAAGGTCACCATCTCCTGCTCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGGAA
 TAATTATGTATCCTGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACAGCCCCAAA
 CTCCTCATTTATGACAATAATAAGCGACCCTCAGGGATTCTTGACC
 GATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACGTCAGCCACCCTGGGCATCAC
 CGGACTCCAGACTGGGGACGAGGCCGATTATTACTGCGGAACATG
 GGATAGCAGCCTGAGTGCTGGTTGGGTGTTTCGGCGGAGGGACCAA
 GCTGACCGTCCTAGGTCAG

10 La secuencia de nucleótidos de la secuencia de la región variable de la cadena ligera (VL) de LM-1, como se representa por la SEQ ID NO: 14 (VKL1opt),

GACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTG
 GGCGACAGAGTGACCATCACCTGCAGAAGCGGCAGCAGCAGCAAC
 ATCGGCAACAATTATGTCTCTTGGTATCAGCAGAAACCTGGCAAGG
 CCCCCAAGCTGCTGATCTACGACAACAACAAGAACCAGCGGCG
 TGCCCAGCCGGTTTAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCCGACTTCACCT
 GACCATCAGCAGCCTGCAGCCCGAGGATTCGCCACCTACTACTGT

CAGGGGACATGGGATAG
 CAGCCTGTCCGCCGGCTGGGTGTTTCGGCCAGGGAACAAAG
 GTGGAGATCAAGAGA

15 Las CDR previstas, de las cuales existen tres en cada una de la cadena pesada y la cadena ligera, se denotan convenientemente en el presente documento como HC-CDR1, HC-CDR2 y HC-CDR3; y LC-CDR1, LC-CDR2 y LC-CDR3. Las posiciones de las CDR se basan en las definiciones de Kabat (por ejemplo, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th Ed. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service (1987), y Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. US Department of Health and Human Services, Public Health Service (1991)), excepto que la numeración de las CDR se base en el número de restos de aminoácidos de las secuencias que se muestran en el presente documento comenzando desde el extremo amino y no sigan el sistema de numeración de Kabat. Se modeló la colocación de la CDR de la región variable de la cadena pesada después de la región variable del anticuerpo herceptina (archivo PDB 1N8Z) debido a un 95 % de identidad de la secuencia con los restos del marco, y se modeló la colocación de la CDR de la región variable de la cadena ligera después del archivo PDB 1RHEa debido a un 82 % de identidad de la secuencia con los restos del marco.

25 Las secuencias de las CDR previstas de la cadena de la región variable de la cadena pesada ilustrativa son la CDR1; VSGGSISSGGYY, CDR2; YIYYSGSTYYNPSLKS, y CDR3; VDARYDYVWGSYRYDAFDI. La CDR1 de la

cadena pesada expande los nucleótidos 72-105 que codifican los aminoácidos 24-35, la CDR2 expande los nucleótidos 156-201 que codifican los aminoácidos 52-67 y la CDR3 expande los nucleótidos 300-354 que codifican los aminoácidos 100-118.

5 Las secuencias de las CDR previstas de la cadena ligera de la región variable son 90-101, CDR1; SGSSSNIGNNYVS, CDR2; DNNKRPSG, y CDR3; GTWDSSLSAGWV. La CDR1 de la cadena ligera lambda expande los nucleótidos 69-105 que codifica los aminoácidos en las posiciones 23-35. La CDR2 expande los nucleótidos 153-174 que codifican los aminoácidos 51-58 y la CDR3 expande los nucleótidos 270-303 y codifica los aminoácidos 90-101.

10 De acuerdo con la invención, se proporcionan anticuerpos aislados y purificados y fragmentos funcionales (por ejemplo, unión a célula o a antígeno) estructural y/o funcionalmente relacionados con el anticuerpo LM-1, como ha definido en las SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 o 9, y 11 o 13, respectivamente. En diversas realizaciones, los anticuerpos y fragmentos funcionales compiten con el anticuerpo LM-1 que se representa por el anticuerpo producido por una línea de células DSMZ N.º de registro DSM ACC 2623 o representado por las secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera que se muestran como las SEQ ID NO:1, 5, 7 o 9, y 11 o 13 para la unión a una célula o antígeno (por ejemplo, NONO/nmt55). En realizaciones adicionales, los anticuerpos y fragmentos funcionales compiten con el anticuerpo LM-1 que se representa por el anticuerpo producido por una línea de células DSMZ N.º de registro DSM ACC 2623 o representado por las secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera que se muestran como las SEQ ID NO:1, 5, 7 o 9, y 11 o 13 para la unión a un antígeno (por ejemplo, NONO/nmt55) o a una célula de adenocarcinoma o a una célula escamosa.

25 De acuerdo con la invención, se proporcionan también anticuerpos aislados y purificados y fragmentos funcionales (por ejemplo., unión a célula o unión a antígeno) que se unen a la proteína NONO/nmt55. En diversas realizaciones, los anticuerpos y fragmentos funcionales se unen a una región de la secuencia de aminoácidos NONO-nmt55 del extremo N (por ejemplo, aminoácidos 1-300 de NONO-nmt55). En un aspecto, NONO-nmt55 incluye una secuencia que se muestra como:

```

1  MQSNKTFNLE KQNHTPRKHH QHHHQQQHHQ QQQQPPPPP IPANGQASS
51  QNEGLTIDLK NFRKPGEKTF TQRSRLFVGN LPPDITEEEM RKLFEKYGKA
101 GEVFIHKDKG FGFIRLETRT LAEIAKVELD NMPLRGKQLR VRFACHSASL
151 TVRNLPQYVS NELLEEAHSV PGQVERAVVI VDDRGRPSGK GIVEFSGKPA
201 ARKALDRCSE GSFLLTTFPR PVTVEPMDQL DDEEGLPEKL VIKNQPFHKE
251 REQPPRFAQP GSFYEYAMR WKALIEMEKQ QDQVDRNIK EAREKLEMEM
301 EAARHEHQVM LMRQDLMRRQ BELRRMEELH NQEVQKRKQL ELRQEEERRR
351 REEEMRRQQE EMMRRQQEGF KGTFFDAREQ EIRMGQMAMG GAMGINNFGA
401 MPPAPVPAGT PAPPGPATMM PDGTLGLTTP TTERFGQAAT MEGIGAIGGT
451 PPAFNRAAPG AEFAPNKRRR Y
    
```

30 En otro aspecto, NONO-nmt55 incluye una secuencia que se muestra como:

```

1  MQSNKTFNLE KQNHTPRKHH QHHHQQQHHQ QQQQPPPPP IPANGQASS
51  QNEGLTIDLK NFRKPGEKTF TQRSRLFVGN LPPDITEEEM RKLFEKYGKA
101 GEVFIHKDKG FGFIRLETRT LAEIAKVELD NMPLRGKQLR VRFACHSASL
151 TVRNLPQYVS NELLEEAHSV PGQVERAVVI VDDRGRPSGK GIVEFSGKPA
201 ARKALDRCSE GSFLLTTFPR PVTVEPMDQL DDEEGLPEKL VIKNQPFHKE
251 REQPPRFAQP GSFYEYAMR WKALIEMEKQ QDQVDRNIK EAREKLEMEM
    
```

35 El término "unido," o "unión," cuando se usa en referencia a un anticuerpo o fragmento funcional, significa que el anticuerpo o fragmento funcional interactúa a nivel molecular con un epítipo correspondiente (determinante antigénico) presente en una célula o en un antígeno (por ejemplo, NONO-nmt55) Los epitopos de antígenos que comprende aminoácidos incluyen normalmente secuencias relativamente cortas, por ejemplo, de aproximadamente cinco a 15 aminoácidos de longitud. Los epitopos pueden ser contiguos o no contiguos. Se forma un epítipo de una secuencia de aminoácidos no contigua debido al plegamiento de la proteína. Los expertos en la técnica conocen las técnicas para identificar epítipos e incluyen seleccionar los oligopéptidos que se solapan para la unión a un anticuerpo (por ejemplo, Patente de Estados Unidos N.º 4.708.871), kits de bibliotecas de péptidos de expresión en fagos, que están comercialmente disponibles para la cartografía de epítipos (New England BioLabs). Los epítipos pueden identificarse también por inferencia cuando se usan secuencias peptídicas para la longitud del epítipo con el fin de inmunizar animales a partir de los cuales se obtienen los anticuerpos que se unen a la secuencia peptídica y se pueden prever utilizando programas informáticos tales como BEPITOPE (Odorico et al., J. Mol. Recognit. 16:20 (2003)).

50 La invención proporciona además anticuerpos y fragmentos funcionales que inhiben, disminuyen o reducen el crecimiento o la proliferación celular o estimulan o inducen la muerte celular, la lisis o la apoptosis.

El término "identidad" y sus variaciones gramaticales significa que dos o más entidades a las que se hace referencia son iguales. De esta manera, cuando son idénticas dos secuencias de anticuerpos, tienen la misma secuencia de aminoácidos, al menos en la región o parte a la que se hace referencia. Cuando son idénticas dos secuencias de ácidos nucleicos, tienen la misma secuencia de polinucleótidos, al menos en la región o parte a la que se hace referencia. La identidad puede ser sobre un área definida (región o dominio) de la secuencia. Un "área de identidad" se refiere a una parte de dos o más entidades a las que se hace referencia que son iguales. De esta manera, dos secuencias de proteínas o de ácidos nucleicos son idénticas en una o más regiones de la secuencia, comparten identidad en esta región. Las identidades ilustrativas son anticuerpos y fragmentos funcionales con una secuencia de aminoácidos con un 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o más de identidad de secuencia con un anticuerpo o fragmento funcional de referencia, por ejemplo, el anticuerpo LM-1, como se representa por el anticuerpo producido por una línea de células DSMZ con N.º de registro DSM ACC 2623, y representado por las secuencias de la cadena pesada y ligera que se muestran como las SEQ ID NO: 1, y 11 o una de sus subsecuencias.

Los términos "homólogo" u "homología" significan que dos o más entidades a las que se hace referencia comparten al menos una identidad parcial sobre una región o parte dada. "Áreas, regiones o dominios" de homología o identidad significan que una parte de dos o más entidades a las que se hace referencia comparten homología o son iguales. De esta manera, cuando dos secuencias de anticuerpos son idénticas en una o más regiones de la secuencia, comparten identidad en estas regiones. "Homología sustancial" significa que una molécula se conserva estructural o funcionalmente de tal manera que tiene o está previsto que tenga al menos una estructura o función parcial de una o más de las estructuras o funciones (por ejemplo, una función biológica) de la molécula de referencia, o de la región relevante/correspondiente de la molécula de referencia con la comparte homología.

La extensión de la identidad (homología) entre dos secuencias puede discernirse utilizando un programa informático y un algoritmo matemático conocido en la técnica. Dichos algoritmos que calculan el porcentaje de identidad de la secuencia (homología) tiene en cuenta generalmente huecos de secuencia y emparejamientos incorrectos sobre la región o área comparativa. Por ejemplo, un algoritmo de búsqueda BLAST (por ejemplo, BLAST 2.0) (véase, por ejemplo, Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403 (1990), públicamente disponible a través de NCBI) tiene parámetros de búsqueda ilustrativos, como sigue: Emparejamiento incorrecto -2; apertura de hueco 5; extensión de hueco 2 Para comparaciones entre las secuencias polipeptídicas, un algoritmo BLASTP se usa normalmente en combinación con una matriz de puntuación, tal como PAM100, PAM 250, BLOSUM 62 o BLOSUM 50. Se usan también programas de comparación de secuencias FASTA (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3) y SSEARCH Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988); Pearson, Methods Mol Biol. 132:185 (2000); y Smith et al., J. Mol. Biol. 147:195 (1981)). Programs for quantitating protein structural similarity using Delaunay-based topological mapping have also been developed (Bostick et al., Biochem Biophys Res Commun. 304:320 (2003)).

Se puede determinar la afinidad mediante la constante de asociación (K_a) y disociación (K_d). La constante de afinidad del equilibrio, K , es la relación de K_a/K_d . Las constantes de asociación (K_a) y disociación (K_d) se pueden medir utilizando resonancia de plasmón superficial (SPR) (Rich y Myszka, Curr. Opin. Biotechnol. 11:54 (2000); Englebienne, Analyst. 123:1599 (1998)). La instrumentación y los métodos para la detección y vigilancia en tiempo real de las constantes de unión se conocen y están comercialmente disponibles (BiaCore 2000, Biacore AB, Upsala, Suecia; y Malmqvist, Biochem. Soc. Trans. 27:335 (1999)).

Se describen y se proporcionan también en el presente documento anticuerpos y fragmentos funcionales con la condición de que las formas modificadas retengan, al menos una parte de una actividad o función de un anticuerpo no modificado o de referencia o de un fragmento funcional.

Como se usa en el presente documento, el término "modificar" y sus variaciones gramaticales, significa que la composición se aparta de una composición de referencia Dichas proteínas, ácidos nucleicos y otras composiciones modificadas pueden tener más o menos actividad que o una función distinta de una proteína, ácido nucleico, o composición no modificada de referencia.

Las modificaciones que incluyen sustituciones, adiciones y deleciones, se pueden denominar "variantes." Los ejemplos no limitantes específicos de variantes de aminoácidos incluyen el anticuerpo LM-1 que se representa por el anticuerpo producido por una línea de células DSMZ N.º de registro DSM ACC 2623 o representado por las secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera que se muestran como las SEQ ID NO:1, 5, 7 o 9, y 11 o 13 o los fragmentos y las subsecuencias.

Como se usa en el presente documento, el término "fragmento" o "subsecuencia" significa una parte de la molécula de longitud completa. De esta manera, un fragmento o subsecuencia de un anticuerpo tiene uno o más aminoácidos menos que un anticuerpo de referencia intacto de longitud completa (por ejemplo, una o más deleciones de aminoácidos internos o terminales procedentes tanto de los términos amino o carboxi como de las regiones variables o constantes de la cadena pesada o ligera). Un fragmento de ácido nucleico tiene al menos un nucleótido menos que la secuencia de ácido nucleico comparativa de longitud completa. Los fragmentos, por tanto, pueden ser de cualquier longitud hasta la molécula nativa de longitud completa.

Los términos "fragmento funcional" y "subsecuencia funcional" cuando se refieren a un anticuerpo se refieren a una parte de un anticuerpo con una función o actividad. Por ejemplo, un fragmento funcional puede retener una o más funciones o actividades parciales como un anticuerpo de referencia intacto, por ejemplo, una función o actividad del anticuerpo LM-1, que se representa por el anticuerpo producido por una línea de células DSMZ con N.º de registro DSM ACC 2623, o representado por las secuencias de la cadena pesada y ligera que se muestran como SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 o 9, y 11 o 13. Por ejemplo, una subsecuencia del anticuerpo LM-1 que compite para la unión del anticuerpo LM-1 intacto de longitud completa, que se representa por un anticuerpo producido por una línea de células DSMZ con N.º de registro DSM ACC 2623, o representado por las secuencias de la cadena pesada y ligera que se muestra como las SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 o 9, y 11 o 13 para una célula o para un antígeno (por ejemplo, NONO/nmt55), o que se une a una célula o antígeno (por ejemplo, NONO/nmt55) al cual se une el anticuerpo LM-1 intacto de longitud completa que se considera una subsecuencia funcional.

Una "sustitución conservativa" es la sustitución de un aminoácido por un resto similar biológica, química o estructuralmente. biológicamente similar significa que la sustitución no destruye la actividad biológica, por ejemplo, la unión a la célula o la proliferación celular que inhibe o induce la apoptosis o que estimula la actividad. Estructuralmente similares significa que los aminoácidos tienen cadenas secundarias con longitud similar, tales como alanina, glicina y serina, o un tamaño similar. Similitud química significa que los restos tienen la misma carga o son ambos hidrófilos o hidrófobos. Los ejemplos concretos incluyen la sustitución de un resto hidrófobo, tal como isoleucina, valina, leucina o metionina para otro, o la sustitución de un resto polar por otros, tal como la sustitución de arginina por lisina, ácido glutámico por ácido aspártico, o glutamina por asparagina, serina por treonina, y similares.

En realizaciones concretas, una secuencia de la región hipervariable de la cadena pesada o ligera o de una región de la misma, tal como una CDR (CDR1, CDR2 o CDR3; los aminoácidos 24-35, 52-67 o 100-118 de la SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7 o 9, o los aminoácidos 23-35, 51-58 o 90-101 de la SEQ ID NO: 11) o la FR tendrá 1-10, 1-5, 1-3 o menos (por ejemplo, 1 o 2) sustituciones de aminoácidos. En una realización adicional, una sustitución de aminoácido en una secuencia de la región hipervariable de la cadena pesada o ligera no está dentro de más de una CDR. En una realización adicional, una sustitución en una secuencia de la región hipervariable de la cadena pesada o ligera no está dentro de una CDR. En otra realización, una sustitución en una secuencia de la región hipervariable no está dentro de una FR.

El efecto de una modificación dada puede evaluarse fácilmente a fin de identificar los anticuerpos y los fragmentos funcionales que retienen al menos una parte de la actividad de unión de la célula o antígeno (por ejemplo, NONO/nmt55), la afinidad o la función del anticuerpo o la actividad del anticuerpo no modificado, por ejemplo, el anticuerpo LM-1 producido por la línea de células DSMZ con N.º de registro DSM ACC 2623, o representado por las secuencias pesada y ligera que se muestran como las SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 o 9, y 11 o 13. Por ejemplo, una sustitución de aminoácido en una región variable (por ejemplo, dentro o fuera de CDR1, CDR2 o CDR3) del anticuerpo LM-1, que se representa por el anticuerpo producido por una línea de células DSMZ con N.º de registro DSM ACC 2623 o representado por las secuencias de la cadena pesada y ligera que se muestran como SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 o 9, y 11 o 13 se pueden evaluar para la unión a la célula o al antígeno (por ejemplo, NONO/nmt55), que inhibe la proliferación celular o reduce la actividad, induciendo o estimulando la muerte celular, la lisis o la apoptosis, etc.

Se puede usar el análisis de la mutabilidad regional para prever el efecto de sustituciones concretas en regiones determinantes de la complementariedad (CDR) y en regiones marco (FR) (Shapiro et al., J Immunol. 163:259 (1999)). En resumen, la comparación de las secuencias indica una jerarquía o mutabilidad entre secuencias de dinucleótidos y trinucleótidos localizados en el ADN intrínico de Ig que prevé regiones que son más o menos mutables. Se pueden usar relaciones de estructura-actividad cuantitativa (QSAR) para identificar la naturaleza del dominio de reconocimiento del anticuerpo y, por tanto, los aminoácidos que participan en la unión del ligando. Los modelos predictivos basados en QSAR pueden a su vez utilizarse para prever el efecto de sustituciones (mutaciones). Por ejemplo, se ha utilizado el efecto de las mutaciones sobre la constante de asociación y disociación de un anticuerpo que interactúa con su antígeno para construir modelos predictivos cuantitativos para ambas constantes cinéticas (K_a and K_d) que a su vez se usan para prever el efecto de otras mutaciones sobre el anticuerpo (De Genst et al., J Biol Chem. 277:29897 (2002)). El técnico experto puede por tanto utilizar dichos análisis para identificar las sustituciones de aminoácidos de los anticuerpos y los fragmentos funcionales que dan probablemente como resultado un anticuerpo o fragmento funcional que retiene al menos la actividad o la función parcial del anticuerpo o fragmento funcional no sustituido.

Las sustituciones de aminoácidos pueden ser con el mismo aminoácido, excepto que el aminoácido que se produce naturalmente se sustituye con un aminoácido de forma D Las modificaciones incluyen por tanto uno o más D-aminoácidos, sustituidos por L-aminoácidos, o mezclas de D-aminoácidos sustituidos por L-aminoácidos. Las modificaciones incluyen también análogos estructurales y funcionales, por ejemplo, peptidomiméticos que tienen aminoácidos sintéticos o no naturales o análogos de aminoácidos y las formas derivatizadas.

Las formas modificadas incluyen además secuencias derivatizadas, por ejemplo, aminoácidos en los que los grupos amino libres forman clorhidratos de aminas, grupos p-tolueno sulfonilo, grupos carbobenzoxi; los grupos carboxi

libres procedentes de sales, ésteres metílicos y etílicos; los grupos hidroxilo libres que forman derivados de O-acilo u O-alquilo, así como los derivados de aminoácidos que se producen naturalmente, por ejemplo, 4-hidroxiprolina, para prolina, 5-hidroxilisina para lisina, homoserina para serina, ornitina para lisina, etc. Se pueden producir modificaciones utilizando los métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, modificaciones y mutagénesis dirigidas al sitio basadas en la PCR, mutagénesis mediante delección e inserción, modificación química y mutagénesis, reticulación, etc.).

Las formas modificadas incluyen adiciones e inserciones. Por ejemplo, una adición puede ser una unión covalente o una unión no covalente de cualquier tipo de molécula a una proteína (por ejemplo), ácido nucleico u otra composición. Normalmente, las adiciones e inserciones confieren una función o actividad distinta.

Las adiciones e inserciones incluyen un polipéptido de fusión (quimérico) o secuencias de ácido nucleico, que es una secuencia que tiene una o más moléculas no normalmente presentes en una secuencia nativa de referencia (natural) unida covalentemente a la secuencia. Un ejemplo concreto es una secuencia de aminoácidos de otra proteína (por ejemplo, anticuerpo) para producir una proteína multifuncional (por ejemplo, anticuerpo multiespecífico).

De acuerdo con la invención, se proporcionan anticuerpos, ácidos nucleicos, y otras composiciones que incluyen un dominio heterólogo. De esta manera, un dominio heterólogo puede consistir en cualquiera de varios diferentes tipos de restos funcionales pequeños o grandes. Dichos restos incluyen ácidos nucleicos, péptidos, hidratos de carbono, lípidos o compuestos orgánicos pequeños, tal como un fármaco (por ejemplo, un agente antiproliferativo celular), metales (oro, plata), etc. un dominio heterólogo puede ser una adición o inserción de un aminoácido.

Los ejemplos no limitantes concretos de dominios heterólogos incluyen, por ejemplo, etiquetas, marcas detectables y agentes citotóxicos. Los ejemplos específicos de etiquetas y marcas detectables incluyen enzimas (peroxidasa de rábano picante, ureasa, catalasa, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, cloranfenicol transferasa); sustratos enzimáticos; ligandos (por ejemplo, biotina); receptores (avidina); radionucleidos (por ejemplo, C¹⁴, S³⁵, P³², P³³, H³, ¹¹²⁵, ¹¹³¹, galio-67 y 68, escandio-47, indio 111, radio-223); T7-, His-, myc-, HA- y etiquetas FLAG; reactivos densos en electrones; moléculas de transferencia de energía; marcas paramagnéticas; fluoróforos (fluoresceína, fluoroescamina, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofococianina); cromóforos; agentes quimioluminiscentes (imidazol, luciferasa, acridinio, oxalato); y agentes bioluminiscentes. Los ejemplos específicos de agentes citotóxicos (citotoxinas) incluyen difteria, toxina, toxina del cólera y ricina.

Los ejemplos adicionales de dominios heterólogos incluyen, por ejemplo, agentes proliferativos anticelulares (por ejemplo, agentes antineoplásicos, agentes antitumorales o anticancerosos o agentes antimetastásicos). Los ejemplos no limitantes específicos de agentes proliferativos anticelulares (por ejemplo, agentes antineoplásicos, agentes antitumorales o anticancerosos, o agentes antimetastásicos, citotoxinas, etc.) se divulgan en el presente documento y se conocen en la técnica.

Se pueden insertar secuencias enlazadoras entre la proteína (por ejemplo, anticuerpo), ácido nucleico, u otra composición y la adición o inserción (por ejemplo, dominio heterólogo) de tal manera que dos entidades mantienen, al menos en parte, una función o actividad distinta. Las secuencias enlazadoras pueden tener una o más propiedades que incluyen una estructura flexible, una incapacidad para formar una estructura secundaria ordenada o un carácter hidrófobo o cargado que podría promover o interactuar con cualquier dominio. Los aminoácidos que se encuentran normalmente en regiones flexibles de la proteína incluyen Gly, Asn y Ser. Pueden utilizarse otros aminoácidos casi neutros, tales como Thr y Ala en la secuencia enlazadora. La longitud de la secuencia enlazadora puede variar (véase, por ejemplo Patente de estados Unidos N.º 6.087.329). Los enlazadores incluyen agentes de reticulación química y agentes de conjugación, tales como derivados de sulfo-succinimidilos (sulfo-SMCC, sulfo-SMPB), disuccinimidil suberato (DSS), disuccinimidil glutarato (DSG) y disuccinimidil tartrato (DST).

Los ejemplos adicionales de adiciones incluyen glicosilación, ácidos grasos, lípidos, acetilación, fosforilación, amidación, formilación, ubiquitinación, y derivatización mediante grupos protectores/bloqueantes y cualquiera de numerosas modificaciones químicas. Otras permutaciones y posibilidades serán fácilmente evidentes para las personas normalmente expertas en la materia, y se consideran que están comprendidas en el alcance de la invención.

El término "aislado" utilizado como un modificador de una composición significa que la composición se prepara manualmente o se separa a partir de uno o más componentes diferentes en su entorno in vivo que se produce naturalmente. Generalmente, las composiciones separadas de esta manera están sustancialmente exentas de uno o más materiales con los que se asocian normalmente en la naturaleza, por ejemplo, una o más proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, hidratos de carbono, membrana celular. De esta manera, una composición aislada se separa sustancialmente de otros componentes biológicos en la célula del organismo en el que la composición se produce naturalmente, o a partir del medio artificial en el que se produce (por ejemplo, sintéticamente o a través de cultivo celular). Por ejemplo, un polipéptido aislado se separa sustancialmente de otros polipéptidos y ácidos nucleicos y no incluye una biblioteca de polipéptidos o polinucleótidos presentes entre millones de secuencias de polipéptidos o secuencias de ácidos nucleicos, tal como, por ejemplo, una biblioteca de polipéptidos, genómica o de ADN. Un

ácido nucleico aislado está sustancialmente separado de otros polipéptidos y ácidos nucleicos y no incluye una biblioteca de polipéptidos o polinucleótidos presente entre millones de secuencias de polipéptidos o ácidos nucleicos, tal como, por ejemplo, una biblioteca de polipéptidos, genómica o de ADNc. El término "aislado" no excluye las formas físicas alternativas de la composición, por ejemplo, una proteína aislada podría incluir multímeros de proteínas, modificaciones posteriores a la traducción (por ejemplo, glicosilación, fosforilación) o las formas derivatizadas.

El término "purificado" utilizado como un modificador de la composición se refiere a una composición exenta de la mayoría o todos los materiales con los que se asocia normalmente en la naturaleza. De esta manera, una proteína separada de las células se considera que está sustancialmente purificada cuando se separa de los componentes celulares mediante métodos normalizados mientras que una secuencia de ácido nucleico químicamente sintetizada se considera que está sustancialmente purificada cuando se separa de sus precursores químicos. Purificado no requiere por tanto pureza absoluta. Además, una composición "purificada" se puede combinar con una o más moléculas diferentes. De esta manera, el término "purificado" no excluye combinaciones de composiciones.

Las proteínas y ácidos nucleicos "purificados" incluyen proteínas y ácidos nucleicos producidos mediante métodos de purificación normalizados. El término incluye también proteínas y ácidos nucleicos producidos mediante expresión recombinante en una célula hospedadora así como la síntesis química. "Purificado" puede referirse también a una composición en la que el nivel de contaminantes está por debajo de un nivel que es aceptable para un organismo regulador para la administración a un animal humano o no humano, por ejemplo, la Food and Drug Administration (FDA).

Pureza sustancial puede ser al menos de aproximadamente 60 % o más de la molécula en masa. Pureza puede ser también de aproximadamente 70 % u 80 % o más, y puede ser mayor, por ejemplo, 90 % o más. Pureza puede ser menos, por ejemplo, en un transportador farmacéutico, la cantidad de una molécula en % en peso puede ser menor del 60 %, pero la proporción relativa de la molécula en comparación con otros componentes con los cuales se asocia normalmente será mayor. Se puede determinar la pureza mediante cualquier método adecuado, incluyendo, por ejemplo, la espectroscopía de UV, la cromatografía (por ejemplo, HPLC en fase gas), electroforesis en gel (por ejemplo, tinción de plata o Coomassie) y el análisis de la secuencia (péptidos y ácidos nucleicos).

Se conocen en la técnica los métodos de producir anticuerpos policlonales y monoclonales. Por ejemplo, el antígeno de LM-1 (por ejemplo, NONO/nmt55) o uno de sus fragmentos inmunógenos, conjugados opcionalmente a un transportador tal como hemocianina de lapa californiana (KLH) u ovoalbúmina (por ejemplo, BSA), o mezclados con un adyuvante, tal como el adyuvante completo o incompleto de Freund, y se usa para inmunizar un animal. Utilizando la tecnología convencional del hibridoma, se pueden aislar esplenocitos de animales inmunizados que responden al antígeno de LM-1 (por ejemplo, NONO/nmt55) y fusionarse con células de mieloma. Se pueden seleccionar los anticuerpos producidos por los hibridomas para la reactividad con el antígeno de LM-1 (por ejemplo, NONO/nmt55), por ejemplo, mediante ELISA. Los métodos particulares no limitantes adicionales de cribado y selección de anticuerpos y fragmentos funcionales incluyen la expresión en fagos, unión proteína-ARNm mediante ribosomas y expresión en ARNm, expresión en células de levaduras, bacterias, de mamíferos o retrovirus, compartimentalización *in vitro* mediante micropelotas, expresión de proteína-ADN, selección en crecimiento mediante el híbrido 2 de levadura, complementación del fragmento de proteína (Hoogenboom, R., Nature Biotechnol. 23:1105 (2005)).

Los anticuerpos que compiten con el anticuerpo LM-1 como se representa por el anticuerpo producido por una línea de células DSMZ con N.º de registro DSM ACC 2623, o representado por las secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera que se muestran como las SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 o 9, y 11 o 13 para la unión a una célula o antígeno (por ejemplo, NONO/nmt55) se puede seleccionar e identificar utilizando ensayos de unión de competición convencionales. Los anticuerpos cribados se seleccionan basándose en la capacidad de competir con el anticuerpo LM-1 que se representa por el anticuerpo producido por una línea de células DSMZ N.º de registro DSM ACC 2623 o representado por las secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera que se muestran como las SEQ ID NO:1, 5, 7 o 9, y 11 o 13 para la unión a una célula o antígeno (por ejemplo, NONO/nmt55). La capacidad de un anticuerpo de competir con el anticuerpo LM-1 para la unión a una célula o un antígeno (por ejemplo, NONO/nmt55), inhibe, evita o bloquea la unión del anticuerpo LM-1 a una célula o un antígeno (por ejemplo, NONO/nmt55), se puede determinar mediante diversos ensayos conocidos en la técnica, incluyendo el ensayo de inmunoadsorción (ELISA).

Las proteínas y anticuerpos, subsecuencias y sus fragmentos, así como otras secuencias modificadas pueden producirse mediante metodología genética. Dichas técnicas incluyen la expresión de todo o parte del gen que codifica la proteína o anticuerpo en una célula hospedadora tal como células Cos o *E. coli*. Dichas células hospedadoras pueden expresar la longitud completa o un fragmento, por ejemplo, un scFv (véase, por ejemplo Whitlow et al., En: Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:97 (1991), Bird et al., Science 242:423 (1988); y la patente de Estados Unidos N.º 4.946.778. Los anticuerpos y los fragmentos funcionales, y las secuencias de ácidos nucleicos pueden producirse también mediante síntesis química utilizando los métodos conocidos por el técnico experto, por ejemplo, un equipo automatizado de síntesis de péptidos (véase, por ejemplo, Applied

Biosystems, Foster City, CA).

5 Las células o el antígeno (por ejemplo, NONO/nmt55) adecuados para generar anticuerpos se pueden producir mediante cualquiera de varias técnicas de purificación o expresión recombinante normalizadas de la proteína conocidas en la materia. Por ejemplo, el antígeno de LM-1 (por ejemplo, NONO/nmt55) se puede transfectar en células, incluyendo bacterias o células eucariotas (por ejemplo, levaduras). LM-1 está presente también en células, tales como células Colo-699 (DSMZ con N.º de registro ACC 196), línea de células DV-90 de adenocarcinoma de pulmón (DSMZ con N.º de registro ACC 307), línea de células EPLC-272H de carcinoma de pulmón epidermoide (DSMZ con N.º de registro ACC 383), o línea de células LOU-NH91 de carcinoma escamocelular de pulmón (DSMZ con número de registro ACC 393). De acuerdo con ello, células completas, o preparaciones completas, extractos celulares, o preparaciones de células con el antígeno de LM-1 recombinante (por ejemplo, NONO/nmt55), se pueden usar para producir anticuerpos que compiten con el anticuerpo LM-1, como se representa por el anticuerpo producido por una línea de células DSMZ con n.º de registro DSM ACC 2623 o representado por las secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera que se muestran como las SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 o 9, y 11 o 13, para la unión a una célula o antígeno (por ejemplo, NONO/nmt55), o que se une a una célula o antígeno, (por ejemplo, NONO/nmt55) al cual se une el anticuerpo LM-1, que se representa por el anticuerpo producido por una línea de células DSMZ con N.º de registro DSM ACC 2623, o representado por las secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera que se muestran como las SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 o 9, y 11 o 13.

20 Los animales que se pueden inmunizar incluyen ratones, ratas, conejos, cabras, ovejas, vacas o cabestros, cobayas o primates. La inmunización inicial, y cualquier inmunización posterior opcional puede ser mediante rutas intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, o subcutánea. Las posteriores inmunizaciones pueden ser a igual o a diferentes concentraciones de la preparación del antígeno de LM-1 (por ejemplo, NONO/nmt55), y puede ser a intervalos regulares o irregulares.

25 Los animales incluyen aquellos modificados genéticamente para incluir loci de genes de la IgG humana que se pueden usar por tanto para producir anticuerpos humanos. Los animales transgénicos con uno o más genes de la inmunoglobulina humana que no expresan las inmunoglobulinas endógenas se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N.º 5.939.598. Se describen métodos para producir anticuerpos policlonales humanos y anticuerpos monoclonales humanos (véase, por ejemplo, Kuroiwa et al., *Nat. Biotechnol.* 20:889 (2002); documento WO 98/24893, documento WO 92/01047, documento WO 96/34096, documento WO 96/33735, Patentes de Estados Unidos con números 5.413.923, 5.625.126; 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; 5.545.806; 5.814.318; 5.885.793; 5.916.771; y 5.939.598). Se describe un panorama general para producir anticuerpos humanos en Lonberg y Huszar (*Int. Rev. Immunol.* 13:65 (1995)).

30 Se pueden generar también anticuerpos utilizando otras técnicas incluyendo tecnologías del hibridoma, recombinante y de expresión en fagos, o una de sus combinaciones (véanse las patentes de Estados Unidos números 4.902.614, 4.543.439, y 4.411.993; véase también *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Plenum Press, Kennett, McKearn, and Bechtol (eds.), 1980, y Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988).

35 Se pueden preparar subsecuencias y fragmentos mediante hidrólisis proteolítica del anticuerpo, por ejemplo, mediante digestión con pepsina o papaína o papaina de anticuerpos completos. Las subsecuencias y fragmentos de anticuerpos producidos mediante escisión enzimática con pepsina proporcionan un fragmento 5S denotado F(ab')₂. Este fragmento puede escindirse adicionalmente usando un agente reductor de tiol para producir fragmentos monovalentes 3.5S Fab'. De forma alternativa, una escisión enzimática utilizando pepsina produce dos fragmentos Fab' monovalentes y el fragmento Fc directamente (véase, por ejemplo, patentes de Estados Unidos números. 4.036.945 y 4.331.647; y Edelman et al., *Methods Enzymol.* 1:422 (1967)). Se pueden producir fragmentos Fv y anticuerpos monocatenarios como se describe en las Patentes de Estados Unidos 4.946.778 y 5.258.498; Huston et al., *Methods Enzymol.* 203:46 (1991); Shu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7995 (1993); y Skerra et al., *Science* 240:1038 (1988). Otros métodos de escindir los anticuerpos, tales como la separación de las cadenas pesadas para formar los fragmentos monovalentes de la cadena ligera-pesada, además se pueden usar también la escisión de los fragmentos, u otros métodos enzimáticos o químicos.

45 Los anticuerpos modificados y los fragmentos funcionales que tienen características alteradas, tales como una afinidad de unión aumentada, se pueden producir utilizando los métodos conocidos por la técnica de los técnicos expertos. Por ejemplo, se pueden usar técnicas de maduración por afinidad para mejorar la afinidad de unión al anticuerpo (documento US 2004/0162413 A1; Patentes de Estados Unidos números 6.656.467, 6.531.580, 6.590.079 y 5.955.358; Fiedler et al., *Protein Eng.* 15:931 (2002); Pancook et al., *Hybrid. Hybridomics* 20:383 (2001); Daugherty et al., *Protein Eng.* 11:825 (1998); Wu et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:6037 (1998); y Osbourn et al., *Immunotechnology* 2:181 (1996)).

55 Los anticuerpos se pueden humanizar usando varias técnicas conocidas en la materia, incluyendo, por ejemplo, el injerto de CDR (documentos EP 239.400; WO91/09967; Patentes de Estados Unidos con números 5.225.539, 5.530.101; y 5.585.089), chapado o pulido de la superficie (documento EP 592.106; documento EP 519.596; Padlan, *Molecular Immunol.* 28:489 (1991); Studnicka et al., *Protein Engineering* 7:805 (1994); Roguska. et al., *Proc. Nat'l*

Acad. Sci. USA 91:969 (1994)), e intercambio de cadenas (Patente de Estados Unidos N.º 5.565.332). Secuencias consenso humanas (Padlan, Mol. Immunol. 31:169 (1994); y Padlan, Mol. Immunol. 28:489 (1991)) se han usado previamente para producir anticuerpos humanizados (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285 (1992); y Presta et al., J. Immunol. 151:2600 (1993)).

5 Se conocen en la técnica métodos para producir anticuerpos quiméricos (por ejemplo, Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi et al., BioTechniques 4:214 (1986); Gillies et al., J. Immunol. Methods 125:191 (1989); y Patentes de Estados Unidos números 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397). Los anticuerpos quiméricos en los que un dominio variable de un anticuerpo de una especie se sustituye por el dominio variable de otra especie se describen, por ejemplo, en Munro, Nature 312:597 (1984); Neuberger et al., Nature 312:604 (1984); Sharon et al., Nature 309:364 (1984); Morrison et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 81:6851 (1984); Boulianne et al., Nature 312:643 (1984); Capon et al., Nature 337:525 (1989); y Traunecker et al., Nature 339:68 (1989).

15 Las técnicas adecuadas que se pueden emplear adicionalmente en los métodos de anticuerpos incluyen la purificación por afinidad, la purificación del gel no desnaturizante, HPLC o RP-HPLC, exclusión por tamaño, purificación sobre columna de proteína A, o cualquier combinación de estas técnicas. Se puede determinar el isotipo del anticuerpo utilizando un ensayo ELISA, por ejemplo, se puede identificar la Ig humana utilizando la Ig de ratón absorbida dirigida contra la Ig humana.

20 Se describen también en el presente documento los métodos para producir anticuerpos y fragmentos funcionales. En una realización, un método incluye administrar un antígeno de LM-1 (por ejemplo, NONO/nmt55), o una célula que expresa un antígeno de LM-1 (por ejemplo, NO- NO/nmt55), en un animal, seleccionar al animal para la expresión de un anticuerpo que se une al antígeno de LM-1 (por ejemplo, NONO/nmt55) o una célula que expresa un antígeno de LM-1 (por ejemplo, NONO/nmt55), seleccionar un animal que produce un anticuerpo que se une al antígeno de LM-1 (por ejemplo, NONO/nmt55) o una célula que expresa un antígeno de LM-1 (por ejemplo, NONO/nmt55), y aislar el anticuerpo procedente del animal seleccionado. En otra realización, el método incluye administrar el antígeno LM-1 (por ejemplo, NONO/nmt55) o la célula que expresa un antígeno de LM-1 (por ejemplo, NONO/nmt55) a un animal capaz de expresar una inmunoglobulina humana, aislar los esplenocitos de un animal que produce un anticuerpo que se une al antígeno de LM-1 (por ejemplo, NONO/nmt55) o una célula que expresa un antígeno de LM-1 (por ejemplo, NONO/nmt55), fusionando los esplenocitos con una célula de mieloma para producir un hibridoma, y cribar el hibridoma para la expresión de un anticuerpos que se une al antígeno de LM-1 (por ejemplo, NONO/nmt55) o una célula que expresa un antígeno de LM-1 (por ejemplo, NONO/nmt55).

35 Como se usa en el presente documento, los términos "trastorno proliferativo celular" y "trastorno hiperproliferativo celular" y sus variaciones gramaticales, cuando se usan en referencia a una célula, tejido u órgano, se refiere a cualquier célula, tejido, u órgano en crecimiento, proliferación, diferenciación o supervivencia indeseable, excesiva o anómala. Una célula hiperproliferativa denota una célula cuyo crecimiento, proliferación, o supervivencia es mayor que la deseada, tal como una célula normal de referencia, por ejemplo, una célula que es del mismo tejido u órgano pero que no es una célula hiperproliferativa, o una célula que no puede diferenciarse normalmente. La proliferación celular indeseable y los trastornos hiperproliferativos incluyen enfermedades y dolencias fisiológicas, dolencias hiperplásicas benignas caracterizadas por cantidades de células, crecimiento celular, proliferación celular, supervivencia celular o diferenciación indeseable, excesiva o anómala en un sujeto. Los ejemplos de dichos trastornos incluyen neoplasias, tumores y cánceres (neoplasias malignas) metastásicos y no metastásicos.

45 Se describe en el presente documento un método que incluye administrar a un sujeto un anticuerpo LM-1, como se representa por un anticuerpo producido por la línea de células DSMZ con N.º de registro DSM ACC 2623, o representado por las secuencias de la cadena pesada y ligera que se muestran como las SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 o 9, y 11 o 13, o un anticuerpo que se une a un antígeno de LM-1 (por ejemplo, NONO/nmt55), en una cantidad eficaz para tratar el trastorno proliferativo celular o el trastorno hiperproliferativo celular en el sujeto. En aspectos concretos, el trastorno es una neoplasia, tumor o cáncer metastásico o no metastásico (neoplasia maligna). En aspectos adicionales, el trastorno afecta o está presente en parte al menos en mama, pulmón, tiroides, cabeza y cuello, nasofaringe, nariz o senos, cerebro, médula espinal, glándula adrenal, ganglios linfáticos, tracto gastrointestinal (boca, esófago, estómago, duodeno, íleon, yeyuno, (intestino delgado), colon, recto), tracto genitourinario, (útero, ovario, endometrio, cuello del útero, vejiga, testículo, pene, próstata), riñón, páncreas, glándula adrenal, hígado, hueso, médula ósea, ganglios linfáticos, sangre, músculo, piel o el sistema hematopoyético.

60 Los términos "tumor," "cáncer" y "neoplasia" se usan de forma indistinta y se refieren a una célula o población cuyo crecimiento, proliferación o supervivencia es mayor que el crecimiento, proliferación o supervivencia de una célula homóloga normal, por ejemplo, un trastorno proliferativo celular o un trastorno diferenciativo. Normalmente, el crecimiento es incontrolado. El término "neoplasia maligna" se refiere a la invasión del tejido cercano. El término "metástasis" se refiere a la dispersión o diseminación de un tumor, un cáncer o una neoplasia a otros sitios, localizaciones o regiones en el sujeto, en el que los sitios, localizaciones o regiones son distintos del tumor o del cáncer primarios.

65 El anticuerpo se puede usar para reducir o inhibir la metástasis de un tumor o un cáncer primarios a otros sitios, o la formación o el establecimiento de tumores o cánceres metastásicos en otros sitios distales del tumor o del cáncer

- primarios que inhiben o reducen por tanto la recidiva del tumor o el cáncer o la progresión del tumor o el cáncer. Esto incluye entre otros temas, 1) reducir o inhibir el crecimiento, la proliferación, la movilidad o la invasividad de las células tumorales o cancerosas que potencialmente o desarrollan las metástasis (por ejemplo, células tumorales diseminadas, DTC); 2) reducir o inhibir la formación o el establecimiento de las metástasis que surgen de un tumor o un cáncer primarios en uno o más sitios, localizaciones o regiones diferentes distintas del tumor o del cáncer primarios; 3) reducir o inhibir el crecimiento o la proliferación de la metástasis en uno o más sitios, localizaciones o regiones distintas del tumor o del cáncer primarios después que se ha formado o se ha establecido la metástasis; y 4) reducir o inhibir la formación o el establecimiento de la metástasis adicional después que se ha formado o establecido la metástasis.
- Las neoplasias, tumores y cánceres incluyen un sarcoma, carcinoma, adenocarcinoma, melanoma, mieloma, blastoma, glioma, linfoma o leucemia. Los cánceres ilustrativos incluyen, por ejemplo, carcinoma, sarcoma, adenocarcinoma, melanoma, neural (blastoma, glioma), mesotelioma y reticuloendotelial, trastornos neoplásicos linfáticos o hematopoyéticos (por ejemplo, mieloma, linfoma o leucemia). En aspectos concretos, una neoplasia, tumor o cáncer incluye un adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón, carcinoma gástrico difuso o intersticial, adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma de próstata, carcinoma de esófago, carcinoma de mama, adenocarcinoma de páncreas, adenocarcinoma de ovario, adenocarcinoma de las glándulas adrenales, adenocarcinoma del endometrio o adenocarcinoma de útero.
- Las neoplasias, tumores y cánceres incluyen los tipos benignos, malignos, metastásicos y no metastásicos, e incluyen cualquier estadio (I, II, III, IV o V) o grado (G1, G2, G3, etc.) de neoplasia, tumor, o cáncer, o una neoplasia, tumor, cáncer o metástasis que está progresando, empeorando, estabilizada o en remisión.
- Las neoplasias, tumores y cánceres pueden surgir de una multitud de tipos de tumores primarios, incluyendo, pero no de forma limitativa, de mama, pulmón, tiroides, cabeza y cuello, nasofaringe, nariz o senos, cerebro, médula espinal, glándula adrenal, tiroides, ganglios linfáticos, tracto gastrointestinal (boca, esófago, estómago, duodeno, íleon, yeyuno (intestino delgado), colon, recto), tracto genitourinario (útero, ovario, endometrio, cuello del útero, vejiga, testículo, pene, próstata), riñón, páncreas, glándula adrenal, hígado, hueso, médula ósea, ganglios linfáticos, sangre, músculo, piel, y el sistema hematopoyético, y puede metastatizar en sitios secundarios.
- Una "neoplasia, tumor o cáncer sólido" se refiere a una neoplasia, tumor o cáncer (por ejemplo, metástasis) que normalmente se agrega en su conjunto y forma una masa. Los ejemplos específicos incluyen tumores viscerales tales como melanomas, cánceres de mama, de páncreas, de útero y de ovario, cáncer de testículo, incluyendo seminomas, cáncer gástrico o cáncer de colon, hepatomas, carcinomas adrenal, renal y de vejiga, cánceres de pulmón, de cabeza y cuello y tumores/cánceres cerebrales.
- Los carcinomas se refieren a neoplasias malignas de tejido epitelial o endocrino en incluyen carcinomas del sistema respiratorio (de pulmón, microcítico de pulmón), carcinomas del sistema gastrointestinal, carcinomas del sistema genitourinario, carcinomas de testículos, carcinomas de mama, carcinomas de próstata, carcinomas del sistema endocrino, y melanomas. El término incluye también carcinosarcomas, por ejemplo, que incluyen tumores malignos compuestos de tejidos carcinomatosos y tejidos sarcomatosos. El adenocarcinoma incluye un carcinoma de un tejido glandular, o en el que el tumor forma una estructura de tipo glándula Melanoma se refiere a tumores malignos de melanocitos y otras células derivadas de pigmentos de origen celular que pueden surgir en la piel, el ojo (incluyendo la retina) u otras regiones del cuerpo. Pueden formarse carcinomas adicionales a partir del útero/cuello del útero, endometrio, pulmón, cabeza/cuellos, colon, páncreas, testículos, glándulas adrenales, riñón, esófago, estómago, hígado y ovario.
- Los sarcomas se refieren a tumores malignos de origen en las células del mesénquima Los sarcomas ilustrativos incluyen, por ejemplo, linfosarcoma, liposarcoma, osteosarcoma, condrosarcoma, leiomiomas, rabdomiosarcoma y fibrosarcoma.
- Las neoplasias neurales incluyen glioma, glioblastoma, meningioma, neuroblastoma, retinoblastoma, astrocitoma, oligodendrocitoma
- Los ejemplos no limitantes específicos de neoplasias, tumores y cánceres adecuados para el tratamiento incluyen neoplasias malignas y no malignas, tumores y cánceres, y metástasis. En particular, una neoplasia, tumor, cáncer o metástasis de cualquier estadio (por ejemplo, los estadios IA, IB, IIA, IIB, IIIA, IIIB o IV) o grado (por ejemplo, los grados G1, G2 o G3). Los ejemplos no limitantes adicionales incluyen el adenocarcinoma de estómago (por ejemplo, difuso o intestinal, adenocarcinoma colorrectal, adenocarcinoma de pulmón escamocelular, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma escamocelular del esófago, adenocarcinoma del páncreas, carcinoma urotelial de la vejiga urinaria, carcinoma renal del riñón, adenocarcinoma de la próstata, carcinoma ductal de la mama, carcinoma lobular de la mama, adenocarcinoma del ovario, adenocarcinoma de la glándula adrenal, adenocarcinoma del endometrio o un adenocarcinoma de útero.
- Una "neoplasia, tumor o cáncer líquido " se refiere a una neoplasia, tumor o cáncer del sistema reticuloendotelial o del sistema hematopoyético, tal como un linfoma, mieloma, o leucemia, o una neoplasia que es difusa en la

naturaleza. Los ejemplos concretos de leucemias incluyen leucemias linfoblásticas agudas y crónicas, leucemias mieloblásticas y mieloma múltiple. Normalmente, dichas enfermedades surgen de leucemias agudas mal diferenciadas, por ejemplo, leucemia eritroblástica y leucemia megacarioblástica aguda. Los trastornos mieloides específicos incluyen, pero no de forma limitativa, leucemia promielocítica aguda (APML) leucemia mielógena aguda (AML) y leucemia mielógena crónica (CML); las neoplasias malignas linfoides incluyen, pero no de forma limitativa, leucemia linfoblástica aguda (ALL), que incluye ALL de linaje B y ALL de linaje T, leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia promielocítica (PLL), leucemia de células pilosas (HLL) y macroglobulinemia de Waldenstrom (WM) Los linfomas malignos específicos incluyen, linfoma no de Hodgkin y las variantes, linfomas de linfocitos T periféricos, leucemia/linfoma de linfocitos T adultos (ATL), linfoma de linfocitos T cutáneo (CTCL), leucemia linfocítica granular grande (LGF), enfermedad de Hodgkin y enfermedad de Reed-Sternberg.

Como se usa en el presente documento, los términos "tratar," "que trata," "tratamiento" y sus variaciones gramaticales significan someter a un paciente individual a un protocolo, régimen, proceso o remedio, en el que se desea obtener una respuesta fisiológica o resultado en este paciente Debido a que cada paciente tratado puede no responder a un protocolo, régimen, proceso o remedio de tratamiento concreto, el tratamiento no requiere que se consiga la respuesta o el resultado fisiológico deseado en cada uno y en cada paciente o población de pacientes. De acuerdo con ellos, un paciente o una población de pacientes dada puede fracasar en responder o responder de manera inadecuada al tratamiento.

Se puede practicar la aplicación mediante cualquier modo de administración o mediante cualquier ruta de administración sistémica, regional y local. Las rutas de administración incluyen la intravenosa, intraarterial, intradérmica, intramuscular, subcutánea, intrapleurales, transdérmica (tópica), transmucosal, intracraneal, intraespinal, intraocular, rectal, oral (alimentaria) y mucosal.

Se describe en el presente documento obtener una mejora detectable o medible en una dolencia de un sujeto dado, tal como aliviar o mejorar uno o más síntomas o consecuencias (físicas) adversos asociados con la presencia de un trastorno proliferativo celular o un trastorno hiperproliferativo celular, neoplasia, tumor o cáncer, o metástasis, es decir, un beneficio terapéutico o un efecto beneficioso.

Un beneficio terapéutico o efecto beneficioso es cualquier mejora objetiva o subjetiva, transitoria, temporal, o a largo plazo en la dolencia o patología, o una reducción en el inicio, la gravedad, la duración o la frecuencia de un síntoma adverso asociado con o producido por la proliferación celular o un trastorno hiperproliferativo celular tal como una neoplasia, tumor o cáncer, o metástasis. Un criterio de valoración clínica satisfactorio de un método de tratamiento de acuerdo con la invención se consigue, por ejemplo, cuando existe una reducción incremental o parcial en la gravedad, duración o frecuencia de una o más patologías, síntomas adversos o complicaciones asociadas, o la inhibición o la reversión de una o más manifestaciones o características fisiológicas, bioquímicas o celulares de proliferación celular o de un trastorno hiperproliferativo celular tal como una neoplasia, tumor o cáncer, o metástasis. Un beneficio o mejora terapéutica es por tanto una cura, tal como la destrucción de las células proliferantes diana (por ejemplo, neoplasia, tumor o cáncer, o metástasis) o la eliminación de una o más, de la mayoría o de todas las patologías, síntomas adversos o complicaciones asociadas con o producidas por la proliferación celular o el trastorno hiperproliferativo celular tal como una neoplasia, tumor o cáncer, o metástasis Sin embargo, un beneficio o mejora terapéutica necesario para ser una cura o destrucción completa de todas las células proliferantes diana (por ejemplo neoplasia, tumor o cáncer, o metástasis) o la eliminación de todas las patologías, síntomas o complicaciones adversas asociados con o producidos por la proliferación celular o el trastorno hiperproliferativo celular tal como una neoplasia, tumor o cáncer, o metástasis. Por ejemplo, la destrucción parcial de una masa de células tumorales o cancerosas, o la estabilización de la masa tumoral o cancerosa, el tamaño o las cantidades de células inhibiendo la progresión o el empeoramiento del tumor o el cáncer, pueden reducir la mortalidad y prolongar el lapso de vida incluso si solo durante unos pocos días, semanas o meses, incluso aunque permanezca una parte del volumen de la masa tumoral o cancerosa, el tamaño o las células.

Los ejemplos específicos no limitantes del beneficio terapéutico incluyen una reducción en el volumen de la neoplasia, tumor o cáncer, o metástasis (tamaño o masa de las células) o de las cantidades de células, inhibiendo o evitando un aumento en el volumen de la neoplasia, tumor o cáncer (por ejemplo, estabilizando), retrasando o inhibiendo la progresión, el empeoramiento o la metástasis de la neoplasia, tumor o cáncer, estimulando, induciendo o aumentando la lisis o apoptosis de la neoplasia, tumor o cáncer o inhibiendo la proliferación, el crecimiento o la metástasis de la neoplasia, tumor o cáncer. Un método de la invención puede no tener efecto inmediatamente. Por ejemplo, el tratamiento puede continuarse por un aumento en la cantidad de células neoplásicas, tumorales o cancerosas o en la masa, pero puede producirse posteriormente en el tiempo la estabilización o reducción eventual en la masa, tamaño o cantidad de células de las células tumorales en un sujeto dado tras la lisis celular o la apoptosis de la neoplasia, tumor o cáncer, o metástasis.

Los síntomas y complicaciones adversas adicionales asociados con la neoplasia, tumor, cáncer y metástasis que pueden estar inhibidos, reducidos, disminuidos, retrasados o evitados incluyen, por ejemplo, náuseas, ausencia de apetito, letargia, dolor, y malestar. De esta manera, una disminución o reducción parcial o completa en la gravedad, duración o frecuencia de un síntoma o complicación adversa asociado con o producido por un trastorno hiperproliferativo celular, una mejora en el bienestar de los sujetos, tal como un aumento en la energía, el apetito, el

bienestar psicológico, son todos ejemplos no limitantes concretos del beneficio terapéutico. Un beneficio o mejora terapéutica puede por tanto incluir también una mejora subjetiva en la calidad de vida de un sujeto tratado.

5 En diversas realizaciones, el método reduce o disminuye el tamaño de la neoplasia, el tumor o el cáncer, o la metástasis, inhibe o evita un aumento en el tamaño o el volumen de la metástasis de la neoplasia, tumor o cáncer, inhibe o retrasa la progresión o el empeoramiento de la neoplasia, el tumor o el cáncer, estimula la neoplasia, el tumor o el cáncer, o la metástasis de la lisis celular o la apoptosis, o inhibe, reduce, disminuye o retrasa la proliferación o la metástasis de la neoplasia, tumor o cáncer. En una realización adicional, el método prolonga o extiende el lapso de vida del sujeto. En una realización, el método mejora la calidad de vida del sujeto.

10 El examen de una muestra de biopsia que contiene una neoplasia, tumor o cáncer, o metástasis (por ejemplo, una muestra de sangre o tejido), puede establecer volúmenes de células o cantidades de células neoplásicas, tumorales o cancerosas, o metastásicas, y por tanto, si se ha producido una reducción o estabilización en la masa o en las cantidades o volúmenes de células neoplásicas, tumorales o cancerosas o metastásicas o en la inhibición del establecimiento, formación, proliferación, crecimiento o supervivencia (apoptosis) de las células neoplásicas, tumorales, cancerosas o metastásicas. Para una neoplasia, tumor o cáncer sólido, los métodos de diagnóstico por imágenes invasivos y no invasivos pueden discernir el tamaño o volumen de la neoplasia, tumor o cáncer. El examen de la sangre o el suero, o la médula ósea, por ejemplo, para poblaciones, cantidades y tipos de células (por ejemplo, trastornos hiperproliferativos celulares hematopoyéticos, células tumorales diseminadas) puede establecer si una reducción o estabilización en la masa o en las cantidades de células neoplásicas, tumorales, cancerosas o metastásicas, o que se ha producido en la inhibición del establecimiento, la formación, la proliferación, el crecimiento o la supervivencia (apoptosis).

15 Las composiciones y los métodos de la invención pueden combinarse con cualquier tratamiento o terapia que proporción a un efecto deseado. En particular, los tratamientos y terapias que se han caracterizado teniendo una actividad proliferativa anticelular que proporciona un efecto deseado. Los tratamientos y terapias ilustrativos incluyen agentes o fármacos proliferativos anticelulares o agentes inmunopotenciadores.

20 Los tratamientos y terapias pueden llevarse a cabo antes de, de forma sustancialmente contemporánea con cualquier otro método de la invención, por ejemplo, un trastorno proliferativo anticelular o trastorno hiperproliferativo anticelular (por ejemplo, una neoplasia, tumor o cáncer, o metástasis)

25 Se describen métodos combinados en los que los métodos de la invención, en los que cualquiera de los anticuerpos, fragmentos funcionales y formas modificadas y variantes, se usan en una combinación con cualquier régimen terapéutico, protocolo de tratamiento o composición, tal como un protocolo proliferativo anticelular agente o fármaco que se muestra en el presente documento o se conoce en la técnica. En una realización, el método incluye administrar el anticuerpo LM-1, como se representa por un anticuerpo producido por una línea de células DSMZ con N.º de registro DSM ACC 2623 o representado por las secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera que se muestran como las SEQ ID NO:1, 5, 7 o 9, y 11 o 13 y un tratamiento proliferativo anticelular o un tratamiento inmunopotenciador, agente o fármaco. En otra realización, el método incluye administrar un anticuerpo que se une a un antígeno LM-1 (por ejemplo NONO/nmt55), y un tratamiento proliferativo anticelular o tratamiento inmunopotenciador, agente o fármaco. Se puede administrar el tratamiento proliferativo anticelular o el tratamiento inmunopotenciador, agente o fármaco antes de, de forma sustancialmente contemporánea con o tras la administración del anticuerpos LM-1, como se representa por el anticuerpo producido por una línea de células DSMZ con N.º de registro DSM ACC 2623 o representado por las secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera que se muestran como las SEQ ID NO:1, 5, 7 o 9, y 11 o 13 o el anticuerpo que se une a un antígeno de LM-1 (por ejemplo, NONO/nmt55).

30 Como se usa en el presente documento un tratamiento, terapia, actividad "proliferativo anticelular", "antineoplásico", "antitumoral", o "anticanceroso" significa cualquier terapia, régimen de tratamiento, agente, fármaco, protocolo o proceso que es útil en el tratamiento de patologías, síntomas adversos, o complicaciones asociadas con o producidas por la proliferación celular anómala o indeseable (hiperproliferación celular), un trastorno hiperproliferativo celular, neoplasia, tumor o cáncer, o metástasis. Las terapias particulares, regímenes de tratamiento, agentes, fármacos, protocolos o procesos pueden inhibir, disminuir, retrasar, retardar, reducir, retrasar, o evitar la proliferación celular, el crecimiento celular, la hiperproliferación celular, neoplásica, tumoral, o el crecimiento canceroso (maligno), la proliferación, la supervivencia o la metástasis. Dichos tratamiento, terapias, regímenes, protocolos, agentes y fármacos, pueden funcionar perturbando, reduciendo, inhibiendo o retrasando la progresión del ciclo celular o la proliferación o el crecimiento celular; aumentar, estimular o potenciar la apoptosis celular, la lisis o la muerte; inhibir la síntesis del ácido nucleico o la síntesis de proteínas o el metabolismo; reducir, disminuir, inhibir o retrasar la división celular; o disminuir, reducir o inhibir la supervivencia, o producción o utilización celular de un factor de supervivencia celular, factor de crecimiento o ruta de señalización (extracelular o intracelular).

35 Los Ejemplos de tratamiento y terapias proliferativas anticelulares incluyen quimioterapia, inmunoterapia, radioterapia (ionizante o química), terapia local o regional térmica (hipertermia) y resección quirúrgica

65

- Las clases no limitantes específicas de agentes proliferativos anticelulares y fármacos que incluyen agentes alquilantes, antimetabolitos, extractos vegetales, alcaloides vegetales, nitrosureas, hormonas (esteroides) análogos de nucleósidos y nucleótidos. Los ejemplos no limitantes específicos de toxinas microbianas incluyen la toxina bacteriana del cólera, la toxina pertussis, la toxina del ántrax, la toxina de la difteria, y la toxina de la planta de ricina.
- 5 Los ejemplos específicos de fármacos incluyen la diclofosfamida, azatriopina, ciclosporina A, melfalán, clorambucilo, mecloretamina, busulfán, metotrexato, 6-mercaptopurina, tioguanina, 5-fluorouracilo, 5-fluorouridina, citosina arabinósido, 6-tioguanina, 6-mercaptopurina, AZT, 5-azacitidina (5-AZC) y los compuestos relacionados con 5-azacitidina, pentostatina, gemcitabina, citarabina, bleomicina, actinomicina D, dactinomicina, mitramicina, mitomicina C, carmustina, caliqueamicina, lomustinas, semustina, estreptoizotocina, tenipósido, etopósido, hidroxiurea, nitrosurea,
- 10 cisplatino, carboplatino, levamisol, ifosfamida, mitotano, mitoxantrona, procarbazona, dacarbazina, taxol, vinblastina, vincristina, vindesina, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, daunomicina y dibromomanitol. Los ejemplos no limitantes específicos incluyen prednisona, prednisolona, dietilestilbestrol, fluoximesterona, flutamida, leuprólido, toremifeno, triamcinolona, zodalex, y antagonistas hormonales que liberan gonadotropina.
- 15 La radioterapia incluye la administración interna o externa a un sujeto. Por ejemplo, se pueden administrar rayos alfa, beta, gamma y X al sujeto externamente sin internalizar al sujeto o poner en contacto físicamente de otra forma el radioisótopo. Los ejemplos específicos de dosificaciones varían de las dosis diarias de 50 a 200 roentgens durante periodos prolongados de tiempo (3 a 5/semana), hasta dosis únicas de 2000 a 6000 roentgens. Las dosificaciones varían ampliamente, y dependen de la duración de la exposición, la vida media del isótopo, el tipo de radiación emitida, el tipo de células y la localización tratada y del estadio progresivo de la enfermedad. Los ejemplos
- 20 específicos de radionucleidos incluyen, por ejemplo, ⁴⁷Sc, ⁶⁷Cu, ⁷²Se, ⁸⁸Y, ⁹⁰Sr, ⁹⁰Y, ⁹⁷Ru, ⁹⁹Tc, ¹⁰⁵Rh, ¹¹¹In, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹⁴⁹Tb, ¹⁵³Sm, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁹⁴Os, ²⁰³Pb, ²¹¹At, ²¹²Bi, ²¹³Bi, ²¹²Pb, ²²³Ra, ²²⁵Ac, ²²⁷Ac, y ²²⁸Th.
- Los anticuerpos que se unen a las células tumorales son un ejemplo concreto del tratamiento o terapia proliferativo anticelular. Los anticuerpos antitumorales incluyen, por ejemplo, el anticuerpo M195 que se une al antígeno celular CD33 de la leucemia (Patente de Estados Unidos N.º 6.599.505); el anticuerpo monoclonal DS6 que se une al antígeno asociado al tumor CA6 de carcinoma de ovario (Patente de Estados Unidos N.º 6.596.503); el anticuerpo monoclonal IBD12 humano que se une al antígeno H superficial celular epitelial (Patente de Estados Unidos N.º 4.814. 275); y el anticuerpo BR96 que se une al epítipo del hidrato de carbono Le^x expresado por los carcinomas de colon, mama, ovario, y carcinomas de pulmón. Los anticuerpos antitumorales adicionales que se pueden emplear
- 30 incluyen, por ejemplo, Herceptina (anticuerpo neu dirigido contra-Her-2), Rituxan®, Zevalin, Bevacizumab (Avastin), Bexxar, Campath®, Oncolym, 17-1A (Edrecolomab), 3F8 (anticuerpo dirigido contra neuroblastoma), MDX-CTLA4, IMC-C225 (Cetuximab) y Mylotarg.
- 35 Como se usa aquí, el término "inmunopotenciador," cuando se usa en referencia a un tratamiento, terapia, agente o fármaco significa que el tratamiento, terapia, agente o fármaco proporciona un aumento, estimulación inducción o promoción de una respuesta inmunitaria, humoral o mediada por célula. Dichas terapias pueden potenciar las respuestas inmunitarias generalmente o potenciar la respuesta inmunitaria en una diana específica, por ejemplo, un trastorno proliferativo celular o un trastorno hiperproliferativo celular, tal como una neoplasia, tumor o cáncer, o metástasis.
- 40 Los ejemplos específicos no limitantes de agentes inmunopotenciadores incluyen anticuerpos, factores de crecimiento celular, factores de supervivencia celular, factores diferenciativos celulares, citoquinas, interferones y quimioquinas. Los ejemplos adicionales de agentes inmunopotenciadores y los tratamientos incluyen células inmunitarias tales como linfocitos, células plasmáticas, macrófagos, células dendríticas, linfocitos NK y linfocitos B que expresan tanto el anticuerpo contra el trastorno proliferativo celular, o de otra manera, activan probablemente una respuesta inmunitaria contra el trastorno proliferativo celular. Las citoquinas que potencian o estimulan la inmunogenicidad incluyen IL-2, IL-1a, IL-1p, IL-3, IL-6, IL-7, factor estimulador de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), IFN-γ, IL-12, TNF-α, y TNFβ, que son también ejemplos no limitantes de agentes
- 50 inmunopotenciadores. Las quimioquinas incluyen MIP-1a, MIP-1p, RANTES, SDF-1, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, eotaxin, eotaxin-2, I-309/TCA3, ATAC, HCC-1, HCC-2, HCC-3, PARC, TARC, LARC/MIP-3a, CKp, CKp6, CKp7, CKp8, CKp9, CKp11, CKp12, C10, IL-8, ENA-78, GROα, GROγ, GCP-2, PBP/CTAP IIIp-TG/NAP-2, Mig, PBSF/SDF-1, y linfotactina son ejemplos no limitantes adicionales de agentes inmunopotenciadores.
- 55 Se describen, entre otras cosas, métodos que dan como resultado una necesidad o uso reducido de otro protocolo de tratamiento o régimen terapéutico, proceso o remedio. Por ejemplo, para una neoplasia, tumor o cáncer, o metástasis, el uso de la invención tiene un beneficio terapéutico en un sujeto dado da como resultado una dosis menos frecuente o reducida o la eliminación de un tratamiento proliferativo anticelular (por ejemplo, antineoplásico, antitumoral, anticanceroso, o antimetastático) o un tratamiento o terapia inmunopotenciador, tal como un fármaco quimioterapéutico, o tratamiento de radioterapia, inmunoterapia, o cirugía para la neoplasia, tumor o cáncer o metástasis.
- 60 De acuerdo con la invención, se proporcionan una necesidad o uso reductor de un tratamiento o terapia proliferativo anticelular (por ejemplo, antineoplásico, antitumoral, anticanceroso o antimetastático).
- 65

Las dosis o la "la cantidad eficaz" o "cantidad suficiente" en un método de tratamiento o terapia en el que se desea conseguir un beneficio o mejora terapéutica incluye, por ejemplo, cualquier alivio objetivo o subjetivo o mejora de una, varias o todas las patologías, síntomas adversos o complicaciones asociadas con o producidas por la diana (por ejemplo, trastorno hiperproliferativo celular), en una extensión medible o detectable, aunque evitando, 5 inhibiendo o retrasando la progresión o el empeoramiento de la patología de la diana (por ejemplo, trastorno hiperproliferativo celular), síntoma adverso o complicación, es un resultado satisfactorio. De esta manera, en el caso de un trastorno hiperproliferativo celular, la cantidad será suficiente para proporcionar un beneficio terapéutico a un sujeto dado o para aliviar o mejorar una patología, síntoma adverso o complicación del trastorno en un sujeto dado. Se pueden administrar dosis únicas o múltiples o la dosis puede aumentarse o reducirse proporcionalmente como se 10 indica por el estado o tratamiento o la diana terapéutica (por ejemplo, trastorno hiperproliferativo celular) o cualquier(cualesquiera) efecto(s) secundarios del tratamiento o la terapia.

Las cantidades no limitantes ilustrativas (dosis) están en el intervalo de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, y cualquier valor o intervalo numérico en dichos intervalos. Se pueden administrar 15 cantidades mayores o menores (o dosis), por ejemplo 0,01-500 mg/kg, y cualquier valor numérico o intervalo o valor comprendido en dichos intervalos. Las cantidades no limitantes ilustrativas adicionales (o dosis) varían de aproximadamente 0,1-50 mg/kg, 0,5-50 mg/kg, 1,0-25 mg/kg, 1,0-10 mg/kg, y cualquier valor numérico o intervalo o valor comprendido en dichos intervalos.

El anticuerpo para uso en la invención puede administrarse una o más veces (por ejemplo, 1-10, 1-5 o 1-3 veces) por día, semana, mes, o año. El técnico experto conocerá cuando es adecuado retrasar o interrumpir la administración. Un calendario de dosificación no limitante ilustrativo es de 1-7 veces por semana, durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o más semanas, y cualquier valor o intervalo numérico o valor comprendido en dichos 20 intervalos.

Por supuesto, como es típico para cualquier tratamiento o terapia, diferentes sujetos presentarán diferentes respuestas al tratamiento y algunos puede no responder o responder de forma inadecuada a un protocolo, régimen o proceso de tratamiento concreto. Cantidades eficaces dependerán por tanto al menos en parte del trastorno tratado (por ejemplo, proliferación celular, hiperplasia benigna o una neoplasia, tumor o cáncer y el tipo de almacenamiento, 25 por ejemplo, el grado de tumor o cáncer y si está en un estadio avanzado, tardío o temprano) el efecto terapéutico deseado, así como el sujeto individual (por ejemplo, la biodisponibilidad comprendida por el sujeto, género, edad, etc.) y la respuesta del sujeto al tratamiento basándose en la variabilidad genética y epigenética (por ejemplo, farmacogenómica).

La toxicidad y viabilidad celular (apoptosis celular lisis, proliferación del crecimiento, etc.) se puede medir por varios medios sobre la base de ensayos colorimétricos, luminiscentes, radiométricos, o fluorométricos conocidas en la materia. Las técnicas colorimétricas para determinar la viabilidad celular incluyen, por ejemplo, exclusión por azul tripán. En resumen, se tiñeron las células con azul tripán y se hizo el recuento utilizando un hemocitómetro. Las 30 células viables excluyen el colorante mientras que las células muertas y las células coloreadas captan el colorante azul y se distinguen fácilmente al microscopio óptico. El rojo neutro es adsorbido por las células viables y se concentra en los lisosomas de las células; Se pueden determinar las células viables con un microscopio óptico para cuantificar las cantidades de células teñidas con rojo neutro.

Las técnicas fluorométricas para determinar la viabilidad celular incluyen, por ejemplo, yoduro de propidio, un agente intercalante de ADN fluorescente. Se excluye yoduro de propidio de las células viables, pero tiñe el núcleo de las 35 células muertas. La citometría de flujo de las células marcadas con yoduro de propidio puede utilizarse a continuación para cuantificar las células viables y muertas. La liberación de la lactato deshidrogenasa (LDH) indica daño estructural y la muerte de las células, y se puede medir mediante un ensayo de enzima espectrofotométrico. Se incorpora bromodesoxiuridina (BrdU) en el ADN sintetizado recientemente y se puede detectar con un anticuerpo marcado con fluorocromo. El colorante fluorescente Hoechst 33258 marca el ADN y se puede utilizar para cuantificar 40 la proliferación de células (por ejemplo, mediante citometría de flujo) La incorporación cuantitativa del colorante fluorescente diacetato de succinimidil éster de carboxifluoresceína (CFSE o CFDA-SE) puede proporcionar el análisis de la división celular (por ejemplo, citometría de flujo) Esta técnica se puede usar tanto *in vitro* como *in vivo*. 7-aminoactinomicina D (7-AAD) es un intercalador fluorescente que experimenta un desplazamiento espectral en asociación con ADN y puede proporcionar un análisis de la división celular (por ejemplo, citometría de flujo). 45 50 55

Las técnicas radiométricas para determinar la proliferación celular incluyen, por ejemplo, [³H]-Timidina, que se incorpora en ADN sintetizado recientemente de células vivas y se utiliza frecuentemente para determinar la proliferación de células. Puede cuantificarse la liberación de cromo (⁵¹Cr) procedente de células muertas mediante 60 recuento por centelleo a fin de cuantificar la viabilidad celular

Las técnicas luminiscentes para determinar la viabilidad celular incluyen, por ejemplo, el ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (Promega Madison WI). Esta técnica cuantifica la cantidad de ATP presente para 65 determinar el número de células viables.

Los kits comercialmente disponibles para determinar la viabilidad celular y la proliferación celular incluyen, por ejemplo, Cell Proliferation Biotrak ELISA (Amersham Biosciences Piscataway, NJ); el ensayo Guava ViaCount™, que proporciona recuentos celulares rápidos y la determinación de la viabilidad basándose en la captación diferencial de reactivos fluorescentes (Guava Technologies, Hayward, CA); el kit de ensayo de proliferación celular CyQUANT® (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR); y el kit de ensayo CytoLux (PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA). Los kits de ensayo DELFIA® (PerkinElmer Life Sciences Inc., Boston, MA) pueden determinar la proliferación y la viabilidad celular usando un método fluorométrico resuelto en tiempo. El ensayo de proliferación celular Quantos™ es un ensayo basado en la fluorescencia que mide la fluorescencia de un complejo de colorante del ADN procedente de células lisadas (Stratagene, La Jolla, CA). El ensayo de viabilidad celular CellTiter-Glo es un ensayo luminiscente para medir la viabilidad celular (Promega, Madison WI).

Los términos "sujeto" y "paciente" se usan de manera indistinta en el presente documento y se refieren a animales, normalmente mamíferos, tales como seres humanos, primates no humanos (gorila, chimpancé, orangután, macaco, gibón), animales domésticos (perro y gato), animales de granja y de explotaciones (caballo, vaca, cabra, oveja, cerdo) animales de laboratorio y experimentales (ratón, rata, conejo, cobaya). Los sujetos incluyen animales de modelos de enfermedad (por ejemplo, tales como ratones, ratas y primates no humanos) para estudiar la eficacia in vivo (por ejemplo, un modelo animal de neoplasia, tumor o cáncer, o metástasis). Los sujetos humanos incluyen niños, por ejemplo, recién nacidos, bebés, niños pequeños y adolescentes, entre las edades de 1 y 5, 5 y 10 y 10 y 18 años, adultos entre las edades de 19 y 60 años, y personas mayores, por ejemplo, entre las edades de 60 y 65, 65 y 70 y 70 y 100 años.

Los sujetos incluyen mamíferos (por ejemplo, seres humanos) que necesitan tratamiento es decir, que tienen una proliferación celular indeseable o anómala (hiperproliferación celular) o un trastorno hiperproliferativo celular. Los sujetos también incluyen aquellos que están en riesgo de tener una proliferación celular indeseable o un trastorno hiperproliferativo celular. Los sujetos incluyen además un sujeto que necesita un tratamiento proliferativo anticelular o un tratamiento o terapia inmunopotenciador debido a un diagnóstico de laboratorio o clínico que corrobora dicho tratamiento, los sujetos experimentan un tratamiento proliferativo anticelular o un tratamiento inmunopotenciador, y los sujetos que han experimentado un tratamiento proliferativo anticelular o un tratamiento inmunopotenciador y están en riesgo de recidiva o recurrencia.

Los sujetos en riesgo incluyen aquellos con antecedentes históricos familiares, predisposición genética, o que han padecido una dolencia previa con un trastorno proliferativo celular o hiperproliferativo celular (por ejemplo, una hiperplasia benigna, neoplasia, tumor o cáncer, o metástasis) y están es riesgo de experimentar recidiva o reincidencia. Los sujetos en riesgo incluyen además la exposición ambiental a carcinógeno o mutágenos, tales como fumadores, o aquellos en un escenario laboral (industrial, químico, agrícola). Dichos sujetos en riesgo de desarrollar un trastorno proliferativo celular o un trastorno hiperproliferativo celular tal como una neoplasia, tumor o cáncer, se puede identificar con tamicos genéticos para los genes asociados a tumor, las deleciones de genes o las mutaciones de genes. Los sujetos que carecen de *Brea1* están en riesgo, por ejemplo, de desarrollar cáncer de mama. Los sujetos en riesgo de desarrollar cáncer de colon han perdido o mutado los genes supresores del tumor, tales como la poliposis cólica adenomatosa. Se sabe de sujetos en riesgo que tienen una predisposición genética hacia los trastornos proliferativos celulares (véase, por ejemplo, *The Genetic Basis of Human Cancer* 2ª ed. por Bert Vogelstein (Editor), Kenneth W. Kinzler (Editor) (2002) McGraw-Hill Professional; *The Molecular Basis of Human Cancer*. Editado por WB Coleman y GJ Tsongalis (2001) Humana Press; y *The Molecular Basis of Cancer*. Mendelsohn et al., WB Saunders (1995)).

Los sujetos en riesgo pueden por tanto tratarse a fin de inhibir o reducir la probabilidad de desarrollar un trastorno proliferativo celular o un trastorno hiperproliferativo celular, o después de haberse curado de un trastorno proliferativo celular, padecer una recidiva o reincidencia del mismo o un trastorno proliferativo celular o un trastorno hiperproliferativo celular diferente. El resultado de dicho tratamiento puede ser reducir el riesgo de desarrollar un trastorno proliferativo celular o trastorno hiperproliferativo celular, o para evitar un trastorno proliferativo celular o un trastorno hiperproliferativo celular, o una patología, síntoma adverso o sus complicaciones en el sujeto en riesgo tratado.

La invención proporciona además kits, incluyendo anticuerpos, fragmentos funcionales, formas y variantes modificadas, ácidos nucleicos, agentes, fármacos y formulaciones farmacéuticas, envasadas en un material de envase adecuado, opcionalmente en combinación con instrucciones para utilizar los componentes del kit, por ejemplo, instrucciones para llevar a cabo un método de la invención. En una realización, el kit incluye un anticuerpo LM-1, como se representa por un anticuerpo producido por una línea de células DSMZ con N.º de registro DSM ACC 2623 o representado por las secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera que se muestran como las SEQ ID NO:1, 5, 7 o 9, y 11 o 13 y un tratamiento proliferativo anticelular o un tratamiento inmunopotenciador, agente o fármaco. En un aspecto, las instrucciones son para tratar la proliferación o hiperproliferación celular indeseable o un trastorno hiperproliferativo celular. En otro aspecto, las instrucciones son para tratarse una neoplasia, tumor o cáncer, o metástasis. En una realización adicional, un kit incluye un anticuerpo LM-1, como se representa por el anticuerpo producido por la línea de células DSMZ con N.º de registro DSM ACC 2623, o representado por las secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera que se muestran como las SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 o 9, y 11 o 13, o un anticuerpos que se une a un antígeno LM-1 (por ejemplo, NONO/nmt55), y las instrucciones para tratar la proliferación o la

hiperproliferación células indeseable, o un trastorno hiperproliferativo celular, y un tratamiento proliferativo anticelular o un tratamiento, agente o fármaco. En diversos aspectos, un kit incluye un agente antineoplásico, un agente anticanceroso o un agente antitumoral. En otros aspectos más, el kit incluye un artículo de fabricación, por ejemplo, un artículo de fabricación para administrar el anticuerpo o el ácido nucleico, un tratamiento proliferativo anticelular o un tratamiento inmunopotenciador, agente o fármaco en un sujeto local, regional o sistémicamente.

El término "material de envasado" se refiere a una estructura física que aloja los componentes del kit. El material de envasado puede mantener los componentes de forma estéril, y pueden prepararse de materiales comúnmente utilizados para dichos fines (por ejemplo, fibra corrugada, vidrio, plástico, hoja de aluminio, ampollas, etc.). La marca o inserción de envasado puede incluir instrucciones escritas adecuadas, por ejemplo, la práctica de un método de la invención, por ejemplo, tratar un trastorno proliferativo celular o un trastorno hiperproliferativo celular, un ensayo para cribar para, detectar o identificar un antígeno LM-1 (por ejemplo, NONO/nmt55), o una célula a la cual se une el anticuerpo LM-1, como se representa por el anticuerpo producido por la línea celular DSMZ con N.º de registro DSM ACC 2623, o representado por las secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera que se muestran como SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 o 9, y 11 o 13, etc. de esta manera, en realizaciones adicionales, el kit incluye una marca o inserción de envasado que incluye las instrucciones para practicar un método de la invención en solución, *in vitro*, *in vivo*, o *ex vivo*.

Las instrucciones pueden por tanto incluir instrucciones para practicar cualquiera de los métodos de la invención descritos en el presente documento. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas pueden estar incluidas en un recipiente, envase, o dispensador junto con las instrucciones para la administración a un sujeto para tratar el trastorno proliferativo celular o el trastorno hiperproliferativo celular, tal como una neoplasia, tumor o cáncer, o metástasis. Las instrucciones pueden incluir indicaciones desde un criterio de valoración clínico satisfactorio, o cualesquiera síntomas o complicaciones adversas que se pueden producir, información del almacenamiento, fecha de caducidad, o cualquier información requerida por los organismos reguladores tales como la Food and Drug Administration para uso en un sujeto humano.

Las instrucciones pueden estar en "material impreso" por ejemplo, en papel o cartoncillo en el kit, sobre una marca prefijada al kit o material de envasado unidas a un vial o tubo que contiene un componente del kit. Las instrucciones pueden comprender cintas de voz o vídeo y adicionalmente pueden estar incluidas en un medio legible informáticamente, tal como un disco (un disco flexible o un disco duro), CD óptico, tal como CD- o DVD-ROM/RAM, cinta magnética, medios de almacenamiento eléctrico tales como RAM y ROM e híbridos de estos tales como medios de almacenamiento magnético/óptico.

Los kits de la invención pueden incluir adicionalmente un agente tamponante, un conservante, o un agente estabilizante de proteína/ácido nucleico. El kit puede incluir también componentes del control para evaluar la actividad, por ejemplo, una muestra del control o una normalizada. Cada componente del kit puede estar encerrado en un recipiente individual o en una mezcla y todos los diversos recipientes pueden estar en envases individuales o múltiples.

Los anticuerpos (por ejemplo, anticuerpo LM-1, como se representa por el anticuerpo producido por una línea de células DSMZ con N.º de registro DSM ACC 2623, o representado por las secuencias de la cadena pesada y la cadena ligera que se muestran como las SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 o 9, y 11 o 13 o un anticuerpo que se une a un antígeno de LM-1 (por ejemplo, NONO/nmt55)), ácidos nucleicos, y otras composiciones (por ejemplo, un antígeno de LM-1 (por ejemplo, NONO/nmt55)) y los métodos de la invención pueden estar incluidos en o emplean formulaciones farmacéuticas. Dichas formulaciones farmacéuticas son útiles para el tratamiento de, o la administración o liberación a, un sujeto *in vivo* o *ex vivo*.

Las formulaciones farmacéuticas incluyen transportadores, diluyentes o excipientes "farmacéuticamente aceptables" y "fisiológicamente aceptables". Como se usa en el presente documento los términos "farmacéuticamente aceptable" y "fisiológicamente aceptable" incluyen disolventes (acuosos o no acuosos), soluciones, emulsiones, medios de dispersión, revestimientos, agentes promotores o retardantes isotónicos y de absorción, compatibles con la administración farmacéutica. Dichas formulaciones pueden estar contenidas en un líquido; emulsión, suspensión, jarabe o elixir, o en forma sólida comprimidos (revestidos o no revestidos), cápsulas (dura o blanda), polvo, gránulo, cristal o microperla. Se pueden incorporar también compuestos suplementarios (por ejemplo, conservantes, agentes antibacterianos, antivírico y antifúngicos)

Puede prepararse formulaciones farmacéuticas para ser compatibles con una administración o ruta de liberación local, regional o sistémica. De esta manera, las formulaciones incluyen transportadores, diluyentes, o excipientes adecuados para la administración mediante rutas concretas. Los ejemplos no limitantes específicos de rutas de administración de la invención son parenteral, por ejemplo, intravenosa, intraarterial, intradérmica, intramuscular, subcutánea, intrapleural, transdérmica (tópica), transmucosal, intracraneal, intraespinal, intraocular, rectal, oral (alimentaria), administración mucosal, y cualquier otra formulación adecuada para el método de tratamiento o el protocolo de administración.

65

Las soluciones o suspensiones utilizadas para la aplicación parenteral pueden incluir; una diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes como ácido etilendiaminotetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tal como cloruro de sodio o dextrosa. Se puede ajustar el pH con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio.

Las formulaciones farmacéuticas para la inyección incluyen soluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los transportadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). El transportador puede ser un disolvente o un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y sus mezclas adecuadas. Se puede mantener la fluidez, por ejemplo, mediante el uso de materiales de revestimiento como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos. Los agentes antibacterianos y antifúngicos incluyen, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico y timerosal. Se pueden incluir en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio. Incluyendo un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina pueden prolongar la absorción de las composiciones inyectables.

Se pueden preparar formulaciones inyectables estériles incorporando la composición activa en la cantidad requerida en un disolvente adecuado con uno o una combinación de los ingredientes anteriores. Generalmente, se preparan dispersiones incorporando la composición activa en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico cualquier otro ingrediente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación incluyen, por ejemplo, secado al vacío y criodesecación que da como resultado un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseada procedente de una de sus soluciones preparadas anteriormente.

Para la administración transmucosal o transdérmica, se utilizan en la formulación penetrantes adecuados para la barrera a permear. Dichos penetrantes son conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosal, detergentes, sales biliares, y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosal se puede realizar mediante el uso de pulverizadores nasales, dispositivos de inhalación (por ejemplo, aspiradores) o supositorios. Para la administración transdérmica, los principios activos se formulan en pomadas, ungüentos, geles, cremas o parches.

Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar con portadores que protegen contra la rápida eliminación del organismo, tales como una formulación de liberación controlada o un material de retraso temporal tal como monoestearato de glicerilo o estearato de glicerilo. Las formulaciones también se pueden suministrar usando artículos de fabricación tales como implantes y sistemas de administración microencapsulados para conseguir una liberación local, regional o sistémica, o la liberación controlada o liberación sostenida.

Se pueden usar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etileno acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, Poliortoésteres, y ácido poliláctico. Los métodos de preparación de dichas formulaciones son conocidos de los expertos en la materia. Los materiales también se pueden obtener comercialmente de Alza Corporation (Palo Alto, CA). Las suspensiones liposómicas (que incluyen liposomas dirigidos a células o tejidos usando anticuerpos o proteínas del revestimiento vírico) también se pueden utilizar como transportadores farmacéuticamente aceptables. Estos se pueden preparar según métodos conocidos, por ejemplo, como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 4.522.811.

Otras composiciones farmacéuticas adecuadas para administración son conocidas en la materia (véase, (por ejemplo, Gennaro (ed.), Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª ed., Lippincott, Williams & Wilkins (2000); Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7ª ed., Lippincott Williams & Wilkins Publishers (1999); Kibbe (ed.), Handbook of Pharmaceutical Excipients American Pharmaceutical Association, 3ª ed., (2000); y Remington's Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms, Technic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa., (1993)).

Las composiciones utilizadas de acuerdo con la invención, incluyendo proteínas (anticuerpos), ácidos nucleicos (inhibidores), tratamientos, terapias, agentes, fármacos y formulaciones farmacéuticas se pueden envasar en formas farmacéuticas unitarias para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma farmacéutica unitaria que se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el tratamiento; cada unidad contiene una cantidad de la composición junto con el transportador, excipiente, diluyente, o vehículo calculada para producir el efecto terapéutico o tratamiento deseado (por ejemplo, beneficioso. La forma farmacéutica unitaria dependerá de varios factores entre los que se incluyen, aunque no de forma limitativa necesariamente, la composición específica empleada, el efecto a conseguir, y la farmacodinámica y farmacogenómica del sujeto que se va a tratar.

Se describen métodos sin células (por ejemplo, en fase solución, en fase sólida) y con células (*in vitro*) para cribar, detectar e identificar una célula o antígeno (por ejemplo, NONO/nmt55) a quien se une un anticuerpo LM-1, representado mediante un anticuerpo producido mediante una línea celular depositada con el número de referencia DSMZ DSM ACC 2623, o representada por secuencias de la región de la cadena pesada y ligera definidas como SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 o 9, y 11 o 13. Los métodos se pueden realizar en solución, *in vitro* usando un material o muestra de origen biológico, e *in vivo*, por ejemplo, usando células neoplásicas, tumorales o cancerosas, o células metastásicas, tejido u órgano (por ejemplo, una biopsia) de un animal.

Se describen métodos para identificar, detectar o cribar una célula o un antígeno (por ejemplo, NONO/nmt55) a quien se une un anticuerpo LM-1, representado mediante un anticuerpo producido mediante una línea celular depositada con el número de referencia DSMZ DSM ACC 2623, o representada por secuencias de la región de la cadena pesada y ligera definidas como SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 o 9, y 11 o 13. En una realización, un método incluye poner en contacto un material o muestra de origen biológico con un anticuerpo LM-1, representado mediante un anticuerpo producido mediante una línea celular depositada con el número de referencia DSMZ DSM ACC 2623, o representada por secuencias de la región de la cadena pesada y ligera definidas como SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 o 9, y 11 o 13, o un anticuerpo que se une a un antígeno LM-1 (por ejemplo, NONO/nmt55) en condiciones que permiten la unión del anticuerpo a una célula o antígeno; y analizar la unión del anticuerpo a la célula o el antígeno. La unión del anticuerpo a una célula o antígeno detecta su presencia. En un aspecto, el material o muestra de origen biológico se obtiene de un sujeto mamífero. En un aspecto adicional, el anticuerpo que se une a la célula o antígeno (por ejemplo, NONO/nmt55) es distinto del anticuerpo LM-1, producido mediante una línea celular depositada con el número de referencia DSMZ DSM ACC 2623, o representada por secuencias de la región de la cadena pesada y ligera definidas como SEQ ID NO:1, 3, 5, 7 o 9, y 11 o 13.

También se describen métodos sin células (por ejemplo, en fase solución, en fase sólida) y con células (por ejemplo *in vitro* o *in vivo*) para diagnosticar y vigilar la progresión de un sujeto que tiene o está en alto riesgo de tener una proliferación celular indeseada o anómala, o un trastorno hiperproliferativo celular (por ejemplo, neoplasia, tumor o cáncer, o metástasis), la presencia o extensión de una proliferación celular indeseada o anómala, o un trastorno hiperproliferativo celular (por ejemplo, neoplasia, tumor o cáncer, o metástasis), así como identificar un sujeto adecuado para el tratamiento con un anticuerpo LM-1, o un anticuerpo que se une a un antígeno LM-1 (por ejemplo, NONO/nmt55), debido a la mayor probabilidad de responder al tratamiento. Los métodos se pueden realizar en solución, *in vitro* usando un material o muestra de origen biológico, por ejemplo, una biopsia de células sospechosas que pueden comprender o ser indicativas de células neoplásicas, tumorales o cancerosas, o metastásicas, tejido u órgano. Los métodos también se pueden realizar *in vivo*, por ejemplo, en un animal.

Los ensayos de identificación, detección, cribado y diagnósticos se pueden llevar a la práctica mediante el análisis de células hiperproliferantes potenciales o sospechosas, por ejemplo, una célula o un trastorno hiperproliferativo o una muestra adecuada. Las células incluyen líneas celulares hiperproliferativas, inmortalizadas, neoplásicas, tumorales y cancerosas y aislados primarios derivados de mama, pulmón, tiroides, cabeza y cuello, nasofaringe, nariz o senos frontales, cerebro, espina dorsal, glándulas adrenales, tiroides, linfa, gastrointestinal (boca, esófago, estómago, duodeno, íleon, yeyuno (intestino delgado), colon, recto), tracto genitourinario (útero, ovario, endometrio, cuello de útero, vejiga, testículos, pene, próstata), riñón, páncreas, glándulas adrenales, hígado, hueso, médula ósea, linfa, sangre, músculo, piel, y el sistema hematopoyético, y sitios metastásicos o secundarios.

El término "poner en contacto" cuando se usa en referencia a una composición tal como una proteína (por ejemplo, anticuerpo), material, muestra, o tratamiento, significa una interacción directa o indirecta entre la composición (por ejemplo, proteínas tal como un anticuerpo) y la otra entidad citada. Un ejemplo particular de interacción directa es la unión. Un ejemplo particular de una interacción indirecta es donde la composición actúa a través de una molécula intermedia, que a su vez actúa sobre la entidad citada. Por lo tanto, por ejemplo, poner en contacto una célula (por ejemplo, que comprende un trastorno hiperproliferativo celular) con un anticuerpo incluye permitir que el anticuerpo se una a la célula, o permitir que el anticuerpo actúa a través de un intermedio (por ejemplo, antígeno) que a su vez actúa sobre la célula.

Los términos "ensayar" y "medir" y las variaciones gramaticales de los mismos se utilizan de forma indistinta en el presente documento y se refieren a determinaciones tanto cualitativas como cuantitativas, o tanto cualitativas como cuantitativas. Cuando los términos se utilizan en referencia a la unión, cualquier medio para evaluar la cantidad relativa, afinidad o especificidad de unión se tiene en cuenta, incluyendo los diferentes métodos definidos en el presente documento y conocidos en la materia. Por ejemplo, la unión de un anticuerpo se puede ensayar o medir en un ensayo ELISA, transferencia Western o ensayo de inmunoprecipitación.

El término "correlacionar" y las variaciones gramaticales del mismo se refieren a relaciones o vínculos entre dos o más entidades. Por ejemplo, antígeno de LM-1 (por ejemplo, NONO/nmt55), o células que expresan el antígeno de LM-1 (por ejemplo, sobre la superficie celular) están asociados con diferentes tumores, neoplasias, cánceres y metástasis. Por lo tanto, debido a esta relación entre el antígeno de LM-1 expresado en la superficie celular (por ejemplo, NONO/nmt55) y el cáncer, están correlacionados entre sí. Por lo tanto, la correlación de la cantidad del antígeno de LM-1 (por ejemplo, NONO/nmt55) o células que expresan el antígeno de LM-1 (por ejemplo, sobre la superficie celular) puede indicar la presencia y/o la extensión de un tumor, neoplasia, cáncer o metástasis en un

sujeto.

Salvo que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende habitualmente una persona normalmente experta en la materia a la que se refiere la presente invención. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento para llevar a la práctica o en el ensayo de la invención, los métodos y materiales adecuados se describen en el presente documento.

Todas las publicaciones, patentes, números de registro de Genbank y resto de referencias citadas en el presente documento se incorporan por referencia en su totalidad. En caso de conflicto, la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones, tendrá la preferencia.

Como se usa en el presente documento, las formas singulares "un", "uno" y "el" incluyen las referencias plurales a no ser que el contexto dicte claramente otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a un "anticuerpo" incluye una pluralidad de anticuerpos y la referencia a un "tratamiento o terapia" puede incluir múltiples dosis, simultáneas, consecutivas o secuenciales, tratamientos o terapias, y así sucesivamente.

Como se usa en el presente documento, todos los valores numéricos o intervalos numéricos incluyen números enteros completos incluidos o que abarcan dichos intervalos y fracciones de los valores, o los números enteros incluidos o abarcados en los intervalos salvo que el contexto indique claramente otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a un intervalo de 90-100 %, incluye cualquier valor numérico o intervalo que comprenda o abarque dichos valores, tal como un 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 95 %, 97 %, etc., así como un 91,1 %, 91,2 %, 91,3 %, 91,4 %, 91,5 %, etc., 92,1 %, 92,2 %, 92,3 %, 92,4 %, 92,5 %, etc., y cualquier intervalo numérico comprendido en dicho intervalo, tal como 90-92 %, 90-95 %, 95-98 %, 96-98 %, 99-100 %, etc. En un ejemplo adicional, la referencia a un intervalo de 1-5000 veces incluye, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, veces, etc., así como 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, veces, etc., 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, veces, etc., y cualquier intervalo numérico comprendido en dicho intervalo, tal como 1-2, 5-10, 10-50, 50-100, 100-500, 100-1000, 500-1000, 1000-2000, 1000-5000, etc. En un ejemplo adicional, la referencia a un intervalo de KD 10^{-5M} a aproximadamente KD 10^{-13M} incluye cualquier valor numérico o intervalo que comprende o abarca dichos valores.

La invención se divulga de forma general en el presente documento usando un lenguaje afirmativo para describir las numerosas realizaciones. La invención también incluye especialmente realizaciones en los que una materia sujeto concreta está excluida, en todo o en parte, tales como sustancias o materiales, etapas y condiciones metodológicas, protocolos, procedimientos, ensayos o análisis. Por lo tanto, incluso aunque la invención no se exprese generalmente en el presente documento en términos de que la invención no incluye, los aspectos que no están expresamente incluidos en la invención sin embargo se han divulgado.

Se han descrito numerosas realizaciones de la invención. Sin embargo, se debe entender que se pueden realizar diversas modificaciones sin apartarse del espíritu y alcance de la invención. De acuerdo con ello, los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar pero no limitar el alcance de la invención descrito en las reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1

Este ejemplo incluye una descripción de materiales y métodos.

Cultivo celular: La línea celular de carcinoma escamocelular de pulmón humano LOU-NH91 se cultivó en medio RPMI-1640 (PAA, Viena, Austria) suplementado con de suero de feto de ternera al 20 % (FCS), glutamina 2 mM y penicilina/estreptomicina (ambos al 1 %) e incubado en una atmósfera unificada al 5 % de CO₂ a 37° C. Para los ensayos descritos, las células se hicieron crecer hasta subconfluencia, se separaron con tripsina/EDTA y se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) antes del uso.

Producción de hibridomas: Los inventores inmortalizaron los linfocitos fusionándolos con el heteromioma HAB-1. En resumen, las células del heteromioma HAB-1 se lavaron dos veces con RPMI 1640 (PAA, Viena, Austria) sin aditivos y las células se centrifugaron dos veces durante 5 minutos a 1500 rpm. Los inventores descongelaron linfocitos congelados obtenidos bien del bazo o bien de los ganglios linfáticos, y lavaron dichas células dos veces con RPMI 1640 sin aditivos y centrifugaron dichas células a 1500 rpm durante 5 minutos. Tanto el HAB-1 como el aglomerado de linfocitos se resuspendieron en 10 ml de RPMI 1640 sin aditivos, y se contaron en una cámara de recuento celular Neubauer. Las células se lavaron de nuevo, se añadieron las células HAB-1 y los linfocitos juntos en una relación de 1:2 a 1:3, se mezclaron, y la mezcla se centrifugó durante 8 minutos a 1500 rpm. Se precalentó polietilenglicol 1500 (PEG) a 37° C. y se dejó escurrir el PEG cuidadosamente gota a gota sobre el aglomerado con una pequeña rotación del tubo de 50 ml. A continuación, el aglomerado se resuspendió suavemente y se hizo girar el tubo durante exactamente 90 segundos a 37° C en un baño de agua. Las células se lavaron dos veces con una pipeta completa de 10 ml de RPMI sin aditivos y las células se centrifugaron durante 5 minutos a 1500 rpm. Se añadió 1 ml de RPMI 1640 con suplemento HAT (PAA, Viena, Austria) y FCS al 10 %, glutamina al 1 %, y

penicilina/estreptomicina al 1 % ("RPMI 1640 HAT") en cada pocillo de una placa de 24 pocillos. El aglomerado celular se disolvió en RPMI 1640 HAT y 0,5 ml de las células se añadieron a cada pocillo de la placa de 24 pocillos. A continuación, las placas de 24 pocillos se introdujeron en una incubadora a 37 °C y el medio RPMI 1640 HAT se cambió cada semana. Tras de cuatro a seis semanas, los sobrenadantes de cultivo celular se cribaron para determinar la producción de anticuerpos en un ensayo inmunoenzimático de adsorción (ELISA).

Con este protocolo, aproximadamente 80 % a 90 % de los triomas generados fueron viables y aproximadamente un 50 % secretan inmunoglobulinas. Los clones positivos se analizaron inmunohistoquímicamente en secciones de tejido de tumor autólogo, y los clones que mostraron una reacción positiva se volvieron a clonar posteriormente.

Síntesis de ADNc y RT-PCR: Para obtener la secuencia del anticuerpo, los autores aislaron el ARN completo del trioma usando el kit RNASE de Qiagen. El ARN total también se puede preparar usando métodos convencionales en la técnica, por ejemplo, los descritos en Krenn et al. (Clip. Exp. Immunol. 115:168-175, 1999). La síntesis de ADNc a partir del ARN total obtenido a partir de la línea celular de hibridoma LM-1 (n.º de registro DSMZ DSM ACC2623) se realizó con 5 mg de ARN total usando M-MLV Reverse Transcriptase de Gibco BRL (Eggenstein, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La amplificación de los genes V_H y V_L se llevó a cabo en un volumen de 25 μ l con $MgCl_2$ 1,75 mM, 0,4 pM de cebador, 200 μ M de cada dNTP, y IU Taq polimerasa (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania). Los productos de la PCR se amplificaron con los siguientes perfiles de ciclo: 95 °C, durante 2 min, seguido por 35 ciclos de desnaturalización (94 °C, durante 30 s; 65 °C, durante 30 s (para los cebadores VH3 y VH4), 60 °C, para VH1, VH2, VH5, VH6 y 52 °C, para los cebadores VL, respectivamente; un extensión final a 72 °C, durante 4 min.

Secuenciación del anticuerpo: Los productos de la PCR se purificaron mediante electroforesis en gel con agarosa al 2 % (Roth, Karlsruhe, Alemania) seguido por extracción en gel del producto de la PCR usando un kit de extracción en gel Jetsorb (Genomed, Bad Oeynhausen, Alemania). Los productos de la PCR se clonaron a continuación usando el kit de clonación pCR-Script Amp SK⁺ (Stratagene, Heidelberg, Alemania). Se secuenciaron diez clones positivos usando el kit de secuenciación de finalización del ciclo DyeDeoxy (Applied Bio-Systems Inc., Weiterstadt, Alemania) y se analizaron en un secuenciador automático de ADN ABIPrism373 (ambas cepas se secuenciaron usando los cebadores T3 y T7). Las secuencias se analizaron con el programa informático de comparación de secuencias DNASIS para Windows y las bases de datos GenBank y IMGTV-QUEST. La base de datos de inmunogenética internacional ("IMGT") está coordinada por Marie-Paule Lefranc de la Universidad de Montpellier, Montpellier, Francia.

Tinción inmunohistoquímica de secciones de parafina: Se seccionaron tejidos humanos incluidos en parafina (2 mm). La parafina se eliminó mediante dos lavados con xileno de 5 minutos cada uno, dos lavados con etanol de 5 minutos cada uno, un lavado con metanol (70 μ l) y un lavado con H_2O_2 (500 μ l) durante 5 minutos, dos lavados con etanol al 90 % de 3 minutos cada uno, dos lavados con etanol al 80 % de 3 minutos cada uno, dos lavados con etanol al 70 % de 3 minutos cada uno, y lavado con Tris/NaCl (3 gramos de Tris, 40,5 gramos de NaCl en 5 litros de agua destilada y el pH se ajustó a 7,4 con HCl).

Los portas que contenían las secciones de tejidos se incubaron en 300 ml de agua destilada y ácido cítrico (pH 5,5) en una olla a presión a 100 °C, durante 5 minutos. Los portas se bloquearon durante 15 minutos con 150 μ l de fracción V de albúmina de suero bovino ("BSA"; Roth, Karlsruhe, Alemania) en solución salina tamponada con fosfato ("PBS") por porta, y se lavó una vez con Tris/NaCl.

Las secciones se incubaron con el anticuerpo primario (por ejemplo, LM-1, anticuerpos de IgM monoclonales humanos no relacionados (ChromPure IgM, Dianova, Hamburgo, Alemania, 10 mg/ml), anticuerpo de CK8, o anticuerpo de ratón CAM 5.2) diluido 1:50 (CAM 5.2 diluido 1:10) con BSA/PBS (Dako, Hamburgo, Alemania) durante 2,5 horas en una incubadora humidificada a 37 °C. Las secciones se lavaron a continuación tres veces con Tris/NaCl (3 gramos de Tris, 40,5 gramos de NaCl en 5 litros de agua destilada y el pH se ajustó a 7,4 con HCl), seguido por incubación con el anticuerpo secundario (por ejemplo, complejo de anticuerpo de conejo dirigido contra Ig humana o anticuerpo de conejo dirigido contra Ig de ratón marcado con peroxidasa (Dako)) diluido 1:50 en PBS que contenía suero de conejo al 30 % a temperatura ambiente ("TA") durante 1 hora. Tras lavar tres veces con Tris/NaCl, las secciones de tejido se incubaron en PBS durante 10 minutos antes de la tinción con 150 μ l de diaminobencidina (0,05 %)-peróxido de hidrógeno (0,02 %) durante 10 minutos a TA. La reacción se detuvo usando agua corriente (10-15 minutos) y las secciones se contratiñeron con hematoxilina. Tras montaje con glicerol-gelatina, las secciones se analizaron al microscopio óptico.

Tinción inmunohistoquímica de criosecciones procedentes de tumores autólogos: Los tejidos humanos se cortaron (4 mm) y se secaron al aire durante dos horas, se fijaron en acetona, se secaron al aire durante 30 minutos, y se lavaron con Tris/NaCl (3 gramos de Tris, 40,5 gramos de NaCl en 5 litros de agua destilada y el pH se ajustó a 7,4 con HCl). Las criosecciones se bloquearon a continuación con PBS que contenía leche en polvo al 3 % durante 15-30 minutos a TA. Tras lavar tres veces con Tris/NaCl, las secciones se incubaron con anticuerpos IgM humanos contra LM-1, anticuerpos de IgM monoclonales humanos no relacionados (ChromPure IgM, Dianova, 10 mg/ml), CK8 (diluido 1:50 con BSA/PBS; Dako) o anticuerpo CAM 5.2 de ratón (diluido 1:10 con BSA/PBS) durante 30 minutos a TA. Las secciones se lavaron tres veces con Tris/NaCl, seguido por incubación con anticuerpos

secundarios (conjugado de anticuerpo de conejo dirigido contra Ig humana o anticuerpo de conejo dirigido contra Ig de ratón marcado con peroxidasa 1:50 en PBS al 70 % y suero humano al 30 %) durante 30 minutos a TA. Tras lavar tres veces con Tris/NaCl e incubación en PBS durante 10 minutos, las secciones se tiñeron con diaminobencidina (0,05 %)-peróxido de hidrógeno (0,02 %) durante 10 minutos a TA. La reacción se detuvo bajo
 5 agua corriente y las secciones se contratiñeron con hematoxilina. Tras montaje con glicerol-gelatina, las secciones se analizaron al microscopio óptico.

Preparación de extractos de membrana de célula tumoral: El aislamiento de las proteínas de membrana de las células tumorales se realizó como se ha descrito usando métodos convencionales en la técnica, como se describen,
 10 por ejemplo, en Hensel et al. (Int. 7. Cancer 81:229-235, 1999). En particular, células tumorales confluentes (por ejemplo, células LOU-NH91) se lavaron dos veces con PBS, se recogieron con un raspador celular, se centrifugaron, y se resuspendieron en tampón hipotónico (HEPES 20 mM, KCl 3 mM, MgCl₂ 3 mM) y se incubaron durante 15 minutos sobre hielo. A continuación, las células se sonicaron durante 5 minutos, y los núcleos se aglomeraron por centrifugación a 10.000xg durante 10 min. El sobrenadante se centrifugó durante 40 minutos a 100.000xg en un
 15 rotor basculante para aglomerar las membranas. Tras lavar el aglomerado con el tampón hipotónico, el aglomerado se volvió a suspender en tampón de lisis de membrana (HEPES 50 mM pH 7,4, EDTA 0,1 mM, glicerol al 10 %, y 1 % de Triton X-100). El inhibidor completo de proteasa (Boehringer, Mannheim, Alemania) también se añadió a todas las soluciones.

Transferencia Western: Las transferencias Western se realizaron utilizando técnicas estándar como se describe, por ejemplo, en Hensel et al. (Int. 7. Cancer 81:229-235, 1999). En resumen, las membranas de nitrocelulosa con las transferencias se bloquearon con PBS que contenía un 3 % de leche en polvo baja en grasa, seguido por incubación durante 1 hora con 20-40 µg de anticuerpos IgM humanos contra LM-1 o una IgM de control humana no relacionada (ChromPure IgM, Dianova). El anticuerpo secundario (anticuerpo de conejo dirigido contra IgM humana
 20 acoplado con peroxidasa 1:1.000, Dianova) se detectó mediante el kit de quimioluminiscencia SUPERSIGNAL de Pierce (KMF, St. Augustin, Alemania).

Preparación citoespín: Las células en crecimiento adherente se desprendieron mediante adición de tripsina/EDTA (PAA, Viena, Austria) seguido por una incubación durante 5 minutos en una incubadora humidificada (37° C, 5 % CO₂) y centrifugación durante 5 minutos a 1.500 rpm. A continuación, las células se lavaron dos veces con 10 ml de medio de cultivo celular RPMI-1640 (PAA, Viena, Austria). El número de células se ajustó a una densidad de 1x10⁵ células/ml. A partir de esta solución, 100 µl se centrifugaron sobre portas de microscopio con una centrifuga citoespín (CYTOSPIN 2, Shandon, RU) durante 2 minutos a 50 rpm. Los citoespines resultantes se secaron durante
 30 al menos dos horas y se tiñó como se especifica a continuación.

Tinción con inmunoperoxidasa de citoespines y criosecciones: Los citoespines se secaron durante al menos dos horas a temperatura ambiente o las criosecciones se secaron durante al menos dos horas después de su corte. Las secciones o citoespines se fijaron a continuación durante 10 minutos en acetona. Las criosecciones/citoespines fijados se secaron durante 30 minutos a temperatura ambiente, se lavaron tres veces con Tris/NaCl (3 gramos de Tris, 40,5 gramos de NaCl en 5 litros de agua destilada y el pH se ajustó a 7,4 con HCl), y se introdujeron en Tris/NaCl durante 5 minutos. Las criosecciones/citoespines se bloquearon durante 15-30 minutos con leche en polvo al 3 % en PBS (100 µl por criosección/citoespín) y se lavaron tres veces con Tris-NaCl. Las criosecciones/citoespines se incubaron en 100 µl de anticuerpo primario por criosección/citoespín (por ejemplo, a 20 µg/ml en BSA al 0,5 %/PBS; CK 8 a 1:50 en BSA/PBS; CAM 5.2 a 1:10 en BSA/PBS; o medio RPMI 1640 (PAA, Viena, Austria) como control negativo) durante 30 minutos en una cámara húmeda a temperatura ambiente. Tras la incubación, las criosecciones/citoespines se lavaron tres veces con Tris-NaCl.
 45

Las criosecciones/citoespines se incubaron a continuación en 100 µl de una solución que contiene el anticuerpo secundario (PBS al 70 % + suero de conejo o de ser humano al 30 % + por ejemplo, anticuerpo de conejo dirigido contra ratón 1:50, anticuerpo de conejo dirigido contra IgM humana acoplado con peroxidasa o 1:50, acoplado con peroxidasa; Dako, Hamburgo, Alemania) por criosección/citoespín durante 30 minutos en una cámara húmeda a temperatura ambiente y se lavaron tres veces con Tris-NaCl y se introdujeron en PBS durante 10 minutos. Las criosecciones/citoespines se incubaron a continuación durante 10 minutos en 100 µl de una solución que contenía diaminobenzidina al 0,05 % y peróxido de hidrógeno al 0,02 % (Sigma, Taufkirchen (Múnich), Alemania). Tras la incubación, las criosecciones/citoespines se lavaron con agua destilada y se introdujeron en una solución de tinción de hematoxilina (Roth, Karlsruhe, Alemania) durante 5 minutos. Las criosecciones/citoespines se enjuagaron a continuación durante 15 minutos bajo agua corriente, se lavaron con agua destilada, se taparon con glicerol-gelatina precalentada.
 50

Ensayo de la glicosidasa: Los extractos de membrana de células BXPC-3, preparados mediante centrifugación diferencial, se usaron en los estudios de glicosilación. Para escindir todos los tipos de cadenas de carbohidratos unidas a N y a O, el extracto de membrana se desnaturalizó en tampón que contenía 1 % de dodecilsulfato de sodio y 1 % de β-mercaptoetanol durante 3 min a 95 °C. El extracto desnaturalizado se diluyó en tampón de reacción (PBS pH 7,4, 1 % de nonidet NP-40, 1 % de β-mercaptoetanol) hasta una concentración final de proteína de 0,5 mg/µl. Para la deglicosilación de los carbohidratos unidos a N y a O, se incubaron alícuotas de 100 µl bien con 10 U de N-glicosidasa F (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania) o 5 mU de O-glicosidasa (Roche Applied Science,
 60

Mannheim, Alemania) a 37 °C durante la noche. El extracto no tratado en tampón de reacción sirvió como control. La extensión de la desglicosilación se analizó mediante SDS-Page y procedimiento de transferencia Western.

Ejemplo 2

5 Este ejemplo incluye una descripción de los materiales y métodos usados en los estudios descritos en los Ejemplos 15 y 16.

10 **Materiales:** RPMI 1640 y FCS (PAA), Fect silente (BioRAD), solución de disolución celular (Sigma C5789), Si GENOME siRNA (Dharmacon), uMACS, uColumns, y microperlas de proteína G y microperlas dirigidas contra IgM humana (Miltenyi Biotec).

PBS: 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de Na₂HPO₄, y 0,24 g de KH₂PO₄ en 800 ml de agua destilada.

15 **PBS·Tween:** 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de Na₂HPO₄, 0,24 g de KH₂PO₄ en 800 ml de agua destilada, añadir 400 ul de Tween 20.

Tampón de lisis1: 1 % de Triton, NaCl 150 mM, Tris 50 mM, pH 8.

20 **Tampón hipoton.:** HEPES 20 mM pH 7,4, KCl 3 mM, MgCl₂ 3 mM.

Tampón de análisis: Tris 25 mM, glicina 250 mM, SDS al 0,1 %

25 **Tampón de transferencia:** Tris 48 mM, glicina 39 mM, MeOH al 20 % pH 9.2, añadir un minicomprimido de inhibidor de proteasa por 10 ml 10 µl (Roche).

Tinte de carga: Tris 250 mM, SDS al 10 % 0,5 % de azul de bromofenol, glicerol al 50 %, DTT 210 mM.

30 **Tampón de lisis para preparación de membrana (2):** NaCl 150 mM, Tris 50 mM, 1,5 % de Triton, 0,5 % de Na-DOC, glicerina al 10 %, EDTA 1 mM, pH 8,0, añadir un minicomprimido de inhibidor de proteasa por 10 ml 10 µl (Roche).

35 **Transfección:** Las células BxPc-3 se sembraron en placas de 6 pocillos a 2x10⁵ células/pocillo en día anterior. En el día de la transfección se prepararon dos soluciones (por pocillo): 125 ul de medio exento de suero (SFM) con 5 ul de Fect silente, y 125 ul de SFM y 22,5 ul de solución de ARN 5 uM (concentración final 50 nM). Ambas soluciones se mezclaron y se incubaron durante 30 min a TA, y la mezcla se añadió gota a gota a las células. El medio se cambió después de 5-6 h. Después de 48 horas, las células se lavaron una vez con 1xPBS. Las células se recogieron en 200 ul de tampón de lisis 1.

40 **Preparación de lisado de células completas:** 9 x 10⁶ células (MKN, BxPC, A549) se lavaron tres veces con PBS previamente enfriado. El aglomerado celular se volvió a suspender en 1 ml de tampón de lisis (NaCl 150 mM, 1 % de Triton X-100, Tris-HCl 50 mM, pH 8,0). Después de 30 minutos de incubación en hielo con mezclado ocasional, las células se centrifugaron a 10.000xg a 4 °C para sedimentar los residuos celulares. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo de 1,5 ml.

45 **Preparación de extractos de membrana celular:** Tras eliminar el medio de la placa de cultivo, las células se lavaron tres veces con PBS previamente enfriado. 5 ml de PBS previamente enfriado se añadieron a una placa de cultivo de 15 cm y las células se rasparon con un raspador celular. La suspensión celular se transfirió a un tubo de centrífuga de 50 ml y se centrifugó a 1.300 rpm durante 5 minutos. Los aglomerados celulares de diferentes placas de cultivo se recogieron y se volvieron a lavar con PBS. Tras la centrifugación con 1.300 rpm durante 5 minutos, las células se volvieron a suspender en tampón hipotón. (10 ml / 1 g de aglomerado celular). La suspensión celular se cultivó durante 30 minutos sobre hielo con vortización cada 5 minutos y a continuación se congelaron y se descongelaron en nitrógeno líquido 5 veces. Para sedimentar los residuos celulares, la suspensión se centrifugó durante 10 minutos a 13.000 rpm a 4 °C. El sobrenadante resultante se centrifugó a continuación en una ultracentrífuga durante 45 minutos a 125.000xg a 4° C. El aglomerado resultante de 4 g de suspensión se volvió a suspender en 1 ml de tampón de lisis y se disolvió con un pulso de sonicación corto (2 s). La suspensión se centrifugó durante 10 minutos a 13.000 rpm a 4 °C y el sobrenadante que contenía la fracción de membrana se transfirió a un tubo nuevo de 1,5 ml.

60 **Inmunoprecipitación:** La inmunopurificación se realizó con microcolumnas y un separador µMACS (Miltenyi Biotec). A 150-300 µl de preparación de membrana se añadieron 300-400 µl de lisado completo, 1,5 µl de anticuerpo monoclonal de ratón (antinmt55) y se añadieron 50 µl de microperlas de proteína G (marcadas magnéticamente) y se rellenó con tampón de lisis hasta un volumen total de 800 µl.

65 La suspensión se incubó durante 30 minutos rotando a 16 rpm a 4 °C. Las µColumns Mintenyi se introdujeron en el campo magnético del separador µMACS. Las columnas se prepararon por enjuagado con 200 µl de tampón de lisis.

El lisado celular se aplicó sobre la columna. Cuando el lisado hubo pasado por la columna, esta se lavó con 5x200 µl de tampón de lisis. Para elución, 20 µl de tampón de carga de gel precalentado (95° C) 1x SDS (Tris HCl 50 mM, pH 6,8; DTT 50 mM, SDS al 1 % azul de bromofenol al 0,005 %; glicerol al 10 %) se aplicó sobre la columna y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Un tubo de recogida nuevo se colocó bajo la columna y la columna se eluyó con otros 50 µl de tampón de carga de gel precalentado (95° C) 1x SDS.

SDS-PAGE: Las muestras se aplicaron a un SDS-PAGE al 10 % tras adición de 15 µl de tampón de carga a 35 µl de células lisadas. Se cargaron 14 µl por hilera, se analizó el gel durante 45 min a 40 mA.

Transferencia Western: El gel se transfirió en una cámara de transferencia húmeda (BioRad) sobre una membrana de PVDF (Millipore) durante 1 hora a 350 mA. Las transferencias se bloquearon en leche seca al 5 % en PBS-Tween durante una hora. Los primeros anticuerpos anti-grp78 (1:2000), anti-nmt55 (1:2500) y anti-vimentina (1:1250) se aplicaron durante 1 hora en leche seca al 5 % en PBS-Tween. LM1 C7 (40 µg/ml) se aplicó durante 2 horas. Las transferencias se lavaron con PBS-Tween durante 5 minutos tres veces, y el anticuerpo secundario acoplado con peroxidasa se aplicó durante una hora. Las transferencias se lavaron 3 veces durante 15 minutos y se revelaron con soluciones Pierce ECI Super Signal West Pico.

FACS: Las células siempre se mantuvieron sobre hielo, y se utilizó PBS filtrado con membrana y enfriado sobre hielo. Las células procedentes de la transfección se disolvieron en solución de disociación celular durante 140 minutos, después se volvieron a suspender en medio de cultivo completo, se centrifugaron a 800 g durante 5 minutos, las células se volvieron a suspender en medio de cultivo completo nuevo y se contaron, las células se ajustaron a 2×10^5 /ml en medio completo y se incubaron sobre hielo durante 30 min. Se dispensó 1 µl de células a cada tupo Eppendorf, se lavó con PBS, se centrifugaron a 800 g a 4° C, se volvió a suspender en 500 µl de PBS, se centrifugó y después se añadió el primer anticuerpo; LM1 a 25 resp. 100 µg/ml, o anti-nmt55 a 1:50 resp 1:25-1:100. Los controles negativos fueron anticuerpos control de isotipo y, sin el 1º anticuerpo. Tras la incubación con el anticuerpo, las células se lavaron una vez con PBS y el anticuerpo secundario (anticuerpo dirigido contra IgM-FITC humana, (DAKO, F0317) o anticuerpo dirigido contra IgG FITC de ratón (Dianova, 115-095-008)-diluido 1:50 en 200 µl, se añadió a lo anterior, y se incubó durante 30 min (en la oscuridad). Posteriormente, las células se lavaron tres veces con PBS, se transfirieron a un tubo FACS en 250 µl de PBS. FACS se llevó a cabo en un FACS Scan (Beckmann-Coulter), y los datos se analizaron con el programa informático libre WinMDI 2.8.

Cultivo celular: A549 (células epiteliales basales de alvéolo humano carcinómico) y HEK293 (células de riñón de embrionario humano) se obtuvieron de la ECACC (colección europea de cultivo celular). El medio de cultivo de las células A549 y HEK293 fue RPMI 1640 sin glutamina (PAA) suplementado con suero de feto de ternera al 10 %, 1 % de 1-glutamina y antibióticos. Las células se cultivaron a 37 °C, 95 % de aire y 5 % de CO₂, y se pasaron cada 2 a 3 días.

Generación de construcciones Nono de sentido directo y sentido contrario: El ADNc Nono humano se amplifica mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando la línea celular de cáncer pancreático humano BxPC. ADNc como molde usando el siguiente conjunto de cebadores: cebador 5' -ATG CAG AGT AAT AAA ACT TTT AAC-3', y cebador 3', 5'-GTA TCG GCG ACG TTT GTT TGG GGC3'. Este fragmento se ligó mediante clonación en el vector pcDNA3.1-V5-His TOPO TA (Invitrogen) que produjo los plásmidos Nono de sentido directo y contrario en una proporción de 50:50. Algunas construcciones Nono de sentido directo y sentido contrario se identificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se denominaron "pcDNA3.1-V5-His-Nono-6xHis-Anti" y "pcDNA3.1-V5-His-Nono-6xHis". La dirección de la secuencia del producto de la PCR en la construcción de expresión se confirmó mediante secuenciación de ADN (Qiagen).

Construcción de una línea celular estable: Para generar una línea celular estable, se transfectaron 5 µg de plásmido pcDNA3.1-V5-His-Nono-6xHis-Anti o pcDNA3.1-V5-His-Nono-6xHis, que transmite resistencia a neomicina, en células A549 usando el reactivo TransPass Transfection (BioLabs) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Dos días después de la transfección, las células se seleccionaron en 1 mg/ml de G418 (PAA) durante 2 semanas. A continuación, los clones resistentes a G418 se seleccionaron y se analizaron para determinar la expresión de la proteína Nono reducida o aumentada mediante transferencia Western usando el anticuerpo mnt 55 (Dianova) o el anticuerpo penta-His (Qiagen). Se identificaron y expandieron varios clones positivos.

Producción de proteínas en bacterias (*E. Coli*): *E. Coli* BL21 Star™(DE2) se transformaron con un plásmido que codificaba en transcrito de longitud completa del gen Nono humano denominado "pEXP5-CT-Nono-6xHis." Se seleccionaron los transformantes en placas LB que contenían ampicilina y a continuación las colonias se hicieron crecer durante la noche a 37 °C en medio LB suplementado con 100 mg/ml de ampicilina con agitación a 250 rpm. El cultivo nocturno se diluyó 25 veces con medio LB nuevo complementado con ampicilina y cultivado a 37 °C hasta alcanzar una DO⁶⁰⁰ de 0,9. A continuación, la expresión de la proteína se indujo mediante la adición de IPTG 1 mM (isopropil-1-tio-β-D-galacto-piranosido, Invitrogen) e incubación a 37 °C durante 3 h. Las bacterias se recogieron mediante centrifugación y se lisaron por sonicación en un tampón que contenía NaCl 20 mM, Tris-HCl 0,1 M pH 7,8, MgCl₂ 10 mM, 1/1000 (NP-40, EDTA 0.5 mM, 1/10 glicerol, PMSF 50 µl y 0,2 mg/ml de agentes lisozima y antiproteasa (Complete, Roche). Tras la eliminación de los residuos celulares mediante centrifugación (10 min, 5000 g), la proteína se comprobó mediante análisis por transferencia Western.

Ejemplo 3

5 Este ejemplo incluye una descripción de la generación de una línea celular que expresa el anticuerpo monoclonal LM-1. Los siguientes estudios se realizaron usando los materiales y métodos del Ejemplo 1. También se incluye una descripción de las secuencias de la región variable de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo monoclonal LM-1.

10 Tal como se ha descrito anteriormente, el hibridoma que expresa el anticuerpo monoclonal LM-1 se obtuvo fusionando linfocitos obtenidos de los ganglios linfáticos de un paciente de cáncer con una línea celular de heteromioma HAB-1 (Taller, et al., Br. J. Cancer 62:595-598, 1990). Las fuentes linfoides no estaban preseleccionadas en los que respecta a la edad o sexo del paciente. La célula resultante es un tipo de hibridoma conocido como trioma, ya que es la fusión de tres células. Análogamente a los linfocitos B normales, este trioma tiene la capacidad para producir anticuerpos. La especificidad del anticuerpo se determina por la especificidad del linfocito original procedente del paciente que se usó para generar el trioma.

15 Los sobrenadantes del hibridoma se cribaron para la producción de anticuerpos con un ensayo ELISA. Después del ELISA, los anticuerpos se analizaron inmunohistoquímicamente, en primer lugar, contra su tumor autólogo para determinar la reactividad específica de tumor. El anticuerpo LM-1 se generó a partir de los linfocitos de un paciente con adenocarcinoma de pulmón.

20 Las CDR previstas, de las que hay tres en cada cadena ligera y pesada, se denomina convenientemente en el presente documento como LC-CDR1, LC-CDR2 y LC-CDR3; y HC-CDR1, HC-CDR2 y HC-CDR3.

25 Las secuencias previstas de la CDR de la región variable de cadena pesada de LM-1 son CDR1, VSGGSISSGGYY, CDR2, YIYYSGSTYYNPSLKS, y CDR3, VDARYDYVWGSYRYDAFDI. La CDR1 de la cadena pesada de LM-1 expande los nucleótidos 72-105 que codifican los aminoácidos 24-35, La CDR2 expande los nucleótidos 153-201 que codifican los aminoácidos 52-67, y la CDR3 expande los nucleótidos 300-354 que codifican los aminoácidos 100-118.

30 Las secuencias previstas de la CDR de la región variable de cadena ligera son CDR1; SGSSSNIGNNYVS, CDR2; DNNKRPSG, y CDR3; GTWSSLSAGWV

35 La CDR1 o la cadena ligera lambda expande los nucleótidos 69-105 que codifican los aminoácidos situados en las posiciones 23-35. CDR2 expande los nucleótidos 153-174 que codifican los aminoácidos 51-58 y CDR3 expande los nucleótidos 270-303 y codifica los aminoácidos 90-101.

Ejemplo 4

40 Este ejemplo incluye una descripción de la caracterización inmunohistoquímica del anticuerpo LM-1. Los siguientes estudios se realizaron usando los materiales y métodos del Ejemplo 1.

45 Para caracterizar el anticuerpo monoclonal secretado por un hibridoma, los autores sometieron a ensayo el anticuerpo contra un panel de tejidos normales y tumorales usando un ensayo con inmunoperoxidasa como se describe en la sección de materiales y métodos. Este ensayo proporciona una visión general de qué tejidos se tiñen con el anticuerpo y la distribución del antígeno.

50 Los anticuerpos que son específicos de células tumorales y de tejido normal se caracterizaron adicionalmente. En primer lugar, los inventores sometieron a ensayo los anticuerpos con los mismos tipos de tumores de diferentes pacientes. A continuación, los inventores sometieron a ensayo a los anticuerpos contra tumores de otros órganos y, finalmente, contra tejidos normales. Con estos ensayos, los inventores identificaron el anticuerpo monoclonal humano LM-1. Este anticuerpo reactivo a tumor es uno del isotipo IgM/λ (Tabla 1).

TABLA 1

Origen del anticuerpo monoclonal LM-1 contra IgM y datos clínicos de pacientes de cáncer									
Anticuerpo	Órgano	Tipo de tumor	Estadio tumoral	Grado tumoral	Edad	Sexo	Fuente de linfocitos	de	Clase Ig
LM-1	Pulmón	Adenocarcinoma	T2N1	G3	45	M	Ganglio linfático		IgM/λ

55 Para investigar el origen genético de estos anticuerpos monoclonales humanos contra IgM, se amplificó el gen V_H, se clonó y se secuenció. La secuencia se comparó con las secuencias de la línea germinal en la base de datos IMGT/V-QUEST para identificar los genes de línea germinal con mayor homología y para detectar mutaciones somáticas. Los resultados se presentan en la Tabla 2. El grado de identidad de las secuencias de nucleótidos del segmento V_H con las de los genes V_H de la línea germinal más cercana fue aproximadamente del 99,6 % como se resume en la Tabla 2.

60

TABLA 2

Caracterización de la región pesada variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal LM-1 contra IgM				
Anticuerpo	Gen de la línea germinal	Homología (%)	Marco R/S	CDR de R/S
LM-1	IGHV 4-30.01/4-31 *01	99,6	1/0	0/0

5 Genes de la familia del gen VH4 expresan el anticuerpo LM-1. La elevada homología entre las regiones VH y los genes de la línea germinal y la baja relación R/S, que es un indicador de la maduración por afinidad de los anticuerpos, indica que ninguno de los anticuerpos experimentó maduración por afinidad debido al contacto con el antígeno. Los datos indican que el anticuerpo LM-1 pertenece a la familia de anticuerpos naturales no madurados por afinidad.

10 Tras el ensayo inicial en tumores autólogos, los modelos de reacción de los anticuerpos se investigaron con mayor detalle usando tinción inmunohistoquímica sobre varios carcinomas y tejidos normales incluidos en parafina y crioincluidos. El anticuerpo LM-1 no mostró actividad de unión detectable con tejidos normales (Tabla 3).

TABLA 3

Modelo de reacción del anticuerpo monoclonal LM-1 dirigido contra IgM sobre tejidos normales			
Tejido	LM-1	CAM 5.2	M6 (IgM-Control)
Estómago	-	+	-
o Colon	-	+	-
Pulmón	-	-	-
Esófago Vejiga	-	-	-
urinaria	-	-	-
Próstata	-	-	-
Mama	-	-	-
Páncreas	-	-	-
Tejido	LM-1	5.2	Control)
Intestino delgado	-	+	-

15 Por el contrario, el anticuerpo LM-1 tiñe diferentes tejidos tumorales (Tabla 4).

TABLA 4

Modelo de reacción del anticuerpo monoclonal LM-1 dirigido contra IgM sobre tejidos tumorales				
Tejido	Tipo de carcinoma	LM-1 +/-	CAM 5.2	M6 (IgM-Control)
Estómago	Adeno/difuso	5/0	+	-
	Adeno/intestinal	2/1	+	-
Colon	Adeno	3/0	+	-
Pulmón	Adeno	5/1	+	-
	Célula escamosa	6/0	+(CK5/6)	-
Esófago	Célula escamosa	3/0	+(CK5/6)	-
	Adeno (Barrett)	4/0	+	-
Páncreas	Adeno	6/0	+	-
Vejiga urinaria	Urotel	1/0	+	-
Riñón	Células renales	1/0		-
Próstata	Adeno	7/0	+	-
Mama	Invasivo (ductal)	4/0	+	-
	Invasivo (lobular)	4/0	+	-
Ovario	Adeno	3/0	+	
Útero	Adeno	3/0	+	

20 El anticuerpo LM-1 proporcionó una amplia gama de modelos de tinción en varios tejidos tumorales que se analizaron. Los anticuerpos del control positivo usados en estos estudios fueron un anticuerpo monoclonal humano dirigido contra citoqueratina humana 5/6 ("CK 5/6;" Dako A/S, Dinamarca) para el carcinoma escamocelular del pulmón y esófago y un anticuerpo monoclonal de ratón contra citoqueratina humana ("CAM 5.2;" Becton Dickinson,

Nueva Jersey). Se usaron en los estudios anticuerpos del control positivo adicionales (AEI/AE3 para el adenocarcinoma de colon y el anticuerpo CK8 para el carcinoma ductal invasivo de mama).

5 Para examinar el antígeno reconocido por el anticuerpo LM-1. Se realizaron transferencias Western con extractos de membrana de la línea celular de carcinoma de pulmón establecida LOU-NH91. El anticuerpo LM-1 reacciona con el antígeno con un peso molecular aproximado de 70 kDa. Para descartar la unión no específica de los anticuerpos IgM a los extractos de membrana, una IgM de control humana no relacionada se usó como el control.

10 Además, el anticuerpo monoclonal LM-1 también tiñe específicamente numerosas líneas celulares de carcinoma. En particular, el anticuerpo LM-1 se une específicamente a la línea celular de adenocarcinoma de pulmón Colo-699 (número de registro a DSMZ ACC 196), línea celular de adenocarcinoma de pulmón DV-90 (número de registro DSMZ ACC 307), línea celular de carcinoma epidermoide de pulmón EPLC-272H (número de registro DSMZ ACC 383), y línea celular de carcinoma escamocelular de pulmón LOU-NH91 (número de registro DSMZ ACC 393).
15 Portas de estas células se tiñeron de acuerdo con el protocolo de citoespín descrito en la sección de materiales y métodos.

Ejemplo 5

20 Este ejemplo incluye una descripción los estudios de inhibición de la proliferación celular de un anticuerpo LM-1. Los siguientes estudios se realizaron usando los materiales y métodos del Ejemplo 1.

25 La proliferación celular se puede analizar mediante numerosos métodos que son convencionales en la técnica, por ejemplo, por la reducción de sales de tetrazolio. La sal de tetrazolio de color amarillo bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio ("MTT") (Sigma, St. Louis, MO.), se reduce por las células metabólicamente activas, en parte por la acción de las enzimas deshidrogenasas mitocondriales para generar equivalentes reductores como NADH y NADPH. El formazano intracelular resultante de color púrpura se puede solubilizar y cuantificar por métodos espectrofotométricos. El ensayo de proliferación celular MTT mide la tasa de proliferación celular y, cuando los eventos metabólicos conducen a la apoptosis, la reducción en la viabilidad celular.

30 Para el ensayo MTT, los inventores tripsinizaron las células y resuspendieron las células en 10 ml de medio RPMI-1460 que contenía suero de feto de ternera al 10 % ("FCS") (20 % de FCS para LOU-NH91), glutamina al 1 %, y penicilina/estreptomina al 1 % (medio completo). Las células se contaron a continuación y se diluyeron a 1×10^6 células/ml. 50 μ l de esta suspensión se pipetearon en los pocillos de una placa de 96 pocillos, dando como resultado aproximadamente 5×10^4 células/pocillo. La primera fila de pocillos se dejó vacía. A continuación se añadieron 50 μ l de anticuerpo diluido en medio completo a cada pocillo. La placa de 96 pocillos se incubó a continuación durante 24 o 48 horas en una incubadora a 37 °C.

40 Tras el periodo de incubación, 50 μ l de solución de MTT (5 mg/ml en PBS) se añadieron a cada pocillo. La placa de 96 pocillos se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, y se centrifugó durante 5 minutos a 800xg. El sobrenadante se aspiró, 150 μ l de dimetilsulfóxido (DMSO) se añadieron a cada pocillo, y el aglomerado celular se volvió a suspender. La absorción se determinó a una longitud de onda de 540 nm y a una longitud de onda de referencia de 690 nm en un lector ELISA.

45 Tal como se muestra en la Figura 1, después de 24 horas, el anticuerpo monoclonal LM-1 inhibió la proliferación celular de la línea celular de carcinoma de pulmón LOU-NH91. En dichos estudios, las células LOU-NH91 se incubaron con el anticuerpo monoclonal LM-1, con sobrenadante agotado, o sin anticuerpo durante 24 horas. El eje y muestra la diferencia de absorbancia a 540 nm y 690 nm ($A_{540}-A_{690}$). Como se evidencia en dichas gráficas, la incubación con el anticuerpo monoclonal LM-1 dio como resultado una disminución en la proliferación celular y en la viabilidad celular tanto después de 24 horas como después de 48 h de período de incubación.

50 Resultados ilustrativos adicionales de estos estudios se representan en las Figuras 2A y 2B. Después de 24 o 48 horas, el anticuerpo monoclonal LM-1 inhibió la proliferación celular de la línea celular de carcinoma de células epidermoides humano EPLC-272H de una forma dependiente de la concentración, mientras que los controles con el sobrenadante de cultivo celular agotado permanecieron inalterados (Figura 2A y 2B).

Ejemplo 6

60 Este ejemplo incluye una descripción los estudios de apoptosis celular de un anticuerpo LM-1. Los siguientes estudios se realizaron usando los materiales y métodos del Ejemplo 1.

65 Se pueden utilizar numerosos ensayos convencionales en la técnica para determinar si un anticuerpo induce la apoptosis en una célula. Por ejemplo, los inventores utilizan el CELL DEATH DETECTION ELISA ^{PLUS} (Roche, Mannheim, Alemania) para analizar la extensión con la que el anticuerpo LM-1 induce la apoptosis. La detección de la muerte celular por ELISA se basa en un principio de sándwich-enzima-inmunoensayo cuantitativo que utiliza anticuerpos monoclonales de ratón dirigidos contra ADN e histonas, respectivamente. Este ensayo permite la determinación específica de mono y oligonucleosomas que se liberan en el citoplasma de las células que mueren

por apoptosis.

En particular, 1×10^4 células tumorales (LOU-NH91) se sembraron en placas de 96 pocillos y se incubaron en presencia de diferentes concentraciones del anticuerpo LM-1 contra IgM durante 24 horas a 37 °C y un 7 % CO₂ en una incubadora de CO₂. El sobrenadante del cultivo celular agotado con anticuerpos contra IgM no relacionados sirvió como control negativo.

Tras el periodo de incubación, las células se centrifugaron durante 10 minutos a 200xg y se eliminaron los sobrenadantes. Los aglomerados celulares resultantes se incubaron después con 200 µl de tampón de lisis durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación, 20 µl de los sobrenadantes se transfirieron a una placa de microvaloración (MTP) revestida con estreptavidina y 80 µl de inmunorreactivo (una mezcla de Anti-Histona-Biotina al 10 %, Anti-ADN peroxidasa al 10 % (Anti-ADN POD) y 80 % de tampón de incubación) se añadió antes de la incubación durante 2 horas a temperatura ambiente en un agitador MTP a 250 rpm. Tras el periodo de incubación, los componentes no unidos se eliminaron en una etapa de lavado con tampón de incubación. POD se determinó fotométricamente con ABTS™ como sustrato (1 comprimido de ABTS™ (2,2'-Azino-di[3-etil-enzotiazolin-sulfonato]) en 5 µl de tampón sustrato). La apoptosis inducida por el anticuerpo se midió determinando la intensidad de color del precipitado de color verde que se forma como resultado de su reacción usando un lector ELISA a una longitud de onda de 415 nm en comparación con solución de ABTS™ como blanco (longitud de onda de referencia de aproximadamente 490 nm). Basándose en esta intensidad de color, los inventores calcularon el nivel de apoptosis inducida por anticuerpos.

Estos estudios mostraron claramente que el anticuerpo LM-1 induce apoptosis en células de carcinoma LOU-NH91 después de 24 horas de incubación (Figuras 3 y 4A) y después de 48 horas de incubación (Figura 4B). El eje Y en estas figuras es la diferencia entre la absorbancia 415 nm y la longitud de onda de referencia a 490 nm ($A_{415} - A_{490}$) y el medio del control es medio RPMI 1460. La concentración del anticuerpo LM-1 fue bien 25 µl o 50 µl/ml en el sobrenadante.

Ejemplo 7

Este ejemplo incluye una descripción de la obtención de imágenes *in vivo* de neoplasias usando un anticuerpo LM-1.

Un paciente con sospecha de tener una neoplasia, como un carcinoma de pulmón, puede recibir una dosis de anticuerpo LM-1 radio yodado, u otro polipéptido específico de tumor, y anticuerpo inespecífico radiomarcado usando los métodos descritos en el presente documento. La localización del tumor mediante obtención de imágenes se puede realizar según el procedimiento de Goldenberg et al. (N. Engl. J. Med., 298:1384, 1978). Por I.V. se puede administrar a un paciente una infusión de volúmenes iguales de soluciones de anticuerpo ¹³¹I-LM-1 y anticuerpo inespecífico marcado con Tc-99m. Antes de la administración i.v. de los reactivos, el paciente se suele ensayar previamente para determinar la hipersensibilidad a la preparación de anticuerpo (no marcado) o a un anticuerpo del mismo tipo que la preparación de anticuerpos. Para bloquear la captación de ¹³¹I por el tiroides, se administró por vía oral una solución de Lugol, comenzando uno o más días antes de la inyección del anticuerpo radio yodado, a una dosis de 5 gotas dos o tres veces al día. Se pueden tomar imágenes de varias regiones corporales y vistas a 4, 8, y 24 horas después de la inyección de las preparaciones marcadas. Si está presente, la neoplasia, por ejemplo, un carcinoma colorrectal, se detecta por imágenes de la cámara gamma por resta del recuento de Tc-99m del de los ¹³¹I, como se describe para el anticuerpo dirigido contra CEA marcado con ¹³¹I y albúmina sérica humana marcada con Tc-99m en DeLand et al. (Cancer Res. 40:3046, 1980). A las 8 horas de la inyección, la imagen suele ser clara y mejora con el tiempo hasta el barrido de las 24 horas.

Ejemplo 8

Este ejemplo incluye una descripción del tratamiento de neoplasias mediante el uso del anticuerpo LM-1, tales como mezclas de anticuerpos marcados.

Un paciente con diagnóstico de neoplasia, por ejemplo, un carcinoma de pulmón, se puede tratar con los polipéptidos de la invención de la siguiente forma. Se puede administrar solución de Lugol, por ejemplo, 7 gotas 3 veces al día, al paciente. Posteriormente, se puede administrar una dosis terapéutica de anticuerpo ¹³¹I-LM-1 al paciente. Por ejemplo, se puede administrar una dosis de ¹³¹I de 50 mCi semanalmente durante 3 semanas, y a continuación repetidamente en intervalos ajustados individualmente, por ejemplo, cada tres meses, hasta que la toxicidad hematológica interrumpa el tratamiento. La pauta terapéutica exacta se determina de forma general por el médico a cargo del paciente o la persona que supervisa el tratamiento. Los anticuerpos radioyodados se pueden administrar en forma de infusiones i.v. lentas en 50 ml de solución salina fisiológica estéril. Después de la tercera dosis inyectada, se puede observar una reducción en el tamaño del tumor primario y la metástasis, especialmente después del segundo ciclo de terapia, o 10 semanas después de iniciar la terapia.

Ejemplo 9

Este ejemplo incluye una descripción del tratamiento de neoplasias mediante el uso de anticuerpos conjugados.

- 5 Un paciente con diagnóstico de neoplasia, por ejemplo, un paciente con carcinoma de pulmón que ha experimentado metástasis al tórax, se puede tratar con soluciones de ¹³¹I-LM-1, ¹⁰B-LM-1, y anticuerpo inespecífico marcado con Tc-99m. Se puede administrar al paciente una cantidad de anticuerpo LM-1 marcado con ¹³¹I (en 50 ml de solución salina fisiológica) suficiente para proporcionar 100 MCi de actividad ¹³¹I basado en un paciente de 70 kg de peso. Esta dosis es igual a 3,3 mg de un anticuerpo que tiene 40-80 átomos de boro y 8-16 átomos de boro 10 por molécula de anticuerpo. La neoplasia se ubica precisamente en primer lugar usando el procedimiento del Ejemplo 6. Además, se debe administrar una solución de Lugol de forma continua al paciente, como en el ejemplo anterior. Un haz de neutrones térmicos bien colimados se puede enfocar a continuación sobre las ubicaciones definidas de los tumores. La irradiación con un haz de neutrones externos a una dosis de 400-800 rads, suministrada en un periodo de 8-20 min, se realiza en cada sitio tumoral, y opcionalmente se repite con la 15 administración del anticuerpo para localizar el tumor, con o sin la radiomarca, en intervalos ajustados individualmente, pero que normalmente no superan una dosis total de 3200 rads salvo que esté indicada un tratamiento de irradiación externa simultánea. Si se desea, además de este tratamiento, también se puede administrar al paciente un agente antitumoral, tal como un agente quimioterapéutico.

20 Ejemplo 10

Este ejemplo incluye una descripción de la caracterización inmunohistoquímica adicional del anticuerpo LM-1.

- 25 El análisis inmunohistoquímico reveló que el anticuerpo LM-1 se une a las diferentes formas del cáncer. Por ejemplo, LM-1 se une a todos los grados y estadios del adenocarcinoma de pulmón analizado, y no se detectaron diferencias entre hombres y mujeres. En particular, el anticuerpo LM-1 se une al adenocarcinoma de pulmón en los estadios UICC de IA, IB, IIB, IIIA y IIIB (por ejemplo, pT1pNoG1, pT1G2, pT1pNxG2, pT1pNoG2, pT1pNoG3, pT2pNo, pT2pNoG1, pT2G2, pT2pNoG2, pT2pN1G2, pT2pNoG3, pT2pN1G1, pT2pN1G3, pT3pNxG3, pT3pN1G3, pT1pN2G2, pT2pN2G2, pT2pN2G3, pT1pN3G1 y pT4pNoG2) con un porcentaje elevado de células de cada etapa con tinción positiva para LM-1 (mayor del 40 %, 50 % o 60 %, normalmente de 90 % o superior).

- 35 LM-1 también se une a todos los grados y estadios del carcinoma escamoso de pulmón analizado, y no se detectaron diferencias entre hombres y mujeres. En particular, el anticuerpo LM-1 se une al carcinoma de pulmón de células escamosas a UICC estadios de IA, IIA, IB, IIB, IIIA, IIIB and IV (por ejemplo, pT1G2, pT1pNoG1, pT1pNoG2, pT1pNoMoG3, pT1pNoG3, pT1pN1G3, pT1pN2G3, pT2pNoG2, pT2pNxG2, pT2pN1G2, pT2G3, pT2pNoG3, pT2pN1G3, pT2pN2G2, pT2pN2G3, pT3pNoG2, pT3pN1G2, pT3pN2G3, pT4pN1G3, pT2pN0pM1G2 y pT3pN0pM1G2) con un porcentaje elevado de células de cada etapa con tinción positiva para LM-1 (mayor del 30 %, normalmente de 90 % o superior).

- 40 LM-1 se une además a todos los grados y estadios del adenocarcinoma de colon analizado, y no se detectaron diferencias entre hombres y mujeres. En particular, el anticuerpo LM-1 se une al adenocarcinoma de pulmón en los estadios UICC de IA, IIA, IIB, IIIA, IIIB y IIIC (por ejemplo, pT1pNoG1, pT1pNoG2, pT2pNo, pT2pNoG2, pT2pNoG3, pT3pNoG2, pT3pNoG3, pT4pNoG3, pT2pN1G2, pT4pN1G2, pT3pN1G2, pT3pN2G2, pT3pN1G3, pT3pN1G2, pT2pN2G2 and pT3pN2G2) con un elevado porcentaje de células de cada etapa de tinción dio un valor positivo para 45 LM-1 (mayor del 30 %, normalmente de 90 % o superior).

- LM-1 se une adicionalmente a todas las pendientes y etapas del adenocarcinoma de páncreas analizado, y no se detectaron diferencias entre hombres y mujeres. En particular, el anticuerpo LM-1 se une al adenocarcinoma de páncreas en los estadios UICC de IA, de en las etapas I, II, III, IVA y IVB (por ejemplo, pT1pNo, pT3pNoG2, 50 pT3pNoG3, pT2pN1G3, pT3pN1G2, pT3pN1G3, pT3pN1aG2, pT3pN1aG2-3, pT3pN1bG1, pT3pN1bG2, pT3pN1bG2-3, pT3pN1bG3, pT4pN1b, pT3pNopM1G2, pT4pN1bpM1G2 y pT4pN1bpM1G3), y sobre en tumores endocrinos, con un porcentaje elevado de células de cada etapa con tinción positiva para LM1 (mayor del 30 %, normalmente de 90 % o superior).

- 55 Por lo tanto, el antígeno LM-1 se expresa por tanto de forma ubicua en todos los grados y etapas del adenocarcinoma de pulmón, carcinomas de células escamosas de pulmón, adenocarcinoma de colon y adenocarcinoma de páncreas, tanto en hombres como en mujeres. Por lo tanto, el antígeno LM-1 es una diana, y los anticuerpos LM-1 y los fragmentos funcionales de los mismos y una terapia para tratar todos los estadios del adenocarcinoma de pulmón, carcinomas de células escamosas de pulmón, adenocarcinoma de colon y 60 adenocarcinoma de páncreas, tanto en hombres como en mujeres.

- El análisis inmunohistoquímico también reveló que el anticuerpo LM-1 se une a las diferentes formas metastásicas del cáncer. En particular, LM-1 se une a los ganglios linfáticos y a la metástasis cerebral que surge del adenocarcinoma de pulmón y del carcinoma de células escamosas de pulmón. LM-1 también se une a la metástasis 65 de ganglios linfáticos que surge del cáncer de mama invasivo ductal e invasivo lobular. LM-1 se une adicionalmente a la metástasis de hígado, metástasis de pulmón y metástasis de ganglios linfáticos que surgen del adenocarcinoma

de colon. LM-1 se une adicionalmente a la metástasis de ganglios linfáticos que surgen del adenocarcinoma de estómago (intestinal y difuso), que surge del adenocarcinoma de páncreas y que surge del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello. Por lo tanto, el antígeno LM-1 es una diana, y los anticuerpos LM-1 y los fragmentos funcionales de los mismos y una terapia para reducir o inhibir el establecimiento o la formación de tumores metastásicos, o el crecimiento de tumores metastásicos ya establecidos, que surgen de estos y otros cánceres, y que reducen el riesgo de recidiva o progresión a la formación o establecimiento de tumor metastásico, o crecimiento o la proliferación de metástasis establecidas o formadas.

El análisis inmunohistoquímico también reveló que el anticuerpo LM-1 no se une de forma detectable a diferentes tejidos sanos no cancerosos. En particular, LM-1 no se une de forma detectable al estómago (glandular), colon (epitelial), pulmón (glandular o alveolar), esófago (epitelial), páncreas (glandular), hígado (glandular), riñón (epitelial), próstata (glandular), testículos (germinal), mama (glandular), útero (epitelial), ovario (glandular), intestino delgado (epitelial), vejiga (epitelial), o glándulas suprarrenales (endocrino). LM-1 tampoco se une de forma detectable al cerebelo, corteza cerebral, endotelio, retina, trompa de Falopio, corazón, riñón, ganglios linfáticos, páncreas, tiroides), paratiroidea, pituitaria, placenta, piel, bazo, músculo o timo.

Ejemplo 11

Este ejemplo incluye una descripción de los estudios de perfilación de carbohidratos (N-glicano) presente en el LM-1, representado mediante un anticuerpo producido mediante un hibridoma depositado con el número de referencia DSMZ DSM ACC2623, depositado el 6 de noviembre de 2003, o como se representa mediante un anticuerpo que tiene las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera definidas como SEQ ID NO:1, 3, 5 o 7, y 11.

En resumen, LM-1 obtenido de hibridomas de ser humano/ratón se evaluaron para determinar la presencia de estructuras de glicano normalmente no humanas. Las estructuras de glicano de mamíferos humanos y no humanos se pueden distinguir según los glicanos sialilados: Los glicanos sialilados de origen humano contienen solamente Neu5Ac como ácido siálico, mientras que los roedores y la mayoría del resto de mamíferos también integran Neu5Gc en el interior de estructuras sialiladas.

El análisis por EM MALDI-TOF de los N-glicanos permetilados liberados se utilizó para determinar las estructuras que están presentes en los anticuerpos. La sustitución de un resto Neu5Ac por uno Neu5Gc en un glicano permetilado introduce un desplazamiento másico de 30 Da. Para el análisis por MALDI-TOF de los glicanos permetilados, 1,4 mg de LM-1 se digirieron con PNGasa F y liberaron glicanos purificados. Tras la permetilación, los glicanos se analizaron mediante EM MALDI-TOF.

El espectro MALDI-TOF de LM-1 se muestra en la Figura 5A. Man5GlcNAc2 to Man8GlcNAc2 representa el tipo de glicanos con alto contenido de manosa. Las otras estructuras corresponden a:

NeuAc1G1: NeuAc1Gal1GlcNAc1Man5GlcNAc2
 NeuGc1G1: NeuGc1Gal1GlcNAc1Man5GlcNAc2
 NeuAc1G2: NeuAc1Gal2GlcNAc2Man3GlcNAc2
 NeuGc1G2: NeuGc1Gal2GlcNAc2Man3GlcNAc2
 NeuAc1G3: NeuAc1Gal3GlcNAc2Man3GlcNAc2
 NeuGc1G3: NeuGc1Gal3GlcNAc2Man3GlcNAc2
 NeuAc2G3: NeuAc2Gal3GlcNAc2Man3GlcNAc2
 NeuAc1NeuGc1G3: NeuAc1NeuGc1Gal3GlcNAc2Man3GlcNAc2
 NeuGc2G3: NeuGc2Gal3GlcNAc2Man3GlcNAc2
 NeuAc2G4: NeuAc2Gal4GlcNAc3Man3GlcNAc2
 NeuAc1NeuGc1G4: NeuAc1NeuGc1Gal4GlcNAc3Man3GlcNAc2
 NeuGc2G4: NeuGc2Gal4GlcNAc3Man3GlcNAc2

Solo las estructuras de glicano más predominantes se indican en la Figura 5A. Todas las estructuras de glicano identificadas se relacionan en la TABLA 5:

Estructura del glicano	m/z	LM-1
Arnold et al.		
Man5GlcNAc2	1580,5	+++
5,6%		
Man6GlcNAc2	1784,5	++++
9,5%		
Man7GlcNAc2	1989,5	+++
3,2%		
Man8GlcNAc2	2193,5	+++
4,1%		
Man9GlcNAc2	396,6	+
1%		
GlcNAc1Man3GlcNAc2	1417,5	+
0,9%		
GlcNAc1Man4GlcNAc2	1621,5	+
-		
GlcNAc1Man6GlcNAc2	2029,5	+
-		
GlcNAc1Man7GlcNAc2	2233,5	+
Gal1GlcNAc2Man3GlcNAc2	1621,5	+
1,1%		
Gal1GlcNAc2Man4GlcNAc2	1825,6	+
0,7%		
Gal2GlcNAc2Man3GlcNAc2	2070,5	+
-		
Man4GlcNAc2Fuc1	1550,4	+
-		
Man6GlcNAc2Fuc1	1995,5	+
-		
GlcNAc1Man3GlcNAc2Fuc1	1591,5	+
-		
GlcNAc2Man3GlcNAc2Fuc1 (G0F)	1836,6	+
0,2%		
Gal1GlcNAc1Man3GlcNAc2Fuc1	1795,5	+
-		
Gal1GlcNAc2Man3GlcNAc2Fuc1 (G1F)	2040,5	+
0,4%		
Gal2GlcNAc2Man3GlcNAc2Fuc1 (G2F)	2245,6	+
1,1%		
Gal3GlcNAc3Man3GlcNAc2Fuc1	2695,6	+
-		
Gal4GlcNAc3Man3GlcNAc2Fuc2	3072,6	+
-		
NeuAc1Gal2GlcNAc1Man3GlcNAc2	2186,5	++
1,9%		
NeuGc1Gal2GlcNAc1Man3GlcNAc2	2217,5	++
NeuAc1Gal1GlcNAc1Man5GlcNAc2	2391,6	++

NeuGc1Gal1GlcNAc1Man5GlcNAc2	2421,6	++
NeuAc1Gal2GlcNAc2Man3GlcNAc2	2432,7	+++
1,7%		
NeuGc1Gal2GlcNAc2Man3GlcNAc2	2462,7	++
NeuAc1Gal3GlcNAc2Man3GlcNAc2	2636,6	++++
-		
NeuGc1Gal3GlcNAc2Man3GlcNAc2	2696,6	+++
NeuAc1Gal4GlcNAc2Man3GlcNAc2	2840,6	++
-		
NeuGc1Gal4GlcNAc2Man3GlcNAc2	2870,6	++
NeuAc2Gal3GlcNAc2Man3GlcNAc2	2997,6	+++
-		
NeuAc1NeuGc1Gal3GlcNAc2Man3GlcNAc2	3027,6	++++
NeuGc2Gal13GlcNAc2Man3GlcNAc2	3057,6	+++
NeuAc2Gal4GlcNAc3Man3GlcNAc2	3243,7	++
-		
NeuAc1NeuGc1Gal4GlcNAc3Man3GlcNAc2	3273,7	+++
NeuGc2Gal4GlcNAc3Man3GlcNAc2	3303,7	++
NeuAc2Gal4GlcNAc3Man3GlcNAc2	3447,7	++
-		
NeuAc1NeuGc1Gal4GlcNAc3Man3GlcNAc2	3477,7	++
NeuGc2Gal4GlcNAc3Man3GlcNAc2	3507,7	+
NeuAc2Gal2GlcNAc2Man3GlcNAc2Fuc1	2967,6	++
2,6%		
NeuAc1NeuGc1Gal2GlcNAc2Man3GlcNAc2Fuc1	2997,6	+++
NeuGc2Gal2GlcNAc2Man3GlcNAc2Fuc1	3027,6	+++
++++) >5% ; +++)) 2-5% ; ++)) 1-2% ; + <1%		

5 El análisis detallado de los N-glicanos de LM-1 se comparó con los datos publicados en Arnold et al. (J.Biol.Chem. 280:29080 (2005)). El glicoperfilado del anticuerpo LM-1 muestra un motivo de glicanos complejo. Existe un contenido significativo de las estructuras con alto contenido de manosa (Man5 a Man9) y también una cantidad significativa de glicanos sialilados. Los glicanos galactosilados y fucosilados (por ejemplo, G1, G2, G0F, G1F y G2F) constituyen solamente una fracción minoritaria de los glicanos. La composición de glicanos del LM-1 es comparable a los datos publicados por Arnold et al. sobre la glicosilación de la IgM del suero humano. Sin embargo, existen diferencias en las glicofomas.

10 El análisis por EM MALDI-TOF MS (Figura 5A) demuestra la presencia tanto de NeuAc como de NeuGc sobre los diferentes N-glicanos sialilados. Para cada uno de los glicanos sialilados, las isoformas con NeuAc, NeuGc o ambos ácidos siálicos están presentes.

15 Ejemplo 12

Este ejemplo incluye datos que aparentemente muestran la unión de LM-1 a un antígeno de carbohidrato diana. Este ejemplo también incluye una descripción de los estudios de unión con el anticuerpo LM-1 contra una biblioteca de carbohidratos, y antígenos del grupo sanguíneo.

20 El anticuerpo LM-1 se une a numerosas células tumorales diferentes, tales como una o más de un línea celular de adenocarcinoma de pulmón Colo-699 (número de registro DSMZ ACC 196), línea celular de adenocarcinoma de pulmón DV-90 (número de registro DSMZ ACC 307), línea celular de carcinoma epidermoide de pulmón EPLC-272H (número de registro DSMZ ACC 383), y una línea celular de carcinoma escamocelular de pulmón LOU-NH91 (número de registro DSMZ ACC 393). Las células tumorales se trataron con N-glicosidasa y después se analizó la unión de LM-1 a las células, tal como se describe en el Ejemplo 1.

25 Aunque los datos indican que la unión de LM-1 a las células tratadas con N-glicosidasa fue significativamente reducida, lo que sugiere una implicación de un resto carbohidrato en el epitopo al que se une LM-1, los datos

posteriores descritos en el Ejemplo 16 indican que LM-1 se une a un antígeno expresado bacterianamente, lo que significa que los carbohidratos no son necesarios para la unión de LM-1 al antígeno.

5 Un panel de carbohidratos se cribó para determinar su unión al anticuerpo LM-1. En particular, el panel incluía mono, di, tri, tetra y oligosacáridos conjugados a un separador de poliacrilamida. Los carbohidratos, número de sacáridos en los carbohidratos y tipo de espaciador se relacionan en la TABLA 6.

Tabla 6: Conjugados de carbohidratos

Separadores: 1 = carbohidrato-HOCH ₂ CH ₂ CH ₂ NH ₂ -; 2 = carbohidrato-HOCH ₂ CH ₂ NH-; 3 = carbohidrato-NHCOCH ₂ NH-; y 4 = carbohidrato-O(CH ₂) ₃ NHCO(CH ₂) ₅ NH-				
número	estructura del carbohidrato	nombre abreviado	número de sacáridos	separador
0	HOCH ₂ (HOCH) ₄ CH ₂ NH-	aminoglucitol		
1	GalNacβ1-4GlcNAcβ	Lac-di-Nac	di	1
2	GlcNAcβ1-3Galβ-	GlcNacp3Gal	di	2
3	GlcNAcβ1-6(GlcNAcβ1-3)Galβ1-	Tk	tetra	2
4	GalNacβ1-4Galβ1-4Glcβ,	GA1	tri	1
5	GalNacα1-3(Fucal-2)Galβ1-4GlcNAcβ-	A tipo 2	tetra	1
6	Galα1-3(Fuca1-2)Galβ1-4GlcNAcβ-	B tipo 2	tetra	1
7	Galα1-3Galβ1-4Glcβ,	Galα1-3'Lac	tri	2
8	GlcNAcβ1-2Galβ1-3GalNacα,	GlcNAcβ1-2'TF	tri	1
9	Galα1-4GlcNAcβ.	Galα4GlcNAcβ-	di	1
10	Neu5Acβ-	(ácido β-N-acetilneuramínico	mono	3
11	Glcα1-4Glcβ-	maltosa	di	1
12	Glcα-	α-D-glucosa	mono	1
13	Glcβ-	β-D-glucosa	mono	1
14	Galα-	α-D-galactosa	mono	1
15	Galβ-	β-D-galactosa	mono	1
16	Manα-	α-D-manosa	mono	1
17	6-H ₂ PO ₃ Manα-	α-D-manosa-6-	mono	1
18	Fuca-	α-L-fucosa	mono	1
19	β-D-GLcNAc-	β-N-acetil-D-glucamina	mono	1
20	α-D-GalNAc-	α-N-acetil-D-	mono	1
21	β-D-GalNAc-	(β-N-acetil-D-	mono	1
22	Manα1-3(Manα1-6)Manα-	Man3	tri	1
23	3-O-su-Galβ-	β-D-galactosa-3-sulfato	mono	1
24	Neu5Acα-	ácido α-N-acetilneuramínico	mono	3
25	Neu5Acα2/3Galα1/4GlcNAcβ,	3'SLN	tri	1
26	Galα1-4Galβ1-4Glcβ,	P _k ,Gb3	tri	2
27	Galα1-3GalNacβ-	Tαβ	di	1
28	Galβ1-3Galβ-	Galβ3Gal	di	1
29	Galβ1-3(Fuca1-4)GlcNAcβ-	Le ^a	tri	1
30	Fuca1-2Galβ1-3(Fuca1-4)GlcNAcβ-	Le ^b	tetra	1
31	Fuca1-2Galβ1-3GlcNAcβ-	Le ^d , H tipo 1	tri	1
32	Galβ1-3GlcNAcβ-	Le ^c	di	1
33	Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ-	Le ^x	tri	1
34	Fuca1-2Galβ1-4(Fuca1- 3)GlcNAcβ-	Le ^y	tetra	1
35	Galp1-4Glcβ-	Lac	di	1

ES 2 595 362 T3

36	Galβ1-4GlcNAcβ-	LacNAc	di	1
37	Galβ1-3GalNaca.	TF	di	1
38	Fuca1-3GlcNAcβ.	Fuca3GlcNAc	di	1
39	Fuca1-4GlcNAcβ-	Fuca4GlcNAc, Le	di	1
40	GalNaca1-3GalNacβ-	Fs-2	di	1
41	GalNaca1-3GalNaca-	núcleo 5	di	1
42	Galα1-3GalNaca.	Taa	di	1
43	Neu5Aca2-3Galβ1-3GlcNAcβ,	3'-SiaLe ^c	tri	1
44	Galα1-2Galβ.	Galα2Gal	di	1
45	Galβ1-3GalNacβ-	Tpp	di	1
46	GlcNAcβ1-4GlcNAcp-	(GlcNAc) ₂	di	1
47	Neu5Aca12-6GalNaca.	sTn	di	1
48	Fuca1-2Galβ1-3GalNaca,	H tipo 3	tri	1
49	Neu5Aca2-3Galβ1-4Glcβ,	3'-SL	tri	3
50	Neu5Aca2-3Galβ1-3(Fuca1-4)GlcNAcβ-	sLe ^a	tetra	1
51	Neu5Aca2-3Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ-	sLe ^x	tetra	1
52	Neu5Aca2-6Galβ1-4Glcβ,	6'-SL	tri	3
53	6-O-su-GlcNAcβ-	β-N-acetil-D-glucosamina-	mono	1
54	O-su-3Galβ1-3(Fuca1-4)GlcNAcβ-	3'-O-su-Le ^a	tri	1
55	O-su-3Galβ1-4(Fuca1-3)GlcNAcβ-	3'-O-su-Le ^x	tri	1
56	3'-O-su-LacNAcp-	3'-su-LacNAc	di	1
57	3'-O-su-Galβ1-3GLcNAcp-	3'-su-Le ^c	di	4
58	Galα1-6Glcβ-	melobiosa	di	1
59	Galα1-3Galβ1-4GlcNAcβ-	Galα1-3'LacNAc	tri	1
60	GlcNaca1-3Galβ1-3GalNaca,	GlcNaca1-3'TF	tri	1
61	Neu5Aca2-8Neu5Aca2	(Sia) ₂	di	1
62	Neu5Aca2-8Neu5Aca2-8Neu5Aca2	(Sia) ₃	tri	1
63	GlcNAcβ1-3Galβ1-3GalNaca	GlcNAcβ1-3'TF	tri	1
64	Galβ1-2Galβ.	Gal2pGal	di	1
65	Galβ1-4(6-0-su)GlcNAcβ-	6-0-su-LacNAc	di	1
66	Galβ1-3(GlcNAcβ1-6)GalNaca-	núcleo 2	tri	1
67	Fuca1-2Galβ1-3GalNacβ-	H tipo 4	tri	1
68	Galβ13GlcNAcβ1+3Galβ1+4GlcNAcβ-	LNT	tetra	2
69	Galβ1-4GlcNAcβ1-3Galβ1+4GlcNAcβ-	LNnT	tetra	2
70	Neu5Aca2-3Galβ-	GM4	di	1
71	Neu5Aca2-6Galβ-	Neu5Ac6Gal	di	1
72	GalNaca1-3(Fuca1-2)Galβ-	Atri	tri	4
73	Galα1-3(Fuca1-2)Galβ-	Btri	tri	1
74	GalNaca1-3Galβ-	Adi	di	1
75	Galα1-3Galβ-	Bdi	di	1
76	Fuca1-2Galβ1-4GlcNAcβ-	H tipo 2	tri	1
77	6'-su-LacNAcp-	6'-0-su-LacNAc	di	1
78	Fuca1-2Galβ-	Hdi	di	1
79	3'-0-su-Galβ1-3GalNaca-	3'-0-su-TF	di	1
80	GlcNAcβ1-3Galβ1-4GlcNAcβ,	GlcNAcβ1-3'LacNAc	tri	2
81	GalNacβ1-3GalNacβ.	di-GalNacβ	di	1
82	Neu5Aca2-3Galβ1-3GalNaca,	3'-SiaTF	tri	1
83	GlcNAcβ1-3GalNaca-	núcleo 3	di	1

84	GlcNAc β 1-6GalNac α -	núcleo 6	di	1
85	GlcNAc β 1-3(GlcNAc β 1-6) GalNac α -	núcleo 4	tri	1
86	Neu5Aca2-6Neu5Aca2-3Gal β 1-	Sia2TF	tetra	1
88	Neu5Aca2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-6(Neu5Aca2-6Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-3)Manp1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β -	YDS	oligo	3
89	Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-6(Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-6)Manp1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β -	9-0S	oligo	3
90	GlcNAc β 1-2Man α 1-6(GlcNAc β 1-2Man α 1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β -	7-0S	oligo	3
91	Neu5Aca2-3(Neu5Aca2-6)GalNac α -	3,6-SiaTn	tri	1
93	Neu5Aca2-3 Gal β 1-4GlcNAc β -	6'-SLN	tri	1

El cribado se realizó mediante ELISA. En resumen, los conjugados de carbohidratos se inmovilizaron en una placa de microvaloración de 96 pocillos, bloqueada con albúmina de suero bovino al 2 % e incubada en una primera etapa con el anticuerpo primario. La detección se realizó incubando el anticuerpo secundario de conejo dirigido contra IgM humana marcado con POD (Dianova, código 309-035-095), revelado con sustrato de peroxidasa para micropocillos TMB (tebu-bio, código TMB-500) durante 15 minutos, y medición de la DO a 450 nm y de nuevo 630 nm como longitud de onda de referencia. Cada sonda se investigó por duplicado.

Los primeros estudios se realizaron contra un panel de 6 conjugados para encontrar las diluciones del anticuerpo individual para el ensayo, porque las señales positivas deberán estar en el intervalo de OD de 0,5 a 1,0. Además, se realizaron dos tipos de estudios de control para demostrar la especificidad para el carbohidrato de las señales obtenidas y excluir artefactos inespecíficos: (i) el uso del conjugado de aminoglucitol (número 0) como antígeno químicamente comparable, pero que no es un carbohidrato, y (ii) una preincubación del conjugado de carbohidrato con peryodato de acuerdo con Woodward (Woodward et al., J.Immunol.Meth 78:143 (1985)), que altera la estructura del carbohidrato. Una disminución en la intensidad de la señal detecta, por tanto, una especificidad de la unión entre el anticuerpo y el carbohidrato.

Adicionalmente, un anticuerpo dirigido contra IgM humana que no se une a carbohidratos se investigó contra un panel de 6 conjugados como control negativo. Los estudios incluyeron controles en blanco para cada conjugado en cada placa de microvaloración individual. Los blancos representan pocillos sin incubación con el anticuerpo primario.

El cribado se realizó para una sola concentración, 0,5 μ g/ml de LM-1, 2 μ g/ml de control negativo hlgM, y una dilución 1:20 del anticuerpo del control Nemo-TF2 que representa una concentración inferior a 0,1 μ g/ml. El anticuerpo NM-TF2 se sometió a ensayo contra el conjugado Gal β 1-3GalNac α (Tabla 6, número 37) que este anticuerpo reconoce positivamente. La intensidad de la señal se midió siempre a una OD mayor de 4.

La intensidad de la señal de las sondas en blanco siempre se midió a OD<0,020. Las Figuras 5B-5F muestran los resultados del cribado del anticuerpo LM-1 y se ilustran con respecto a la unión a conjugados de mono (Figura 5B), di (Figura 5C), tri (Figura 5D), tetra (Figura 5E) y oligosacárido (Figura 5F), como se indica en la Tabla 6. Las barras de control están ordenadas, el blanco, el conjugado con el no carbohidrato (Tabla 6, número "0"), y el control positivo Nemo-TF2.

El cribado reveló una baja intensidad de la señal a pesar de las elevadas concentraciones de anticuerpo en comparación con el anticuerpo de control positivo Nemo-TF2. Además, se midió una unión relativamente elevada para el control sin carbohidrato (0), lo que no fue el caso para el Nemo-TF2. Sin embargo, la unión a los conjugados de carbohidratos cargados pareció potenciarse, en comparación con los conjugados de carbohidrato sin cambiar. Sin embargo, de nuevo, los datos del Ejemplo 16 indican que los carbohidratos no son necesarios para la unión de LM-1 al antígeno.

Para comprobar la especificidad de las señales, así como para discriminar de un fondo elevado, se realizaron tres estudios adicionales. El conjugado 60suLacNAc (Tabla 6, número 77) se seleccionó para estos estudios porque la intensidad de la señal contra este conjugado quedó potenciada. El anticuerpo de control positivo Nemo-TF2 se investigó adicionalmente contra el conjugado Gal β 1-3GalNac α (Tabla 6, número 37):

- (i) Unión del anticuerpo en una serie de diferentes concentraciones contra el conjugado 60suLacNAc (Tabla 6, número 77), partiendo de una concentración donde todo el antígeno recubierto está unido (concentración de

saturación). La medición de la unión dependiente de la concentración se inició con concentraciones de anticuerpo que dan como resultado una unión máxima en las condiciones de ELISA usadas. LM-1 1 (20 µg/ml) se usó para la unión con el conjugado 60suLacNAc. La concentración de partida de Nemod-TF2 fue <0,1 µg/ml (unión al conjugado número 37, Tabla 6). Una relación lineal entre la DO y la concentración indica una adsorción no específica que significa que no hay una unión específica a dicho carbohidrato.

(ii) Comparación de la unión del anticuerpo a 60suLacNAc (Tabla 6, número 77) y al conjugado sin carbohidrato (Tabla 6, número 0) a cuatro concentraciones (etapas de dilución 1:2). La unión dependiente de la concentración se investigó en un intervalo de concentraciones más pequeño contra el conjugado 60suLacNAc (Tabla 6, número 77) y de nuevo con el conjugado sin carbohidrato (Tabla 6, número 0). La medición no se llevó a cabo con el anticuerpo del control Nemod-TF2, porque el anticuerpo no se une al conjugado sin carbohidrato. Una comparación de la unión entre el conjugado con carbohidrato y sin carbohidrato, puede indicar en cierta medida un reconocimiento de carbohidrato específico.

(iii) Unión a 60suLacNAc (Tabla 6, número 77) y al conjugado sin carbohidrato (Tabla 6, número 0) con o sin incubación con peryodato. Una oxidación con peryodato suave a pH ácido escinde los grupos hidroxilo vecinos del carbohidrato (Woodward et al., J.Immunol.Meth 78:143 (1985), y es por tanto una herramienta para comprobar la especificidad de la unión del anticuerpo mediada por carbohidrato. La preincubación del antígeno del carbohidrato con peryodato disminuiría la intensidad de la señal de la unión al anticuerpo. La unión del anticuerpo LM-1 no fue sensible al peryodato, en comparación con el anticuerpo del control Nemod-TF2, para el que se midió una disminución de la señal. Además, se midió no solamente una mayor unión a los pocillos recubiertos de carbohidrato, sino también a los pocillos no recubiertos de carbohidrato, lo que respalda la interpretación de una elevada unión de fondo, posiblemente mediada por contaminante(s) dentro de las muestras.

Los datos indican ausencia de unión específica a ninguno de los azúcares. Por lo tanto, parece improbable que los carbohidratos analizados reflejen la diana, y que una parte proteica pueda ser parte del epítipo.

Para el análisis de los antígenos del grupo sanguíneo, el anticuerpo LM-1 se ensayó para su unión a los grupos sanguíneos A1, A2, B y O mediante un ensayo de hemaglutinación convencional. La hemaglutinación implica glóbulos rojos (RBC) y se puede utilizar para identificar los antígenos de la superficie del RBC (con anticuerpos conocidos) o para cribar anticuerpos (con RBC con antígenos de la superficie conocidos). Los resultados indican que el LM-1 no se unió de forma detectable a los antígenos de los grupos sanguíneos A1, A2, B y O.

Para el análisis de la unión del anticuerpo LM-1 a los linfocitos y granulocitos. En resumen, se recogió sangre venosa de un voluntario y se preparó un gradiente de Ficoll para separar los componentes de la sangre. Ficoll forma parte del Ficoll-Paque que se utiliza para separar la sangre en sus componentes (por ejemplo, eritrocitos, leucocitos etc.). Ficoll-Paque se coloca en la parte inferior de una columna, y la sangre se extiende lentamente por encima de Ficoll-Paque. Tras la centrifugación, las siguientes capas se observan en la columna, de arriba abajo: plasma y otros constituyentes, células mononucleares (PBMC/MNC, por ejemplo, linfocitos), Ficoll-Paque, y eritrocitos y granulocitos que deberán estar presentes en forma aglomerada. Tras la separación en gradiente de Ficoll, las diferentes poblaciones celulares (linfocitos, granulocitos) se lavaron y se utilizaron para análisis FACS. Las células (2×10^5) se incubaron posteriormente sobre hielo con el anticuerpo LM-1 en una concentración final de 100 µg/ml o con el anticuerpo de control del isotipo correspondiente (IgM humana Chrompure, Dianova, Hamburgo, Alemania) a la misma concentración durante 15 minutos sobre hielo, se lavó con PBS que contiene azida sódica al 0,01 %, y a continuación se incubó con un anticuerpo de conejo dirigido contra IgM humana marcada con FITC (1:50, Dianova) durante 15 minutos sobre hielo. Los anticuerpos se diluyeron óptimamente en PBS que contenía azida sódica al 0,01 % y las células se analizaron mediante citometría de flujo (FACScan; Becton Dickinson, EE.UU.). Los resultados indican que el LM-1 no se une de forma detectable a los linfocitos o granulocitos.

Ejemplo 13

Este ejemplo incluye una descripción de los estudios que demuestran que los fragmentos del anticuerpo LM-1 retienen la actividad inhibitoria de la proliferación celular.

anticuerpo de LM-1, representado mediante un anticuerpo producido mediante un hibridoma depositado con el número de referencia DSMZ DSM ACC2623, depositado el 6 de noviembre de 2003, o como se representa mediante un anticuerpo que tiene las secuencias de la región variable de la cadena pesada y ligera definidas como SEQ ID NO:1, 3, 5, o 7 y 11 se sometió a intercambio con tampón con citrato sódico 100 mM (pH 3,5) usando columnas NAPtm-10 (Amersham Pharmacia Biotech) antes de la digestión con pepsina. Para cada miligramo de anticuerpo, se añadieron 5 µg de pepsina (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Alemania), seguido de incubación durante 10-15 min en un baño de agua a 37° C. La reacción finalizó por adición de 1/10 volumen de Tris 3,0 M (pH 8,8) seguido por centrifugación a 10.000 g durante 30 min. La digestión con pepsina también se realizó con un anticuerpo de control de IgM humana no relacionada (Chrompure IgM, Dianova, Hamburgo, Alemania). Antes de los estudios de apoptosis, el fragmento F_v y el fragmento del control humano IgM se dializaron contra PBS. La electroforesis en gel SDS y la transferencia Western confirmaron la escisión de ambos anticuerpos mediante pepsina. El ensayo de

proliferación de células MTT descrito en el Ejemplo 4 se usó para estudiar el efecto sobre la proliferación de células BXPC-3 y MKN-45.

5 Los datos indican que el fragmento Fv de LM-1 inhibe la proliferación celular de las células BXPC-3 y MKN-45. Los anteriores resultados indican que los fragmentos del anticuerpo LM-1 retienen la capacidad de inhibir o reducir la proliferación celular.

Ejemplo 14

10 Este ejemplo incluye una descripción de los estudios *in vivo* del anticuerpo LM-1. Los datos indican que el anticuerpo LM-1 es eficaz y puede reducir el tamaño de varios tumores, incluyendo carcinoma de colon, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, un tumor resistente a quimioterapia, así como metástasis tumoral.

15 Las células del carcinoma de colon humano HT-29 se consideran un modelo de la metástasis en seres humanos. Este carcinoma de colon metastatiza al hígado en ratones.

20 En resumen, células HT-29 (1×10^6) se inyectaron intraportalmente en tres grupos de ratones atímicos (ratones Balb/c nu/nu de 10 semanas de edad, Charles River GmbH, Sulzfeld, Alemania). En los días 7, 9, 11, 13 y 15 tras la inoculación, los ratones recibieron 260 µg de PAT-LM1 (~10,4 mg/kg, Grupo 1) y 260 µg de IgM no específica (Grupo 2) en días alternos. Los animales de control adicionales (Grupo 3) no recibieron ningún tratamiento (sin inyección). Se determinó para cada grupo el número de animales con lesiones tumorales macroscópicas o microscópicas en el hígado en el día 60.

25 El peso corporal de los ratones que recibieron LM-1 se mantuvo durante las 8 semanas después de la inyección de células LM-1. Por el contrario, el peso corporal de los ratones del control sin inyección y los ratones del control que recibieron IgM disminuyó en al menos un 20 % durante los 60 días del periodo de observación, por mala salud derivada de la metástasis hepática (Figura 6).

30 Se produjeron múltiples lesiones macroscópicas o microscópicas en el hígado de aproximadamente un 80 % de los ratones del control sin inyección, y en aproximadamente un 70 % de los ratones del control que recibieron el IgM no específico. Por el contrario, solamente aproximadamente un 20 % de los ratones que recibieron LM-1 tuvieron lesiones tumorales macroscópicas o microscópicas en el hígado (Figura 7). Los resultados anteriores indican, por tanto, que el anticuerpo LM1 puede reducir el establecimiento, formación o proliferación (crecimiento) de células metastásicas en una metástasis tumoral.

35 Los resultados anteriores indican que el anticuerpo LM1 reduce el número de metástasis hepáticas. El tratamiento con el anticuerpo LM-1 conserva el peso corporal inicial de los animales tras la inyección de células tumorales, lo que puede indicar una actividad antitumoral sistémica del LM-1.

40 A-549 es una línea celular que forma carcinoma de pulmón en animales, y por tanto se puede utilizar como modelo animal del carcinoma de pulmón humano (por ejemplo, carcinoma de pulmón no microcítico, NSCLC). Células de carcinoma de pulmón A-549 ($2,0 \times 10^6$) se inyectaron s.c. en el día 0 a ratones (C.B-17/IcrHanHsd-scid, de una edad de 6-8 semanas, n=10 por grupo). El anticuerpo LM-1 (200 µg) o el mAb de control (IgM humana Chrompure), o control de vehículo (NaCl) se administraron i.p. en los días 1, 3, 5, 7 y 9 a los ratones. Los ratones se sacrificaron en el día 17 y se determinaron los pesos y volúmenes tumorales.

45 El tamaño del tumor promedio en los ratones que recibieron el anticuerpo LM-1 fue significativamente inferior al de los ratones que recibieron el mAb de control. La reducción en el tamaño del tumor de los ratones que recibieron el anticuerpo LM-1 fue del 71 %, en comparación con los ratones que recibieron el mAb de control.

50 El análisis histológico reveló que en los ratones tratados con LM-1, las lesiones tumorales mostraban evidencia de apoptosis de células tumorales e inhibición y regresión del crecimiento tumoral. En los ratones tratados con LM-1, las lesiones tumorales también mostraron evidencia de necrosis.

55 BXPC-3 es una línea celular que forma cáncer pancreático en animales, y por tanto se puede utilizar como modelo animal del cáncer de páncreas humano. Células BXPC-3 ($2,0 \times 10^6$) se administraron s.c. en el día 0 a ratones (C.B-17/IcrHanHsd-scid, de una edad de 6-8 semanas, n=10 por grupo). El anticuerpo LM-1 (200 µg) o el mAb de control (IgM humana Chrompure) se administró i.p. en días alternos una vez que el tumor quedó establecido (palpable) en el día 8 (5 dosis) y en la semana 4 (4 dosis). Los ratones se sacrificaron en el día 24 y se determinaron los volúmenes tumorales.

60 El tamaño del tumor pancreático establecido en los ratones que recibieron el anticuerpo LM-1 fue significativamente inferior al de los ratones que recibieron el mAb de control. La reducción en el tamaño del tumor de los ratones que recibieron el anticuerpo LM-1 fue del 44 %, en comparación con los ratones que recibieron el mAb de control.

65

Para determinar la actividad de LM-1 en un modelo tumoral establecido, el carcinoma mucoso de células A-549 en ratones se sometió a tratamiento con el anticuerpo LM-1. Células de carcinoma de pulmón A-549 ($2,0 \times 10^6$) se administraron s.c. en el día 0 a ratones (ratones lampiños NMRI, de una edad de 6-8 semanas, n=10 por grupo). Anticuerpo LM-1 (1 mg/kg, 3 mg/kg, 9 mg/kg, o 27 mg/kg) o suero salino de control o mAb IgM (IgM humana Chrompure), 675 μ g se administró i.p. en días alternos seis veces a ratones con tumores establecidos (14 días después de la administración de células de carcinoma de pulmón) cada segundo días después de que el tumor se estableciera (palpable, $\sim 7 \text{ mm}^2$). En el día 14, el volumen tumoral promedio fue aproximadamente de 200 mm^3 . Los ratones se sacrificaron en el día 27 y se determinaron los volúmenes tumorales.

La reducción en el volumen de los tumores establecidos fue dependiente de la dosis, con una mayor reducción en el volumen tumoral observado a una dosis de 27 mg/kg. El volumen tumoral parece estabilizarse a las dosis de 1 y 3 mg/kg. A la dosis de 9 mg/kg, no se produjo una reducción aparente en el volumen tumoral.

Los resultados anteriores indican que el anticuerpo LM1 puede reducir el tamaño de diferentes tipos de tumor, incluyendo carcinoma de colon, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, un tumor resistente a quimioterapia, así como el establecimiento, formación y proliferación (crecimiento) de metástasis de células tumorales. Los resultados anteriores también indican que el anticuerpo LM1 puede reducir el número, y tamaño de tumores o metástasis, o estabilizar el número o el tamaño de diferentes tumores establecidos.

20 Ejemplo 15

Este ejemplo incluye una descripción de la identificación y verificación de la diana LM-1. Los datos indican que el anticuerpo LM-1 puede unirse aparentemente a una proteína que se une a un octámero que contiene un dominio no pou (NONO), también conocido como una proteína de unión de 54 kDa al ARN y ADN nuclear (p54nrb) y a la proteínas nuclear de 55 kDa (nmt55).

En resumen, una preparación de membrana de células BxPC3 se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida 2D (PAGE) (Proteome Factory, Berlín, DE). Las proteínas fraccionadas (Figura 8A) se transfirieron a una membrana de PVDF y posteriormente se tiñeron con anticuerpo LM-1. Las manchas indicadas en la membrana de PVDF (que se une a LM-1; Figura 8B) se superpusieron en un PAGE teñido con plata, y las 8 manchas correspondientes se recortaron del gel y se sometieron a análisis MALDI-TOF (Proteome Factory, Berlín, DE).

Los resultados del MALDI-TOF, que relaciona las proteínas de cada mancha en orden de probabilidad, tras la comparación de los fragmentos identificados con la base de datos de secuencias, fueron Mancha 1a, vimentina, desmina, tubulina, alfa, queratina, y neurofilamento; Mancha 1b, vimentina, desmina, periferina, queratina, y neurofilamento; Mancha 1c, vimentina, desmina, periferina, queratina, neurofilamento, y alfa-internexina; Mancha 2, citoqueratina 8; Mancha 3, No identificada, Polipéptido inhibidor gástrico, péptido insulínico dependiente de glucosa, fosfolipasa C-alfa, y proteína disulfuro isomerasa; Mancha 4, citoqueratina 18; y casete de proteína de unión al ATP; Mancha 5, beta actina; Mancha 6, proteína de 54 kDa, que contiene un dominio no POU (NONO), y factor de corte y empalme humano; Mancha 7, No identificada, fucosil transferasa, miembro 5 de la superfamilia del factor de necrosis tumoral, regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística, dominio HECT que contiene 1, y SB 1 de a subfamilia Alu; Mancha 7, No identificada, fucosil transferasa, miembro 5 de la superfamilia del factor de necrosis tumoral, regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística, dominio HECT que contiene 1, y SB 1 de a subfamilia Alu; Mancha 8, No identificada, matriz repetitiva 2 de serina/arginina, proteína de liberación de ras guanilo, producto de proteína sin nombre, y proteína mKIAA0232.

La diana LM-1 también se identificó mediante cromatografía en gel de extractos de BxPC-3 (Figura 9A) y las fracciones 9 y 10 se seleccionaron y sometieron a cromatografía de intercambio aniónico y posterior transferencia con el anticuerpo LM-1 (Figuras 9B-9D). Proteínas diana teñidas con LM-1 adecuadamente dimensionadas del gel correspondiente (58 y 65 kDa) se recortaron y secuenciaron.

En resumen, las bandas de proteína se redujeron, y se alquilaron, y posteriormente se digirieron con la proteasa tripsina. Los péptidos resultantes se midieron con EM MALDI en un intervalo de 800 Da-4500 Da para obtener una huella dactilar de masa de péptido. Una búsqueda en base de datos con el programa ProFound se realizó contra la base de datos NCBI.

Banda 1: La proteína se identificó como **calnexina** [67,9 kDa / pl 4,6 / gil179832 / Homo sapiens].
 Banda 2: **Glutamato deshidrogenasa 1** [56,3 kDa / pl 6.7 / gil4885281 / Homo sapiens] se identificó en la banda 2.
 Banda 3: La proteína se identificó como **calnexina** [67,9 kDa / pl 4,6 / gil179832 / Homo sapiens].
 Banda 4: La proteína de la banda 4 se identificó como **que contiene el dominio no POU de unión a octámero**, [54,3 kDa / pl 9.1 / gil34932414 / Homo sapiens].
 Banda 5: La identificación de esta banda no fue clara, debido quizás a la baja concentración de proteína en la banda del gel. Pero existe evidencia de que la banda de proteína consiste en **una que contiene el dominio no POU, de unión a octámero**, [54,3 kDa / pl 9.1 / gil34932414 / Homo sapiens].
 Banda 6: En la banda de proteína se pudo encontrar una mezcla de **queratina 9** [62,3 kDa / pl 5.1 / gil55956899

/ Homo sapiens] y **chaperonina** [61,2 kDa / pl 5.7 / gil3l542947 / Homo sapiens]. La queratina 9 debe ser un contaminante.

5 La secuencia de aminoácidos del NONO natural (SEQ ID NO:16) con las secuencias identificadas en la diana LM-1 que son idénticas a la de tipo natural están marcadas en **negrita** (primera identificación).

```

1  mqsntfnle kqhtprkhh qhhhqqqhhq qqqqppppp ipangqass qnegltidlk
61  nfrkpgectf tqsrifvgn lppditecem rklfkygka gevfihkdkg fgfirletrt
121 laeiakveld nmpirgkqlr vrfachsasl tvrnlpqyvs nelleaafsv fgqveravvi
181 vddrgrpsgk givefsgkpa arkaldrce gsflttfpr pvtvepmdql ddeeglpekl
241 viknqqfhke reqpprfaqp gsfeyeyamr wkaliemekq qdqvdnrnk
    eareklemem
301  eaarhehqvm lmrqdlmrq eelrrmeelh ngevqkrkql elrqceerrt reeemrrqqe
361  emmrrqqegf kgtfpdareq eirmgqmamg gamginrrga mppapvpagt
    pappgpatmm
421  pdgtlgltp tterfgqaat megigaiggt ppafnraapg aefapnkrrt y
    
```

10 La secuencia de aminoácidos del NONO natural con las secuencias identificadas en la diana LM-1 que son idénticas a la de tipo natural están marcadas en **negrita** (segunda identificación).

```

1  mqsntfnle kqhtprkhh qhhhqqqhhq qqqqppppp ipangqass qnegltidlk
61  nfrkpgectf tqsrifvgn lppditecem rklfkygka gevfihkdkg fgfirletrt
121 laeiakveld nmpirgkqlr vrfachsasl tvrnlpqyvs nelleaafsv fgqveravvi
181 vddrgrpsgk givefsgkpa arkaldrce gsflttfpr pvtvepmdql ddeeglpekl
241 viknqqfhke reqpprfaqp gsfeyeyamr wkaliemekq qdqvdnrnk eareklemem
301  eaarhehqvm lmrqdlmrq eelrrmeelh ngevqkrkql elrqceerrt reeemrrqqe
361  emmrrqqegf kgtfpdareq eirmgqmamg gamginrrga mppapvpagt
    pappgpatmm
421  pdgtlgltp tterfgqaat megigaiggt ppafnraapg aefapnkrrt y
    
```

15 Los datos anteriores indican que LM-1 se une a una nueva diana del cáncer, concretamente a una isoforma de la proteína que contiene el dominio no POU de unión a octámero (NONO) unida a membrana, también conocido como una proteína de unión de 54 kDa al ARN y ADN nuclear (p54nrb) y a la proteínas nuclear de 55 kDa (nmt55). Esta proteína se expresa en células cancerosas, tumorales y malignas, y la unión a LM-1 induce apoptosis de las células a las que se une.

20 Se ha notificado que el gen nmt55 cartografía el cromosoma Xq13.1 (70.420.158-70.437.743). El análisis de la expresión de los 33 genes unidos a X en 8 híbridos de células somáticas de ratón/ser humano que contenían cromosoma X humano activo (3 híbridos) o inactivo (5 híbridos) notificó que revelaba que el gen nmt55 se expresaba solamente en aquellos híbridos con el X humano activo. El gen se expande aproximadamente 18 kb y consiste en 12 exones con un tamaño comprendido entre 40 y 1.227 pb, se ha notificado que el codón de inicio está en el exón 3 y el codón de detención en el exón 12.

25 Para verificar la identidad de la diana LM-1, se realizó la transfección con ARNip para regular por defecto la expresión de NONO/nmt55. La unión de LM1 debería desaparecer si NONO/nmt55 es la diana.

30 En resumen, Células BxPc-3 se transfectaron transitoriamente con ARNip específico (dharmacon siGENOME Smart Pool) y se recogieron 48 h después de la transfección. Las células se lisaron, y las muestras se analizaron en un PAGE al 10 % y se transfirieron sobre una membrana de PVDF. La transferencia de la membrana se tiño bien con α -nmt55 o IgM de LM-1.

35 El ARNip reguló por defecto la expresión de NONO/nmt55 (Figura 10A). La unión de LM-1 a las células transfectadas con el ARNip se redujo (Figura 10B, flecha). Estos estudios corroboran que LM-1 se une a NONO/nmt55.

40 Para verificar adicionalmente la identidad de la diana LM-1, se realizaron estudios de inmunopreparación de membranas celulares MKN, BxPC-3 y A549 se realizaron con un anticuerpo comercial que se une a NONO/nmt55 (Dianova, MA3-2024). Los resultados se muestran en las Figuras 11-13.

Las Figuras 11A-11D ilustran los resultados con células MKN. En resumen, los extractos de membrana celular se inmunoprecipitaron con anti-nmt55, y posteriormente se tiñeron con anti-NONO/nmt55 mAb de ratón/anti-IgG de ratón HRP (Figura 11A), anti-IgG de ratón HRP (Figura 11B), LM-1 / anti-IgM humana HRP (Figura 11C), anti-IgM humana HRP (Figura 11D). La flecha superior (peso molecular mayor) es NONO, y la flecha de abajo (peso molecular inferior) es una cadena pesada de ratón.

Las Figuras 12A-12B ilustran los resultados con células BxPC-3. En resumen, los extractos de membrana celular se inmunoprecipitaron con anti-nmt55, y posteriormente se tiñeron con LM-1 (Figura 12A), o se tiñeron con anti-NONO/nmt55 (Figura 12B), Las flechas indican nmt55 y la cadena pesada de IgG de ratón. Los resultados indican que el anticuerpo dirigido contra nmt55 puede precipitar la proteína del extracto de membrana celular BxPC-3.

Las Figuras 13A-13B ilustran los resultados con células A549. En resumen, los extractos de membrana celular se inmunoprecipitaron con anti-nmt55, y posteriormente se tiñeron con anti-NONO/nmt55 (Figura 13A), o se tiñeron con LM-1 (Figura 13B), Las flechas indican nmt55 y la cadena pesada de IgG de ratón. Los resultados indican que el anticuerpo dirigido contra nmt55 puede precipitar la proteína del extracto de membrana celular A549.

Para verificar adicionalmente la identidad de la diana LM-1, se llevó a cabo un análisis FACS de las células A549, BxPC-3 y MKN con un anticuerpo que se une a NONO/nmt55 (Dianova, MA3-2024) o LM-1. Estos estudios revelaron que NONO/nmt55 se expresa sobre la superficie celular de las células A549, BxPC-3 y MKN.

Se transfectaron establemente células A549 con NONO de sentido contrario, y se analizaron por FACS con un anticuerpo que se une a NONO/nmt55 y LM-1. Para producir vectores, el ADNc Nono humano (1422 pb) se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando la línea celular de cáncer pancreático humano BxPC. Tras la amplificación por la PCR, el transcrito de Nono de longitud completa se introdujo en pcDNA3.1-V5-His mediante una reacción de clonación TA (Invitrogen). Este método es una estrategia de clonación no dirigida y, por tanto, la relación entre los plásmidos Nono de sentido directo (pcDNA3.1-V5-His-Nono-6xHis) y de sentido contrario (pcDNA3.1-V5-His-Nono6xHis-Anti) es de aproximadamente 50:50. Tras el cribado mediante PCR, se identificaron varios clones con Nono de sentido directo (NONO-directo) y de sentido contrario (NONO-anti) bajo el control del promotor del citomegalovirus (CMV).

Las células A549 se transfectaron con NONO-anti usando el reactivo de transfección TransPass y las células se seleccionaron en 1 mg/μl de G418 durante 2-3 semanas. Se establecieron siete líneas celulares estables con este plásmido de sentido contrario. El análisis mediante transferencia Western de la expresión de proteína endógena Nono en estas células reveló una reducción significativa en los niveles de proteína en comparación con los niveles en las células del control.

Los estudios con FACS de células A549 transfectadas con NONO-anti reveló una unión más débil de NONO/nmt55 y LM-1 a las células. Los estudios indican que la regulación por defecto de la expresión de NONO/nmt55 sobre la superficie de las células A549 reduce la unión del anticuerpo dirigido contra NONO/nmt55 a las células.

El NONO-directo se transfectó en HEK293 usando el reactivo de transfección TransPass y las células se seleccionaron en 1 mg/ml de G418 durante 2-3 semanas. Se establecieron diez clones celulares estables que expresan NONO en exceso. El análisis mediante transferencia Western de estas células muestra una expresión en exceso estable de la proteína de fusión recombinante Nono-6xHis. Estas líneas celulares estables se pueden utilizar en estudios FACS o, tras la purificación de la proteína Nono-6xHis, generación de ELISA específicos de la diana.

Para confirmar que LM-1 se une a las células HEK293 transfectadas con NONO, 40 μg de HEK293-Nono-6xHis-A9 y lisado celular HEK293^{wt} se usaron en la transferencia Western. Tras la transferencia, las proteínas inmunorreactivas se detectaron con LM-1 (IgM) y un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (anti-IgM humana-HRP) (Figura 14A). Para demostrar que la interacción LM-1-Nono es específica de la diana, las mismas sondas de proteína se analizaron con un IgM de control (Figura 14B). El análisis reveló una interacción específica de la proteína de fusión LM-1 y Nono-6xHis. El tamaño diferente entre la proteína de fusión y la endógena es un artefacto de la expresión de la proteína recombinante en pcDNA3.1-V5-His.

Ejemplo 16

Este ejemplo incluye una descripción de los estudios para determinar si la glicosilación de la proteína NONO es necesaria para la unión a LM-1.

Para determinar si la glicosilación de NONO es necesaria para la unión a LM-1, el gen NONO humano (pEXP5-CT) se transformó en bacterias BL21 (DE3). Tras la transformación, algunos clones bacterianos positivos se expresaron en medio LB inducido con IPTG 1 mM. El análisis mediante transferencia Western demostró que LM-1 (IgM) se une a las bacterias que expresan la proteína de fusión Nono-6xHis (Figura 15). El hecho de que la bacteria no glicosile proteínas excluye la tesis de que la interacción antígeno-anticuerpo LM-1 (diana) requiera la glicosilación del antígeno (diana).

Ejemplo 17

Este ejemplo incluye una descripción de algunas variantes de anticuerpo LM-1, y los estudios de unión. Los estudios de unión indican que las variantes de secuencia del anticuerpo LM-1 retienen la capacidad de unión al antígeno diana nmt55.

Se expresaron varios anticuerpos LM-1 en forma de un anticuerpo recombinante scFv (monocatenario) y se analizaron para determinar su unión a las células diana (A549, BxPC-3, HT-29, HeLa, CRL1424 y HDFa). Los cambios de un solo aminoácido en la secuencia de proteína de los dominios variables V de la cadena ligera y pesada (variable) pueden afectar al nivel de expresión de la célula y, posiblemente, a la afinidad del anticuerpo por el antígeno diana. Sin embargo, todas las variantes que se unen de forma detectable a células que expresan bacterianamente NONO/nmt55 tal como se determina en un ensayo ELISA.

Los diferentes estudios con anticuerpos scFv de LM-1 para la unión son LM-1 scFv (nuevo) representado por las SEQ ID Nos:3 y 11, (1BTA1.16VH y 1BTA1.16VL), LM-1 scFv (representado por las SEQ ID NO:1 y 11), LM-1 scFv opt (representado por las SEQ ID NO:9 y 13), un IgM de LM-1 derivado de hibridoma, e IgM de LM-1 (SEQ ID NO:3 y 11) producidos en una línea celular perC.6™ (Percivia).

El análisis de unión se realizó con poblaciones de células vivas de líneas celulares de cáncer humano (A549, BxPC-3, HT-29, HeLa, CRL1424 y HDFa) cultivadas hasta una densidad celular consistente. Se añadieron anticuerpos humanos a las células y, si presentan un antígeno diana reconocido por los anticuerpos, se produce la unión. Se añadió un anticuerpo secundario con una etiqueta fluorescente (FITC) que se detectó mediante FACS (clasificación celular activada por fluorescencia). Los inventores utilizaron anticuerpo dirigido contra -FLAG FITC de ratón para las proteínas scFv de LM-1 y FITC de ratón dirigido contra IgM humano para la proteína IgM.

La unión se refleja por un desplazamiento de la población hacia la derecha, lo que se considera positivo, si este desplazamiento es superior al de los controles negativos. Varios eventos pueden producir un desplazamiento "falso positivo". Las células solas autofluorescen, por lo que necesitan medirse, y algunas líneas celulares hacen esto más que otras. La adición solamente del anticuerpo primario provoca en las células un desplazamiento, tal como lo hace también la adición de solo el anticuerpo secundario. Todos estos eventos se consideran como controles negativos. La unión del anticuerpo a una línea celular (HDFa- línea celular dérmica) negativa para el antígeno diana también se lleva a cabo.

Las líneas celulares A549, BxPC-3, HT-29, HeLa, CRL1424 y HDFa se compararon con la unión a LM-1. Se usó una concentración de 10.000 células para cada línea celular. El anticuerpo se añadió a 100 µg/µl pero la cantidad total de proteína utilizada por reacción es de 20 µg. Los datos determinan que todas las formas del anticuerpo LM-1 estudiados se unen a las 5 líneas celulares que expresan el antígeno diana.

A continuación, el antígeno diana de LM-1, nmt55, se expresó en bacterias y se purificó con una resina anti-HIS. El gel SDS teñido con Coomassie mostró algunas bandas en la región de 50-60 KDa, que tiene el tamaño esperado. La banda de 55 Kda fue la más intensa, pero no era la única banda. Estas otras bandas contribuirán a la concentración de proteína total. Se realizaron ensayos ELISA. En resumen, nmt55 se revistió sobre la placa, se bloqueó, y después se sondeó con los anticuerpos; a continuación, el anticuerpo secundario-HRP relevante se añadió y se detectó. Los datos indican que todas las formas del anticuerpo LM-1 estudiado se unen al antígeno diana nmt55 expresado bacterianamente.

Ejemplo 18

Este ejemplo incluye una descripción de un anticuerpo LM1 contra IgG de isotipo cambiado, y los estudios de unión.

En resumen, la región VH del LM1 se amplifica mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando el hibridoma IgM de LM1. ADNc como molde usando el siguiente conjunto de cebadores: cebador 5'-AGA TCT GCC ACC ATG GCA TGC CCT GGC TTC-3', y cebador 3', 5'-TGA AGA GAC GGT GAC CAT TGT CCC. La región CH del LM1 se amplifica mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando el vector de expresión pFUSE-CHlg-hG1 como molde. Se indica a continuación el conjunto de cebadores usado: cebador 5'-AGC ACC AAG GGC CCA TCG GTC TTC-3', y cebador 3', 5'-CTC GAG TCA TTT ACC CGG AGA CAG GGA GAG.

Para producir la cadena pesada de LM1, la región VH y CH se ligó mediante la T4 ADN ligasa (New England Biolabs) y se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se indica a continuación el conjunto de cebadores usado: cebador 5'-AGA TCT GCC ACC ATG GCA TGC CCT GGC TTC -3', y cebador 3', 5'- CTC GAG TCA TTT ACC CGG AGA CAG GGA GAG. Este fragmento se ligó mediante clonación TA en el vector pEXP5-CT/TOPO TA (Invitrogen). Después de la clonación TA, la cadena pesada de LM1 se recortó del vector pEXP5-CT/TOPO TA con BglIII/XhoI y se transfirió al primer casete de expresión de pVito2-neomcs (InvivoGen).

La cadena ligera del LM1 se amplifica mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando el hibridoma IgM de LM1. ADNc como molde usando el siguiente conjunto de cebadores: cebador 5'-GAT ATC TCC GCC ACC

ATG GCA TGC CCT GGC TTC3', y cebador 3', 5'-GTC GAC CTA TGA ACA TTC TGT AGG GGC CAC. Este fragmento de PCR se ligó mediante clonación TA en el vector pEXP5-CT/TOPO TA (Invitrogen). Después de la clonación TA, la cadena ligera de LM1 se recortó del vector pEXP5-CT/TOPO TA con EcoRV/Sal I y se transfirió al segundo casete de expresión de pViro2-neo-mcs (InvivoGen). La secuencia de todos los productos de la PCR se confirmó mediante secuenciación de ADN (Qiagen).

Para confirmar que la IgG retiene la actividad de unión, se produjo un anticuerpo mediante la expresión en células HEK293, y se evaluó un anticuerpo que se une a células A549 y BxPc-3. Los materiales utilizados en estos estudios incluyeron RPMI 1640 (PAA, E15-039), suero de feto bovino al 10 % (PAA, A15-151), glutamina al 1 % (PAA, M11-004), solución de disolución celular (Sigma C5789), Anticuerpo dirigido contra IgG humano-FITC, dianova, 109-095-003, y 1xPBS.

Se utilizó plásmido de expresión "pViro2-LM1-HC-LC" con una concentración madre de 2,5 µg/ml y una relación A260/A280 entre 1,75 y 1,78. El procedimiento de transfección se realizó en medio que contiene suero (DMEM con FBS al 1 %) sobre una superficie de aproximadamente 2500 cm² (16x 154 cm² de placas de pocillos recubiertos de poli-D-lisina). En resumen, las células HEK293 cultivadas en condiciones que contienen suero y recogidas en mitad de su fase de crecimiento exponencial, se contaron 24 h antes de realizar el procedimiento de transfección. Se diluyeron hasta una concentración de aproximadamente 2,5x10⁷ células/pocillo y se incubaron hasta el día siguiente. Las células se volvieron a contar y cuando casi doblaron su concentración (entre 5,0 x 10⁷ células/placa (densidad celular de aproximadamente un 80 %), se transfectaron como se describe a continuación.

Para la preparación del complejo de transfección, 1,5 mg de ADN endrofree se diluyó en 40 ml de medio nuevo sin suero (suficiente para dieciséis placas de 150 cm²). Tras pipetear arriba y abajo para mezclar la solución, se añadieron 10 ml de PEI, se homogeneizaron por vortización inmediatamente y se incubaron durante 8 min a TA. Tras añadir 324 ml de medio que contiene suero (10 %), el complejo ADN:PEI se añadió a las células y se incubó a 37 °C durante una hora. Para eliminar el PEI de las células, las placas se lavaron tres veces con PBS. Después, las placas se llenaron con 70 ml de medio que contiene suero (1 % FBS) y se incubaron durante una noche. Para eliminar las células muertas, el medio se cambió y, a continuación, todas las placas se incubaron normalmente durante 6 días a 37 °C. Los sobrenadantes se almacenaron a 4 °C para la purificación posterior de las proteínas.

Para los estudios de unión, las células A549 y BxPc-3 se tripsinizaron con solución de disociación celular, se resuspendieron en medio completo y se configuraron a 2x10⁵/ml. Después de 30 minutos sobre hielo, las células se dispersaron en 1 ml por tubo FACS y se lavaron una vez con PBS enfriado en hielo por centrifugación a 500 g y 4 °C. La tinción se realizó con las concentraciones indicadas de anticuerpo IgG o sin anticuerpo en 200 µl de PBS. Los anticuerpos se incubaron durante 30 minutos sobre hielo, a continuación se lavaron con PBS enfriado en hielo y se aplicó el anticuerpo secundario a una dilución de 1:50 en 200 µl por tubo. Después de otros 30 minutos de incubación en la oscuridad, las células se lavaron dos veces con PBS y se aplicaron a FACS.

El análisis por FACS reveló que el anticuerpo LM1 contra IgG se une a las células A549 y BxPc-3, lo que indica que el anticuerpo retiene la especificidad de antígeno/epitopo.

Ejemplo 19

Este ejemplo incluye una descripción de estudios de unión adicionales que indican que LM-1 se une al antígeno diana, NONO/nmt55, una parte del cual incluye la secuencia de 300 aminoácidos del extremo N de NONO/nmt55.

En resumen, nmt-55 se clonó en el vector pPOW para su secreción en el periplasma de E coli. Se diseñaron cebadores para amplificar el gen NONO procedente del gen NONO humano clonado en pExP5-CT (descrito en el Ejemplo 16) y se introdujo en el vector de expresión bacteriana pPOW que permite la secreción en el periplasma de E coli mediante la señal de secreción pelB.

Para expresar nmt-55 pPOW, un cultivo inicial de 50 ml se inoculó con *E. coli* BL21 (DE3) recientemente transformada que contiene el plásmido pPOW, que codifica el nmt55 de longitud completa, se cultivó en medio triptona de levadura (YT) con ampicilina a 33 °C con agitación, aproximadamente 250 rpm. Tras la incubación nocturna, 25 µl de este cultivo se añadieron a 175 µl de caldo terrífico (TB) que contiene ampicilina en un matraz Erlenmeyer de 2 l. el cultivo se hizo crecer a 33 °C, con agitación, aproximadamente 250 rpm, hasta que alcanzó una densidad óptica (OD₆₀₀) de ~4.000 (~ 3 h), una alícuota de 1 ml y se almacenó a 4 °C para comparación posterior (T₀). A continuación el cultivo se pasó a incubadoras a 42 °C y el crecimiento continuó durante 3 horas más. El progreso se comprobó periódicamente después de 3 horas, una vez que la OD₆₀₀ se hubo estabilizado se detuvo la inducción. Se tomó una alícuota de 1 ml tras la inducción T_{FINAL} y se almacenó a 4 °C para comparación posterior.

Los cultivos se transfirieron a frascos de policarbonato de 2540 ml (Nalgene) y se centrifugaron a 4000 x g, 4 °C durante 20 minutos para aglomerar las células de *E. coli*. A continuación, el medio se decantó y los aglomerados se almacenaron a -20 °C para la extracción y purificación de proteínas usando Profinia™ anti-His.

Para extraer nmt-55 pPOW, los aglomerados descongelados se volvieron a suspender completamente, por pipeteo y

5 vortización, en 15 µl de tampón de lisis Profinia denaturing IMAC (Bio-Rad Laboratories) para lisar las células. El lisado se sonicó a continuación sobre hielo, usando un sonicador de sonda (10 µm de amplitud), en intervalos de 30 s durante 4 minutos. El lisado se clarificó mediante centrifugación (20.230 x g; minifuga Eppendorf 542) en tubos de microfuga (Eppendorf) y se filtraron a través de un filtro de 0,45 µm al vacío. El lisado se transfirió a continuación a un tubo de muestra de 50 ml (Falcon; BD) para su purificación.

10 La purificación se realizó mediante His-tag usando cromatografía de afinidad con desnaturalización por metal inmovilizado (IMAC). En resumen, el nmt-55 extraído se purificó mediante purificación de proteínas IMAC automatizado con Pofinia™. Los tampones utilizados en la purificación se suministraron por Bio-Rad como concentrados 1,4x. Se añadió urea a estos concentrados para obtener una concentración final de urea 6 M. Se instaló un IMAC (Ni-NTA) en el sistema y el instrumento se configuró según las recomendaciones del fabricante. Protocolo Profinia IMAC:

Etapa	Función	Tampón	ml/min	Volúmenes de columna	Tiempo (min)
1	Lavado con agua	Agua des	20	-	0.2
2	Equilibrar columna	Agua des	2	2	1
3	Equilibrar columna	Tampón 1†	2	5	2.5
4	Cargar muestra	N/A	2	x	x
5	Lavado columna 1	Tampón 1†	2	6	3
6	Lavado columna 2	Tampón 2†	2	6	3
7	Eluir 1*	Tampón 3†	2	-	3.1
8	Eluir 2*	Tampón 3†	2	4	2
9	Limpiar columna	Tampón 5†	2	5	2.5
10	Limpiar columna	Tampón 6†	2	5	2.5
11	Lavado con agua	Agua des	2	5	2.5
12	Almacenar columna	Tampón 7†	2	7	3.5
13	Lavado con agua	Agua des	20	-	0.2
14	Limpiar juntas bomba	Agua des	20	-	0.2
15	Pausa limpieza	-	-	-	-
16	Limpiar puerto muestra	Agua des	20	-	0.2

† Número de tampón según su posición en Profinia

15 El intercambio de tampón se realizó mediante dispositivos Amicon Ultra-15. En resumen, 15 ml de 1 x PBS (NaCl 300 mM, pH 6,5) se añadieron un concentrador de centrifuga Amicon Ultra-15 y se centrifugaron a 4000 rpm (4 °C) durante 15 minutos para eliminar cualquier conservante de las membranas. Se añadió un volumen de muestra completamente eluido (4 ml) al depósito de la membrana, y se llevó hasta 15 ml con 1 x PBS (NaCl 300 mM, pH 6,5) y se centrifugaron a 4000 rpm (4 °C) durante 30 minutos. Una muestra de -1,0 ml del flujo pistón se descartó y una cantidad adicional de 14 ml de 1 x PBS (NaCl 300 mM, pH 6,5) se añadió al depósito y se repitió el proceso. Se repitió 2 veces más para garantizar que la concentración de urea es suficientemente baja. Recuperación de la muestra de proteína y medición de la concentración a DO280.

25 La electroforesis en gel de acrilamida (PAGE) se llevó a cabo en T_0 , T_{FINAL} usando el sistema Invitrogen Novex NuPAGE según las instrucciones del fabricante.

30 La transferencia Western se realizó usando un sistema de transferencia de gel Invitrogen iBlot™ según las recomendaciones del fabricante. La membrana después de la transferencia se bloqueó usando leche desnatada al 5 % en TBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente. El reactivo de bloqueo se descartó, y el anticuerpo primario (LM-1opt scFv, una variante de Fv monocatenaria de LM-1 con etiquetas FLAG y His en el extremo C) se añadió a una relación de 1:500 en leche desnatada al 5 % TBS-T (5 ml de volumen total) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente (basculante). A continuación se descartó el anticuerpo primario, la membrana se lavó con 3 x cambios de 5 ml de TBS-T en intervalos de 5 minutos. El anticuerpo secundario (conjugado anti-FLAG HRP) se añadió a una relación de 1:1000 en leche desnatada al 5 % TBS-T y se incubó durante una hora más (balanceo). La membrana se volvió a lavar con 3 x cambios de 5 ml de TBS-T en intervalos de 5 minutos y durante 5 minutos más con TBS. La detección se realizó mediante detección colorimétrica de sustrato DAB potenciada con metal (Thermo

Scientific).

- Se realizó a continuación el análisis por espectrometría de masas con digestión en gel de las proteínas teñidas con plata. En resumen, la banda de gel de interés del gel nmt55 purificado (Figura 16B) se recortó y se introdujo en un tubo de microfuga de 1,5 ml (Eppendorf) y se lavó dos veces con 300 µl de agua de calidad Milli Q durante aproximadamente 15 minutos. El tapón de gel se lavó a continuación 2 veces con 50 µl de acetonitrilo al 50 % en bicarbonato de amonio 50 mM (pH 8,0) para eliminar toda la mancha del tapón de gel. Cada lavado duró aproximadamente 30 minutos.
- El tapón de gel se deshidrató a continuación con 100 µl de acetonitrilo hasta que se volvió opaco, y a continuación el líquido se decantó y el tapón se secó en una centrifuga al vacío. A continuación, el tapón se rehidrató y se incubó en ditioneitol 10 mM (DTT) en bicarbonato de amonio 25 mM a 56 °C durante 1 hora, después, se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se añadió después a la muestra un volumen igual de yodoacetamina 55 mM en bicarbonato de amonio 25 mM y se incubó en la oscuridad durante 45 minutos. Después de esto, la solución de DTT/yodoacetamina se decantó, y la muestra se lavó con bicarbonato de amonio 25 mM durante 10 minutos seguido por una deshidratación de 10 minutos con acetonitrilo al 100 %. De nuevo, la muestra se rehidrató con bicarbonato de amonio 25 mM durante 15 minutos. Este líquido se decantó a continuación y se sustituyó con acetonitrilo al 100 % durante 10 minutos. El líquido se decantó a continuación y el tapón se secó en una centrifuga al vacío.
- Se preparó una solución de secuencia de porcino modificada y graduada en tripsina (Promega) por disolución reciente de 20 a 25 µg en 200 µl de HCl 1 mM o ácido acético al 1 % de forma que la concentración final esté comprendida entre 100 ng/µl y 125 ng/µl. La tripsina de trabajo se preparó diluyendo la solución madre 1:10 con bicarbonato de amonio 25 mM de tal forma que la concentración final sea de 10 a 12,5 ng/µl.
- Tras centrifugar al vacío, el tapón seco se rehidrató con 20 µl de solución de tripsina de trabajo durante 20 minutos. El exceso de solución de tripsina se eliminó con una pipeta y la muestra se digirió a 37 °C durante 4 h. La digestión se detuvo mediante 25 µl más de ácidos al 10 % y se dejó reposar durante 15 minutos. El sobrenadante se recuperó, y el tapón de gel se extrajo adicionalmente con 15 µl de acetonitrilo al 50 % en bicarbonato de amonio 50 mM durante 15 minutos para recuperar más péptidos que se combinaron con el sobrenadante inicial, en este momento el tapón se descartó. A continuación, la muestra se concentró a 5 µl en una centrifuga de vacío y se cargó directamente en una espectrometría de masas LC-MSD-ToF para su análisis.

La Figura 16A muestra el análisis PAGE de la expresión de nmt55. El gel se tiñó usando Invitrogen SimplyBlue SafeStain. Hilera 1) marcador de peso molecular de proteína preteñido Novex Sharp. Hilera 2) para la muestra, que indica el nivel inicial de expresión de proteína. Hilera 3) T_{FINAL} que indica el nivel de expresión de nmt55 tras la inducción térmica a 42 °C.

La Figura 16B muestra el análisis PAGE de nmt55 tras purificación con Profinia™. El gel se tiñó usando Invitrogen SimplyBlue SafeStain. Hilera 1) marcador de peso molecular de proteína preteñido Novex Sharp. Hilera 2) nmt55 purificado y concentrado procedente de la expresión periplásmica en E coli. Aunque el PM previsto de NMT55 es 55 KDa, se observó una banda de proteína de aproximadamente 30 KDa, lo que sugiere un producto de escisión.

Figura 16C muestra la transferencia Western de nmt55 tras purificación con Profinia™. Hilera 1) marcador de peso molecular de proteína preteñido Novex Sharp. Hilera 2) el nmt55 purificado y concentrado se detectó usando LM-lopt scFv como anticuerpo primario con anticuerpo monoclonal dirigido contra FLAG conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) como anticuerpo secundario. Se detectó una banda de proteína de aproximadamente 30 KDa se detectó mediante LM-lopt scFv.

La banda de 30 KDa débil del gel teñido con Coomassie (Figura 16B) se recortó y se trató para el análisis por espectro de masas, como se ha descrito. Del espectro de masas y la búsqueda informática en bases de datos, se identificaron algunos hallazgos. SLYD ECOLI peptidil-prolil cis-trans isomerasa de tipo FKBP slyD OS=Escherichia coli NONO HUMANO proteína de unión al octámero que contiene el dominio no POU =Homo sapiens DEOD ECOHS Purina nucleósido fosforilasa tipo deoD OS=Escherichia coli DEOD2 VI8CH Purina nucleósido fosforilasa tipo deoD 2 OS=Vibrio cholerae DEOD SALCH Purina nucleósido fosforilasa tipo deoD deoD-type OS=Salmonella choleraesuis

Se calculó la probabilidad de Mowse basada en la probabilidad respecto a los hallazgos de proteínas. La puntuación de los iones es $-10 \cdot \log(P)$, donde P es la probabilidad de la correspondencia observada en un evento aleatorio. Las puntuaciones de iones individuales > 51 indican la identidad o una extensa homología ($p < 0,05$). Las puntuaciones de las proteínas se derivan de las puntuaciones de los iones de forma no probabilística para ordenar los hallazgos de proteínas.

La cobertura de la secuencia de nmt55 fue el 11 %. Los péptidos correspondientes (negrita, subrayado) de NONO identificado a partir de espectrómetro de masas y búsqueda en bases de datos corresponden a las secuencias de péptido en la región del extremo N del NMT55 recombinante. De esta forma el epítipo al que se une LM-1 está presente en al menos el dominio de 30 KDa del extremo N, o de los aminoácidos 1-300 de NONO/nmt55.

1 MQSNKTFNLE KQNHTPRKHH QHHHQQHHQ QQQQPPPPP
 IPANGQQASS
51 QNEGLTIDLK NFRKPGEKTF TQRSRLLVGN LPPDITEEM
RKLFEKYGKA
101 GEVFIHKDKG FGFIRLETRT LAEIAKVELD NMPLRGKQLR
 VRFACHSASL
151 TVRNLPQYVS NELLEAFSV FGQVERAVVI VDDRGRPSGK
 GIVEFSGKPA
201 ARKALDRCE GSFLLTTFPR PVTVEPMDQL DDEEGLPEKL
 VIKNQQFHKE
251 REQPPRFAQP GSFEYAYAMR WKALIEMEKQ QDQVDRNIK
 EAREKLEMEM
301 EAARHEHQVM LMRQDLMRRQ EELRRMEELH NQEVQKRKQL
 ELRQEEERRR
351 REEEMRRQQE EMMRRQQEGF KGTFPDAREQ EIRMGQMAMG
 GAMGINNRGA
401 MPPAPVPAGT PAPPGPATMM PDGTLGLTTP TTERFGQAAT
 MEGIGAIGGT
451 PPAFNRAAPG AEFAPNKRRR Y

LISTADO DE SECUENCIAS

5

<110> PATRYS LIMITED
 VOLLMERS, HEINZ PETER
 BRANDLEIN, STEPHANIE
 THALHEIMER, ANDREAS
 10 ILAG, LEODEVICO L.
 POWER, BARBARA
 UDABAGE, LISHANTHI
 HENSEL, FRANK
 SCHOENEN, FRANK
 15 KELTER, ARNDT-RENE
 HOSKING, CHRISTOPHER G.

10

15

20

<120> ANTICUERPOS LM, FRAGMENTOS FUNCIONALES, ANTÍGENO DIANA LM-1, Y MÉTODOS PARA PREPARARLOS Y USARLOS

25

<130> 090946WO

<140> PCT/US2009/47401

<141> 15-06-2009

<150> 61/143.351

<151> 08-01-2009

30

<150> 61/061.881

<151> 16-06-2008

<160> 30

35

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 129

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

40

<400> 1

ES 2 595 362 T3

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

115

120

125

Ser

5 <210> 2
 <211> 342
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 2

ccgaccctgt ccctcacctg cgtgtctct ggtggctcca tcagcagtg tggttactac 60
 tggagctgga tccgccagca cccaggggaag ggcctggagt ggattgggta catctattac 120
 agtgggagca cctactacaa cccgtccctc aagagtcgag ttaccatata agtagacacg 180
 tctaagaacc agttctcct gaagctgagc tctgtgactg ccgcggacac ggccgtgtat 240
 tactgtgcca gagttgatgc gcgatatgat tacgtttggg ggagttatcg ttatgatgct 300
 tttgatatct ggggccaagg aaccctggtc accgtctctt ca 342

10
 15 <210> 3
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 3

ES 2 595 362 T3

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

Ser

5 <210> 4
 <211> 387
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
 acctgcgctg tctctggtgg ctccatcagc agtggtggtt actactggag ctggatccgc 120
 cagcaccag ggaagggcct ggagtggatt gggtagatct attacagtgg gagcacctac 180
 tacaaccgct ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
 tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagtt 300
 gatgcgcat atgattacgt ttgggggagt taccggtatg atgcttttga tatctggggc 360
 caagggacaa tggtcaccgt ctcttca 387

10 <210> 5
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 5

ES 2 595 362 T3

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

ser

5 <210> 6
 <211> 387
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 6

cagggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcaccgac cctgtccctc 60
 acctgcgctg tctctggtgg ctccatcagc agtggtggtt actactggag ctggatccgc 120
 cagcaccag ggaagggcct ggagtggatt gggatcatct attacagtgg gagcacctac 180
 tacaaccgct ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
 tccctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagtt 300
 gatgcgcgat atgattacgt ttgggggagt tatcgttttg atgcttttga tatctggggc 360
 caagggacaa tggtcaccgt ctcttca 387

10
 15 <210> 7
 <211> 129
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 7

ES 2 595 362 T3

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

Ser

5 <210> 8
 <211> 387
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 8

cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcacagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtgggtggtt actactggag ctggatccgc 120
 cagcaccag ggaagggcct ggagtggatt gggatcatct attacagtgg gagcacctac 180
 tacaaccgct ccctcaagag tcgagttacc atatcagtag acacgtctaa gaaccagttc 240
 tcctgaagc tgagctctgt gactgccgcg gacacggccg tgtattactg tgcgagagtt 300
 gatgcgcat atgattacgt ttgggggagt tatcgttatg atgcttttga tatctggggc 360
 caagggacaa tggtcaccgt ctcttca 387

10
 15 <210> 9
 <211> 130
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 9

ES 2 595 362 T3

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

<210> 10
 <211> 390
 5 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 10

gaggtgcagc tggctcagag cgggggagggc ctggtgcagc cagggggatc tctgagactg 60
 agctgcgccg tgagcggcgg atctatttcc agcgggggat attattggtc ttggatcaga 120
 caggctcccg gaaaggggct ggaatgggtc atcggctaca tctactacag cggcagcacc 180
 tactacgccg acagcgtgaa gggccggttc accatcagcc gggacaacag caagaacacc 240
 ctgtacctgc agatgaacag cctgcggggc gaggacaccg cgggtgacta ctgcgccaga 300
 gtggacgcca gatacacta cggtgtggggc agctacagat acgacgcctt cgacatctgg 360
 ggccagggca ccctggtgac cgtgtcttct 390

10
 <210> 11
 <211> 113
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*
 <400> 11

ES 2 595 362 T3

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

Gln

5 <210> 12
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 12

5 cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtg tctgcggccc caggacagaa ggtcaccatc 60
 tcctgctctg gaagcagctc caacattggg aataattatg taccctggta ccagcagctc 120
 ccaggaacag cccccaaact cctcatttat gacaataata agcgaccctc agggattcct 180
 gaccgattct ctggctccaa gtctggcacg tcagccaccc tgggcatcac cggactccag 240
 actggggacg aggccgatta ttactgcgga acatgggata gcagcctgag tgctggttgg 300
 10 gtgttcggcg gagggaccaa gctgaccgtc ctaggtcag 339

15 <210> 13
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 13

ES 2 595 362 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 Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly
 20 25 30
 Asn Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 35 40 45
 Leu Leu Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Glu Pro Ser Gly Val Pro Ser Arg
 50 55 60
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
 65 70 75 80
 Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Thr Trp Asp
 85 90 95
 Ser Ser Leu Ser Ala Gly Trp Val Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 100 105 110
 Ile Lys Arg
 115

5

<210> 14
 <211> 345
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 14

gacatccaga tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcca cagagtgacc 60
 atcacctgca gaagcggcag cagcagcaac atcggcaaca attatgtctc ttggtatcag 120
 cagaaacctg gcaaggcccc caagctgctg atctacgaca acaacaaaga acccagcggc 180
 gtgcccagcc ggttttagcgg cagcggctcc ggcaccgact tcaccctgac catcagcagc 240
 ctgcagcccg aggatttcgc cacctactac tgtcagggga catgggatag cagcctgtcc 300
 gccggctggg tgttcggcca ggaacaaag gtggagatca agaga 345

10

<210> 15
 <211> 241
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 15

Met Ala Cys Pro Gly Phe Leu Trp Ala Leu Val Ile Ser Thr Cys Leu
 1 5 10 15

20

ES 2 595 362 T3

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

Ser

<210> 16
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 16

ES 2 595 362 T3

Met Gln Ser Asn Lys Thr Phe Asn Leu Glu Lys Gln Asn His Thr Pro
 1 5 10 15
 Arg Lys His His Gln His His His Gln Gln Gln His His Gln Gln Gln
 20 25 30
 Gln Gln Gln Pro Pro Pro Pro Pro Ile Pro Ala Asn Gly Gln Gln Ala
 35 40 45
 Ser Ser Gln Asn Glu Gly Leu Thr Ile Asp Leu Lys Asn Phe Arg Lys
 50 55 60
 Pro Gly Glu Lys Thr Phe Thr Gln Arg Ser Arg Leu Phe Val Gly Asn
 65 70 75 80
 Leu Pro Pro Asp Ile Thr Glu Glu Glu Met Arg Lys Leu Phe Glu Lys
 85 90 95
 Tyr Gly Lys Ala Gly Glu Val Phe Ile His Lys Asp Lys Gly Phe Gly
 100 105 110
 Phe Ile Arg Leu Glu Thr Arg Thr Leu Ala Glu Ile Ala Lys Val Glu
 115 120 125
 Leu Asp Asn Met Pro Leu Arg Gly Lys Gln Leu Arg Val Arg Phe Ala
 130 135 140
 Cys His Ser Ala Ser Leu Thr Val Arg Asn Leu Pro Gln Tyr Val Ser
 145 150 155 160
 Asn Glu Leu Leu Glu Glu Ala Phe Ser Val Phe Gly Gln Val Glu Arg
 165 170 175
 Ala Val Val Ile Val Asp Asp Arg Gly Arg Pro Ser Gly Lys Gly Ile
 180 185 190
 Val Glu Phe Ser Gly Lys Pro Ala Ala Arg Lys Ala Leu Asp Arg Cys
 195 200 205
 Ser Glu Gly Ser Phe Leu Leu Thr Thr Phe Pro Arg Pro Val Thr Val
 210 215 220
 Glu Pro Met Asp Gln Leu Asp Asp Glu Glu Gly Leu Pro Glu Lys Leu
 225 230 235 240
 Val Ile Lys Asn Gln Gln Phe His Lys Glu Arg Glu Gln Pro Pro Arg
 245 250 255
 Phe Ala Gln Pro Gly Ser Phe Glu Tyr Glu Tyr Ala Met Arg Trp Lys
 260 265 270

ES 2 595 362 T3

Ala Leu Ile Glu Met Glu Lys Gln Gln Gln Asp Gln Val Asp Arg Asn
 275 280 285

Ile Lys Glu Ala Arg Glu Lys Leu Glu Met Glu Met Glu Ala Ala Arg
 290 295 300

His Glu His Gln Val Met Leu Met Arg Gln Asp Leu Met Arg Arg Gln
 305 310 315 320

Glu Glu Leu Arg Arg Met Glu Glu Leu His Asn Gln Glu Val Gln Lys
 325 330 335

Arg Lys Gln Leu Glu Leu Arg Gln Glu Glu Arg Arg Arg Arg Glu
 340 345 350

Glu Glu Met Arg Arg Gln Gln Glu Glu Met Met Arg Arg Gln Gln Glu
 355 360 365

Gly Phe Lys Gly Thr Phe Pro Asp Ala Arg Glu Gln Glu Ile Arg Met
 370 375 380

Gly Gln Met Ala Met Gly Gly Ala Met Gly Ile Asn Asn Arg Gly Ala
 385 390 395 400

Met Pro Pro Ala Pro Val Pro Ala Gly Thr Pro Ala Pro Pro Gly Pro
 405 410 415

Ala Thr Met Met Pro Asp Gly Thr Leu Gly Leu Thr Pro Pro Thr Thr
 420 425 430

Glu Arg Phe Gly Gln Ala Ala Thr Met Glu Gly Ile Gly Ala Ile Gly
 435 440 445

Gly Thr Pro Pro Ala Phe Asn Arg Ala Ala Pro Gly Ala Glu Phe Ala
 450 455 460

Pro Asn Lys Arg Arg Arg Tyr
 465 470

<210> 17
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador

10

<400> 17
 agatctgccg ccaccatggc atgccctggc ttc 33

15

<210> 18
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador

 <400> 18
 5 tgaagagacg gtgaccattg tccc 24

 <210> 19
 <211> 24
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador

 <400> 19
 15 agcaccaagg gcccatcggt cttc 24

 <210> 20
 <211> 30
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador
 25
 <400> 20
 ctcgagtcat ttaccggag acagggagag 30

 <210> 21
 <211> 33
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador
 35
 <400> 21
 gatattccg ccacatggc atgccctggc ttc 33

 <210> 22
 <211> 30
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador
 45
 <400> 22
 50 gtcgacctat gaacattctg tagggccac 30

 <210> 23
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador

 <400> 23
 60 atgcagagta ataaaacttt taac 24

 <210> 24
 <211> 24
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

ES 2 595 362 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador

<400> 24

5 gtatcggcga cgttgtttg gggc 24

<210> 25

<211> 12

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 25

Val Ser Gly Gly Ser Ile ser ser Gly Gly Tyr Tyr
1 5 10

15

<210> 26

<211> 16

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20

<400> 26

Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

25

<210> 27

<211> 19

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30

<400> 27

Val Asp Ala Arg Tyr Asp Tyr Val Trp Gly Ser Tyr Arg Tyr Asp Ala
1 5 10 15

Phe Asp Ile

35

<210> 28

<211> 13

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

40

<400> 28

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser
1 5 10

45

<210> 29

<211> 8

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 29

Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly

50

1

5

ES 2 595 362 T3

<210> 30
<211> 12
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 30

Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu Ser Ala Gly Trp Val
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o un fragmento funcional del mismo que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera, en el que:

- 5 (a) la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera comprenden una secuencia que es al menos un 90 % idéntica a la región variable de la cadena pesada y una secuencia que es al menos un 90 % idéntica a la región variable de la cadena ligera de un anticuerpo LM-1 producido mediante una línea celular depositada como depósito DSMZ n.º DSM ACC 2623; y
- 10 (b) la región variable de cadena pesada comprende las tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de las secuencias de aminoácidos mostradas en la SEQ ID NO: 1, y la región variable de la cadena ligera comprende las tres CDR de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 11

15 para su uso en el tratamiento de metástasis de una neoplasia, un tumor o un cáncer en un sujeto que necesita tratamiento, o para reducir o inhibir la metástasis de una neoplasia un tumor o un cáncer primarios en uno o más sitios, ubicaciones o regiones diferentes de una neoplasia, un tumor o un cáncer primarios en un sujeto que necesita tratamiento, o para reducir o inhibir el crecimiento, la proliferación, la movilidad o la capacidad de invasión de células neoplásicas, células tumorales o células cancerosas que se pueden desarrollar u ocasionar una metástasis en un

20 2. El anticuerpo o el fragmento funcional para el uso de la reivindicación 1, en donde las tres CDR de la región variable de cadena pesada comprenden o consisten en CDR1, VSGGSISSGGYY, CDR2, YIYYSGSTYYNPSLKS y CDR3, VDARYDYVWGSYRYDAFDI; y/o las tres CDR de la región variable de cadena ligera comprenden o consisten en CDR1, SGSSSNIGNNYVS, CDR2, DNNKRPSG y CDR3, GTWDSLSAGWV.

25 3. El anticuerpo o el fragmento funcional para el uso de las reivindicaciones 1 o 2, en donde el anticuerpo o el fragmento funcional del mismo se unen a la proteína NONO/nmt55.

30 4. El anticuerpo o el fragmento funcional para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que compite con el anticuerpo LM-1 producido mediante una línea celular que tiene el número de depósito DSMZ DSM ACC 2623 para su unión a NONO-nmt55.

35 5. El anticuerpo o el fragmento funcional para el uso de las reivindicaciones 3 o 4, en donde NONO-nmt55 comprende una secuencia de aminoácidos NONO-nmt55 en su extremo N.

6. El anticuerpo o el fragmento funcional para el uso de las reivindicaciones 3 o 4, en donde NONO-nmt55 comprende una secuencia definida como:

```

1 MQSNKTFNLE KQNHTPRKHH QHHHQQQHHQ QQQQQPPPPP IPANGQQASS
51 QNEGLTIDLK NFRKPGEKTF TQRSRLFVGN LPPDITEEEM RKLFEKYGKA
101 GEVFIHKDKG FGFIRLETRT LAEIAKVELD NMPLRGKQLR VRFACHSASL
151 TVRNLPQYVS NELLEEAHSV FGQVERAVVI VDDRGRPSGK GIVEFSGKPA
201 ARKALDRCSE GSFLLTTFPR PVTVEPMDQL DDEEGLPEKL VIKNQPFHKE
251 REQPPRFAQP GSFEYAYAMR WKALIEMEKQ QQDQVDRNIK EAREKLEMEM
    
```

40 7. El anticuerpo o el fragmento funcional para el uso de las reivindicaciones 3 o 4 que se une a los aminoácidos 1-300 de la secuencia NONO-nmt55 definida como:

1 MQSNKTFNLE KQNHTPRKHH QHHHQQQHHQ QQQQQPPPPP IPANGQQASS
 51 QNEGLTIDLK NFRKPGEKTF TQRSRLFVGN LPPDITEEEM RKLFEKYGKA
 101 GEVFIHKDKG FGFIRLETRT LAELIAKVELD NMPLRGKQLR VRFACHSASL
 151 TVRNLPQYVS NELLEAFSV FGQVERAVVI VDDRGRPSGK GIVEFSGKPA
 201 ARKALDRCSE GSFLLTTFPR PVTVEPMDQL DDEEGLPEKL VIKNQQFHKE
 251 REQPPRFAQP GSFEYAYMR WKALIEMEKQ QQDQVDRNIK EAREKLEMEM
 301 EAARHEHQVM LMRQDLRRQ EELRRMEELH NQEVQKRKQL ELRQEEERRR
 351 REEEMRQOE EMMRQOEGF KGTFPDAREQ EIRMGQMAMG GAMGINNRGA
 401 MPPAPVPAGT PAPPGPATMM PDGTLGLTTP TTERFGQAAT MEGIGAIGGT
 451 PPAFNRAAPG AEFAPNKRRR Y

8. El anticuerpo o el fragmento funcional para el uso de las reivindicaciones 3 o 4, en donde la proteína NONO/nmt55 comprende la SEQ ID NO:16.

5 9. El anticuerpo o el fragmento funcional para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el anticuerpo o el fragmento funcional se unen a células Colo-699 (número de registro DSMZ ACC 196), línea celular de adenocarcinoma de pulmón DV-90 (número de registro DSMZ ACC 307), línea celular de carcinoma epidermoide de pulmón EPLC-272H (número de registro DSMZ ACC 383) o línea celular de carcinoma escamocelular de pulmón
 10 LOU-NH91 (número de registro DSMZ ACC 393).

15 10. El anticuerpo o el fragmento funcional para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la neoplasia, el tumor, el cáncer o la metástasis afectan o están presentes al menos en parte en cerebro, espina dorsal, cabeza o cuello, mama, esófago, boca, nasofaringe, nariz o senos frontales, tiroides, cabeza o cuello, tracto gastrointestinal, estómago, intestino delgado, duodeno, íleon, yeyuno, pulmón, hígado, páncreas, riñón, glándulas
 15 adrenales, vejiga, colon, recto, tracto genitourinario, próstata, útero, endometrio, cuello de útero, ovario, médula ósea, linfa, sangre, hueso, testículos, pene, piel o músculo, o sistema hematopoyético.

20 11. El anticuerpo o el fragmento funcional para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la neoplasia, el tumor, el cáncer o la metástasis comprenden sarcoma, carcinoma, adenocarcinoma, osteosarcoma, fibrosarcoma, melanoma, mieloma, blastoma, glioma, linfoma o leucemia.

Figura 1

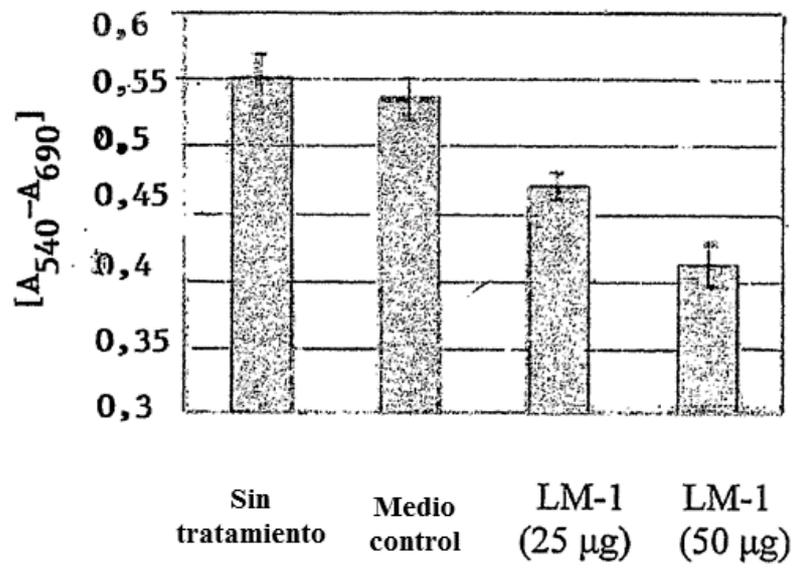


Figura 2

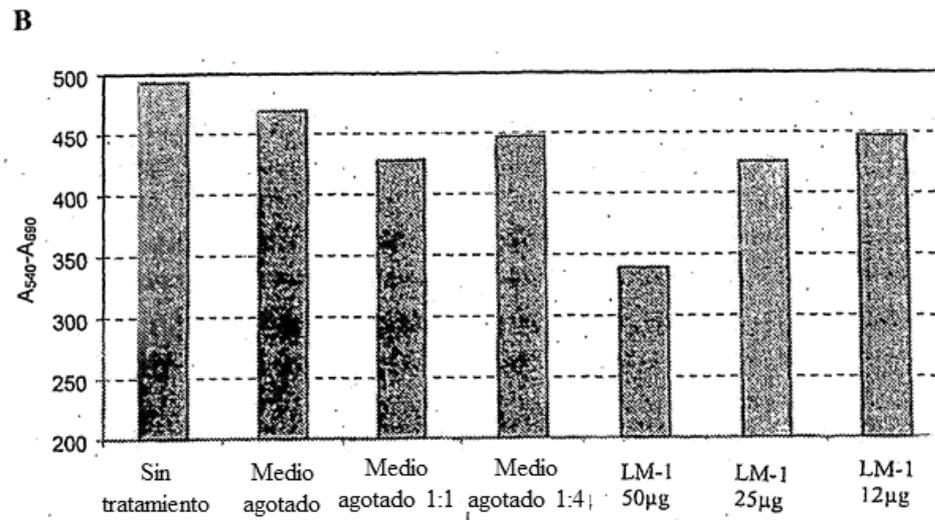
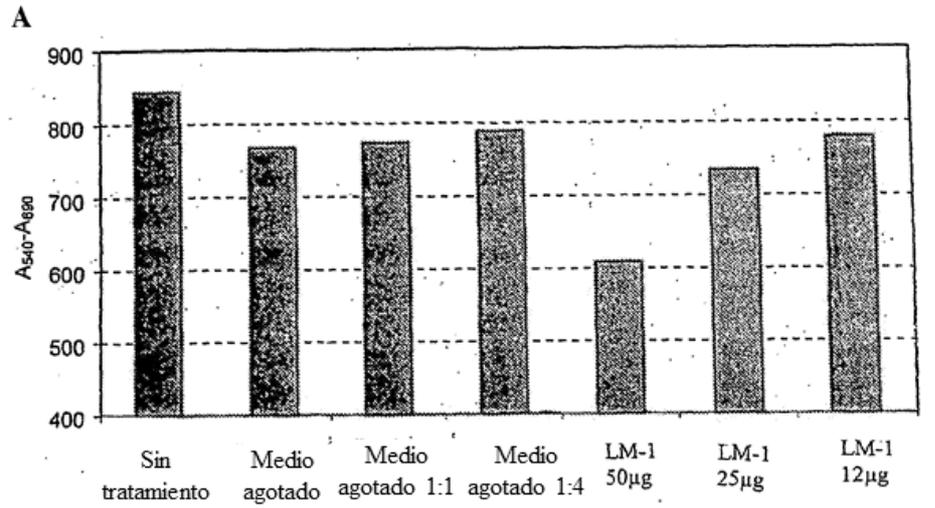


Figura 3

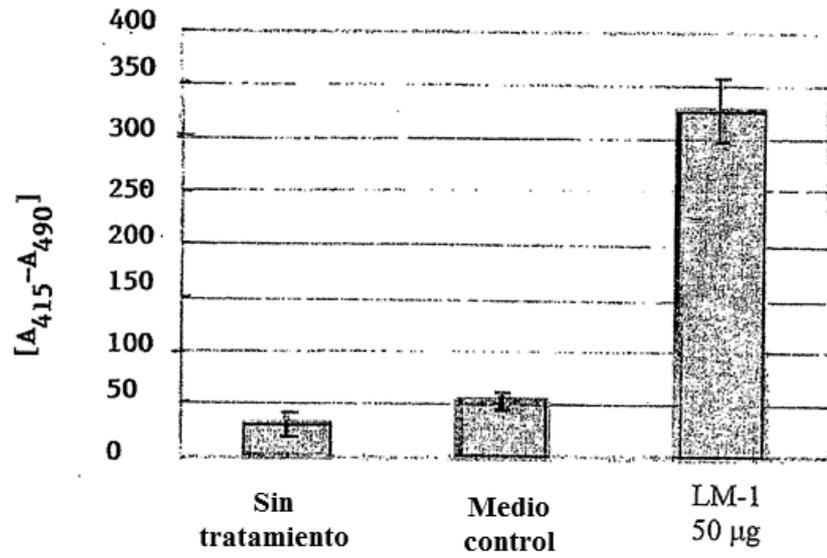
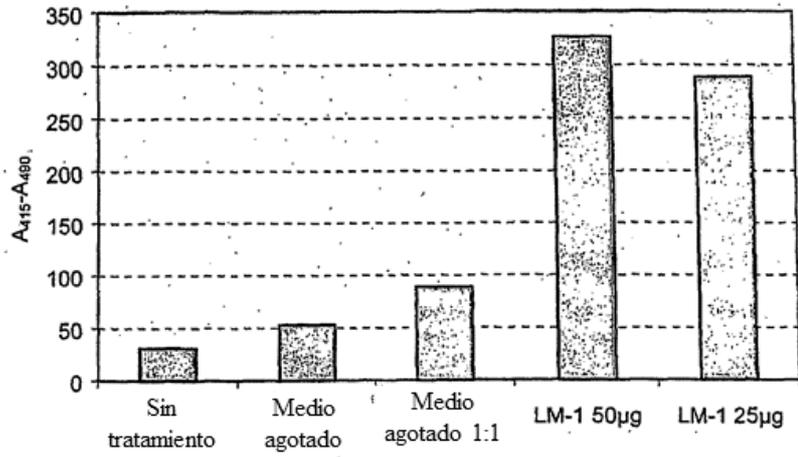


Figura 4

A



B

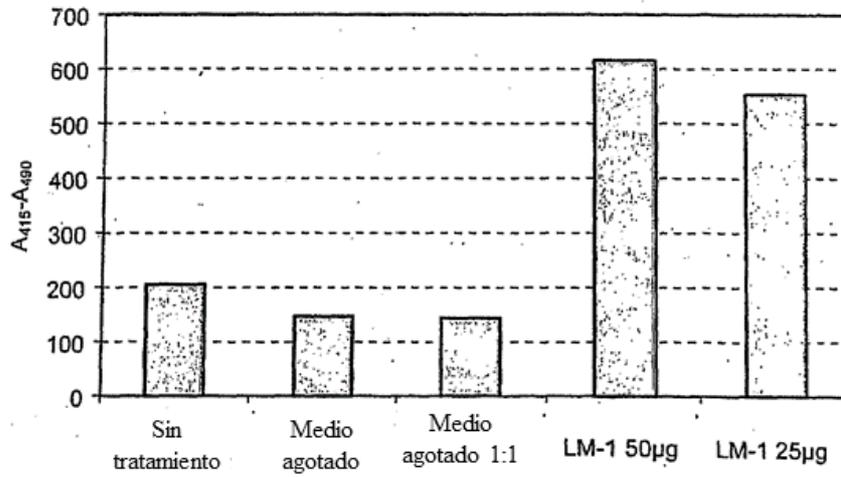


Figura 5 (cont.)

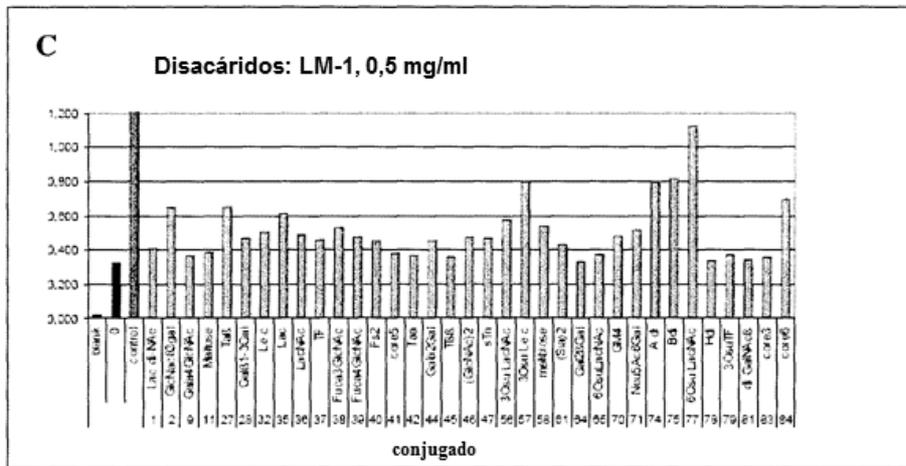
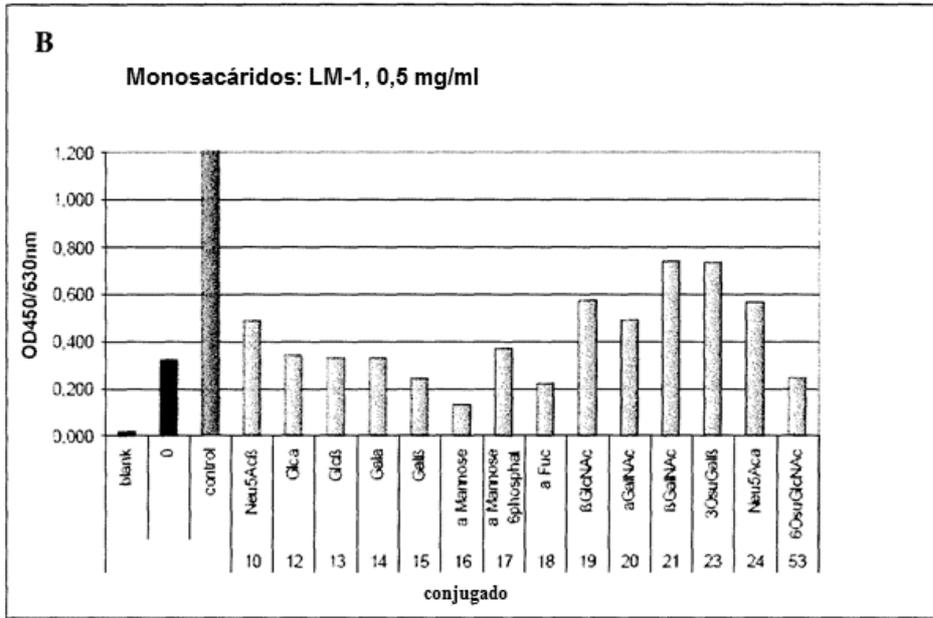


Figura 5 (cont.)

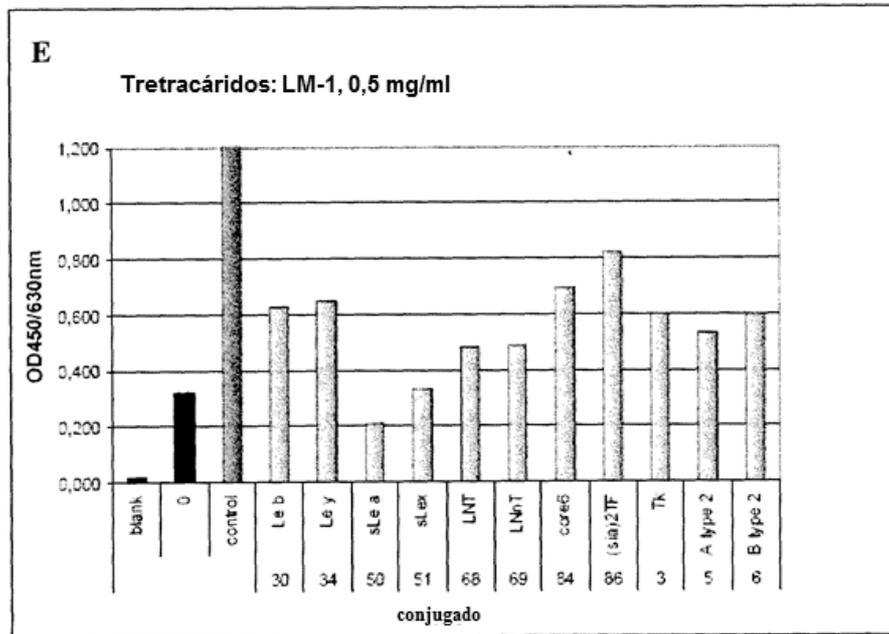
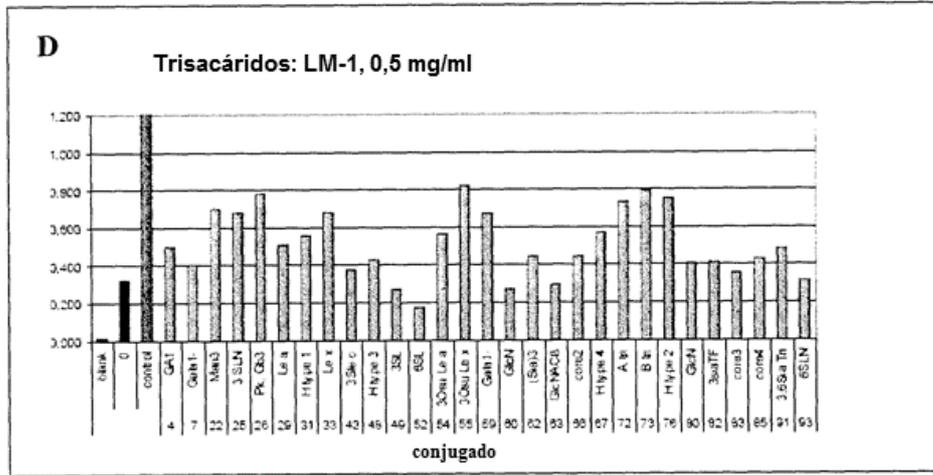


Figura 5 (cont.)

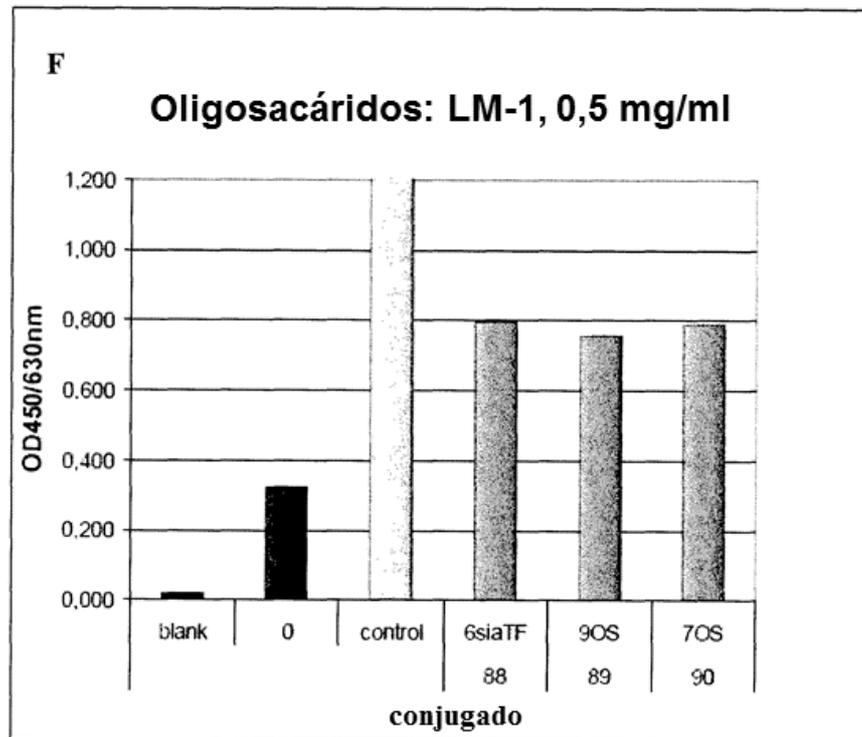


Figura 6

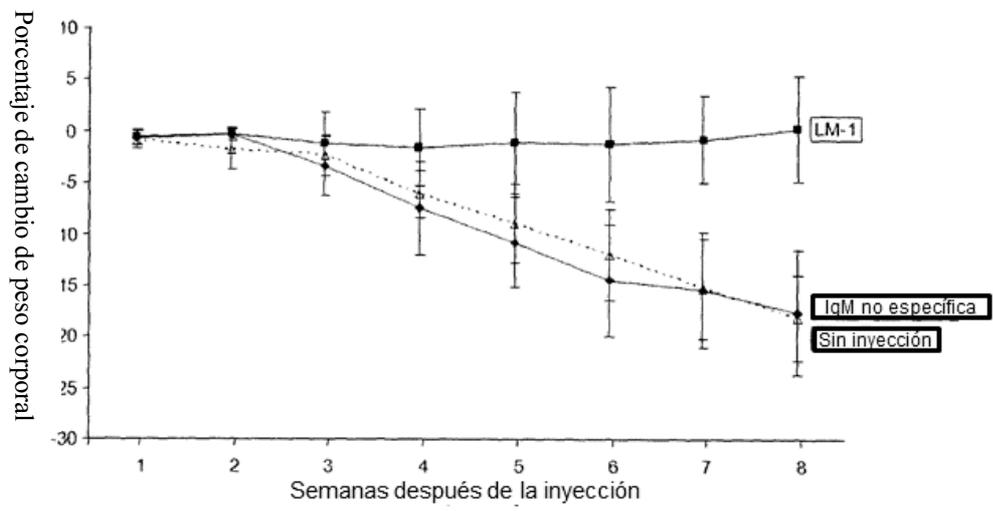


Figura 7

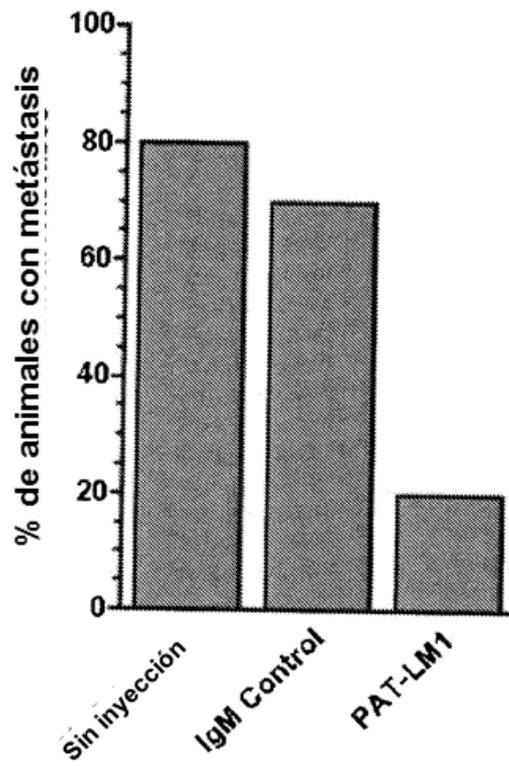
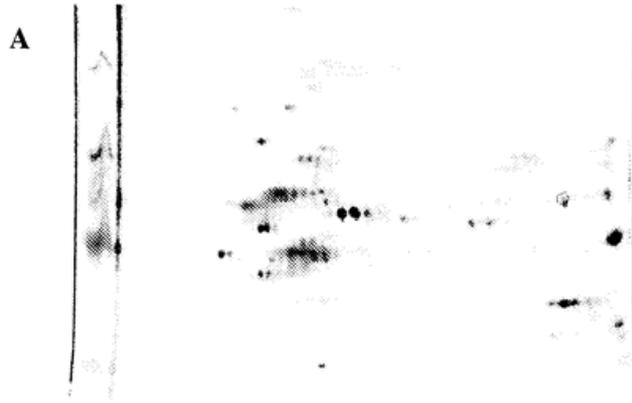


Figura 8



Gel teñido con plata

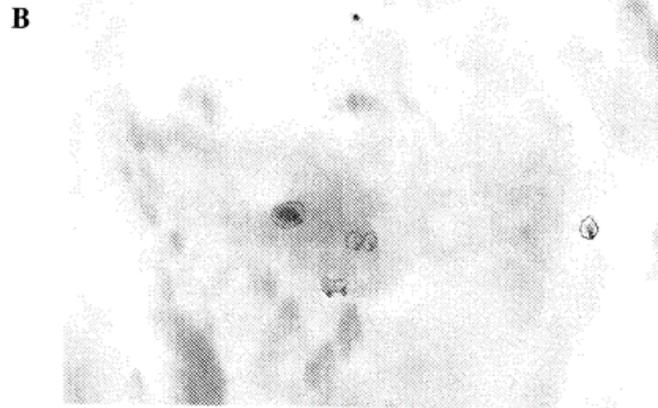


Figura 9

Purificación del antígeno LM-1

Ensayo n.º 12 : SEC de extracto de BPXC-3

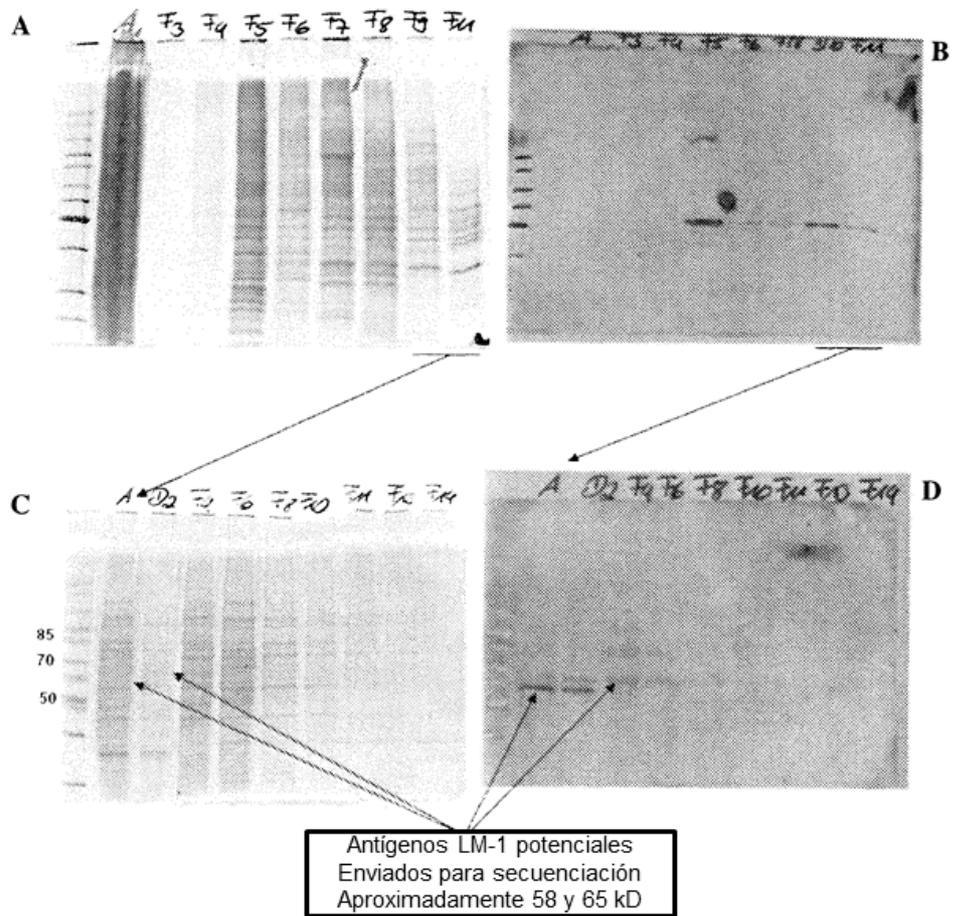


Figura 10

Lisado de células completas de BxPc transfectadas

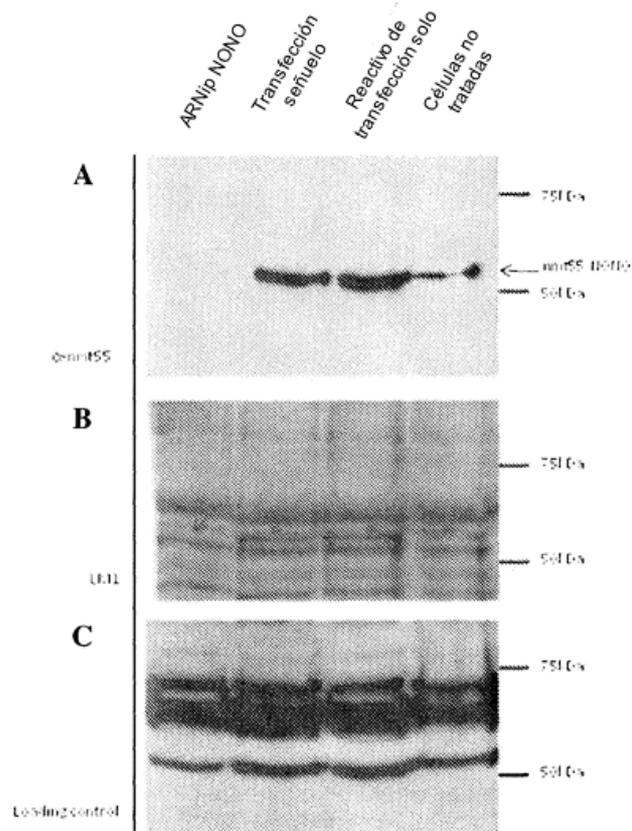


Figura 11

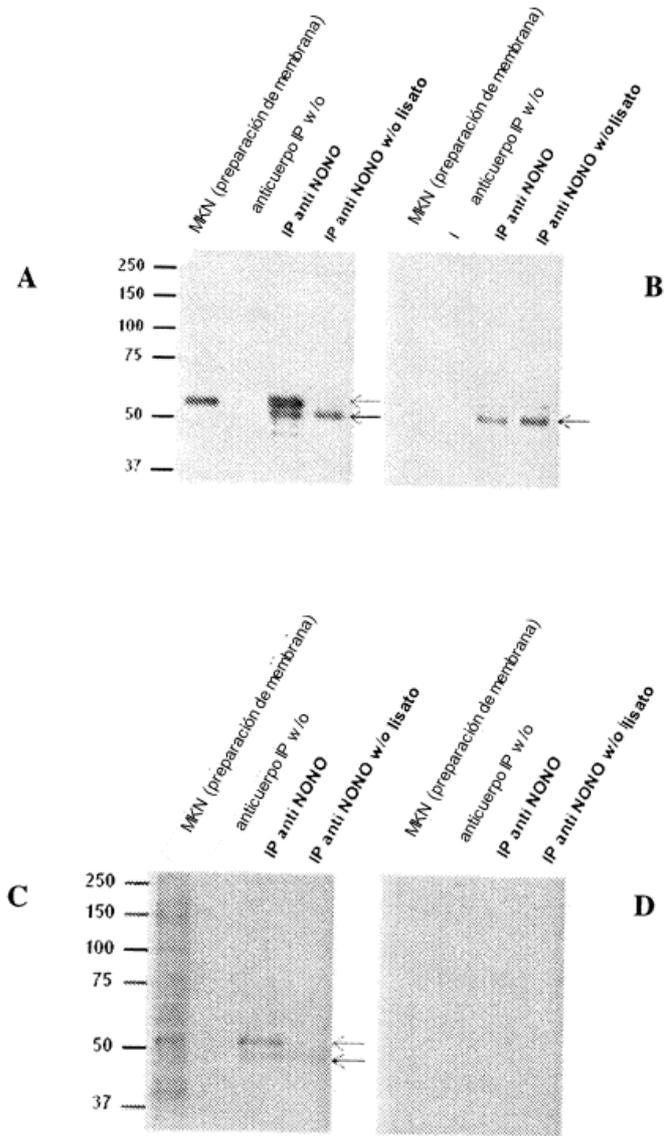


Figura 12

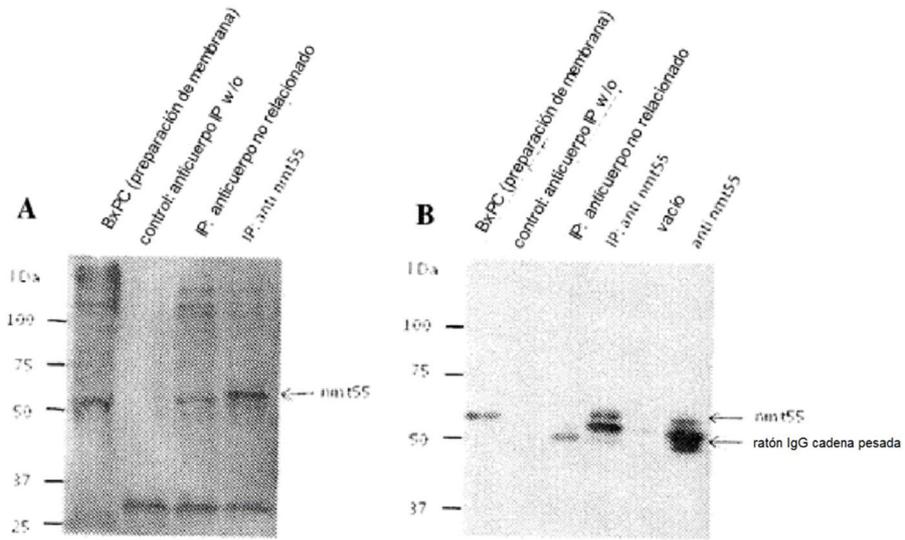


Figura 13

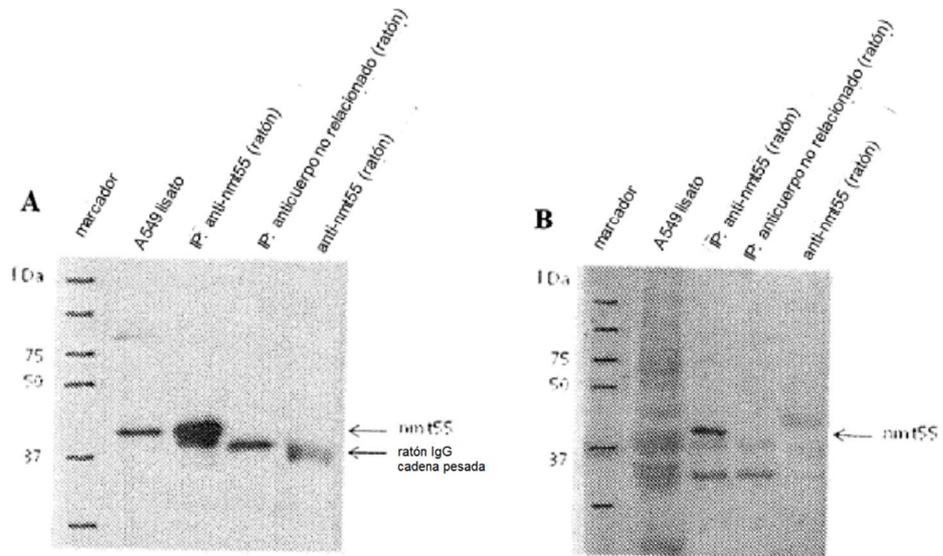


Figura 14

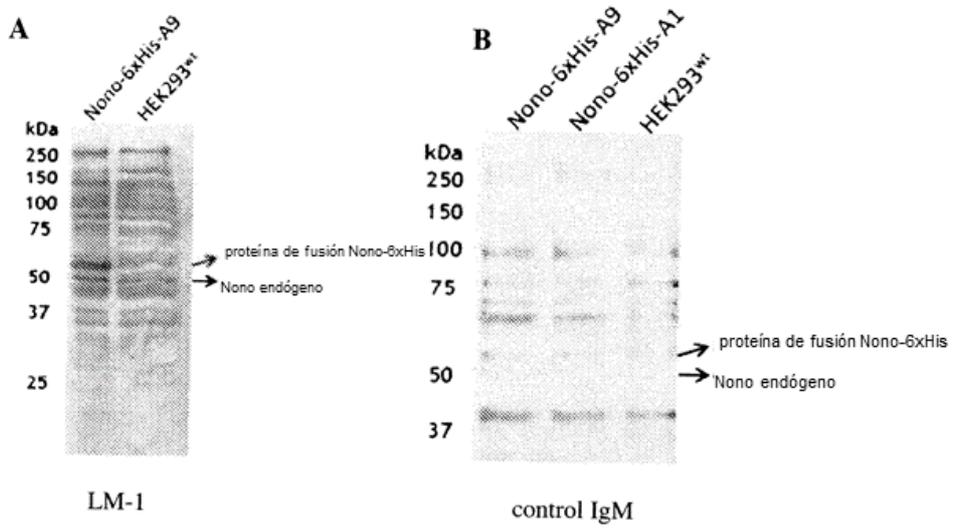


Figura 15

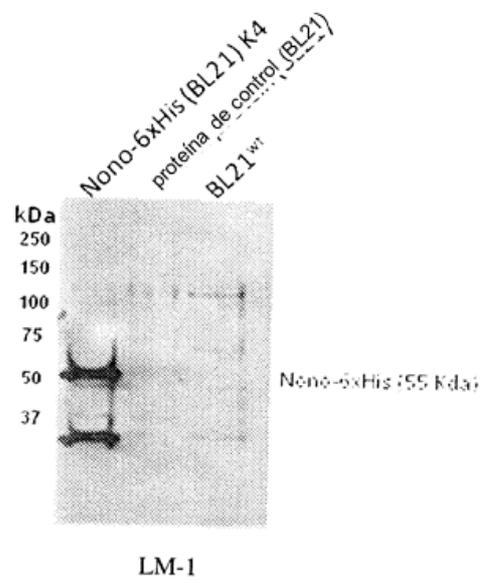


Figura 16

