

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 718**

51 Int. Cl.:

C07K 16/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.09.2009 PCT/EP2009/006704**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.03.2010 WO10031551**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.09.2009 E 09778564 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017 EP 2342234**

54 Título: **Anticuerpos anti-GT468 monoclonales para el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

16.09.2008 EP 08016277
16.09.2008 US 97453 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.03.2018

73 Titular/es:

GANYMED PHARMACEUTICALS GMBH (50.0%)
An der Goldgrube 12
55131 Mainz, DE y
JOHANNES GUTENBERG-UNIVERSITÄT MAINZ
(50.0%)

72 Inventor/es:

SAHIN, UGUR;
TÜRECI, ÖZLEM;
KOSLOWSKI, MICHAEL y
MITNACHT-KRAUS, RITA

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 659 718 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 anti-GT468 monoclonales para el tratamiento del cáncer

5 Las terapias contra el cáncer basadas en el cáncer se han introducido con éxito en la clínica y se han convertido en la terapéutica más prometedora en oncología en la última década.

10 Las terapias basadas en anticuerpos para el cáncer tienen el potencial de una mayor especificidad y un menor perfil de efectos secundarios en comparación con los medicamentos convencionales. La razón es una distinción precisa entre células normales y neoplásicas por anticuerpos y el hecho de que su modo de acción se basa en mecanismos antitumorales inmunológicos menos tóxicos, como la activación del complemento y el reclutamiento de células inmunitarias citotóxicas.

15 Los objetivos para las terapias basadas en anticuerpos deben tener cualidades particulares, que forman la base para la discriminación adecuada entre células normales y neoplásicas. Obviamente, un objetivo con restricción exclusiva a células tumorales y totalmente indetectable en tejidos normales es ideal para el desarrollo de agentes terapéuticos de anticuerpos eficientes y seguros. En otro aspecto, una sobreexpresión de alto nivel puede ser la base de la ventana terapéutica y los efectos secundarios bajos ejemplificados por el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2 (HER-2), que como resultado de la amplificación genética es un buen objetivo para el anticuerpo trastuzumab (Herceptina).

20 Otros objetivos para anticuerpos que ya están aprobados o en desarrollo clínico para terapia tumoral tienen cualidades distintas, que no se basan en una sobreexpresión numérica de moléculas objetivo en células tumorales. En el caso de anticuerpos para el proteoglicano MUC-I, un epítipo repetido de péptido en la cadena principal del objetivo está subglicosilado en células tumorales y, por lo tanto, alterado a su homólogo normal. En el caso de anticuerpos contra CD20 (rituximab), CD52 (Campath-1H) y CD22 (epratuzumab), los objetivos de anticuerpos tienen niveles de expresión comparables en células tumorales y linfocitos normales. Aquí, la ablación de células normales por el anticuerpo es tolerable ya que las células madre negativas objetivo restablecen el repertorio normal de linfocitos. Otros ejemplos de accesibilidad diferencial de los objetivos de anticuerpos son el antígeno carcinoembrionario (CEA) y la carboanhidrasa IX (CA9). Ambos antígenos se expresan en epitelios normales de colon y riñón, respectivamente. Sin embargo, los anticuerpos de imagen marcados radiactivamente distinguen bien entre el tumor y el tejido normal, y los anticuerpos citotóxicos son bien tolerados. Esto es muy probablemente debido a una expresión restringida de CA9 y CEA en el lado luminal del tejido epitelial normal donde los anticuerpos IgG no tienen acceso. También la molécula de adhesión de células epiteliales antigénicas (Ep-CAM) pertenece a esta categoría. Como una molécula de adhesión celular homotípica para células epiteliales se localiza en el espacio intercelular. Curiosamente, mientras que los anticuerpos anti-Ep-CAM de alta afinidad son muy tóxicos, los anticuerpos de afinidad intermedia son bien tolerados. Esto sugiere accesibilidad del objetivo Ep-CAM en células normales, pero también indica que la cinética de unión del anticuerpo puede abrir una ventana terapéutica.

40 Ocho anticuerpos han sido aprobados para el tratamiento de enfermedades neoplásicas, la mayoría de ellos, sin embargo, en el linfoma y la leucemia (Adams, G. P. y Weiner, L. M. (2005) Nat. Biotechnol. 23, 1147-1157). Solo tres mAbs, a saber, Herceptina, Avastina y Erbitux, abordan los tipos de cáncer sólido, que representan más del 90% de la mortalidad provocada por el cáncer. La sustancial necesidad médica restante, los beneficios mAb significativos aprobados clínicamente ya han proporcionado y su considerable éxito comercial en conjunto motivó una ola de enfoques innovadores que estaban preparados no solo para desarrollar terapias basadas en anticuerpos para grupos extendidos de pacientes sino también para mejorar su eficacia (Brekke, O.H. & Sandlie, I. (2003) Nat. Rev. Drug Discov. 52-62; Carter, P. (2001) Nat. Rev. Cancer 1, 118-129).

50 Uno de los desafíos a dominar para el advenimiento de la próxima generación de terapias contra el cáncer mejoradas basadas en anticuerpos es la selección de moléculas apropiadas objetivo, que es la clave para un perfil favorable de toxicidad/eficacia.

55 Los anticuerpos actuales disponibles para el tratamiento de cánceres sólidos debido a la expresión de sus objetivos en tejidos normales no explotan suficientemente los modos acumulativos de poder de acción incorporados en moléculas de anticuerpos. Her2/neu, por ejemplo, el objetivo de Herceptina, se expresa en muchos tejidos humanos normales, incluido el músculo cardíaco (Crone, S.A., Zhao, Y.Y., Fan, L., Gu, Y., Minamisawa, S., Liu, Y., Peterson, K.L., Chen, J., Kahn, R., Condorelli, G. et al. (2002) Nat. Med. 8, 459-465). Como consecuencia, la Herceptina se diseñó con una potencia inmunológica reducida y no se puede administrar a la dosis efectiva máxima, debido a toxicidad por lo demás inaceptable. Este "desafilado de un cuchillo potencialmente afilado" limita la eficacia terapéutica de la Herceptina.

60 Además de la falta de expresión en tejidos normales pertinentes para la toxicidad, la expresión alta y robusta en la superficie de las células tumorales y la exhibición de una función promotora del tumor son características deseables para un objetivo de anticuerpo ideal (Houshmand, P. & Zlotnik, A. (2003) Curr. Opin. Cell Biol. 15, 640-644).

65 Utilizando un enfoque integrado de minería de datos y validación experimental para el descubrimiento de nuevos objetivos para la terapia de anticuerpos contra el cáncer, identificamos GT468 de acuerdo con la SEQ ID No: 2. GT468, también conocido como Específica Placenta 1 (PLAC1), es un gen específico de la placenta que con frecuencia se activa y expresa

de manera aberrante en una variedad de tipos de tumores, en particular cáncer de mama. El silenciamiento de GT468 mediado por ARNi en células de cáncer de mama MCF-7 y BT-549 afecta profundamente a la motilidad, la migración y la invasión e induce un bloqueo del ciclo celular G1/S con abrogación casi completa de la proliferación. La atenuación de GT468 se asocia con disminución de la expresión de ciclina D1 y reducción de la fosforilación de AKT quinasa. Además, GT468 se localiza en la superficie de las células cancerosas y es accesible para los anticuerpos que antagonizan las funciones biológicas de esta molécula. Koslowski et al. 2007 (Cancer Res. 67: 9528-9534) han descrito recientemente un antisuero de conejo policlonal generado contra los residuos de aminoácidos 117 a 127 de PLAC1. Se demostró que este antisuero experimental inhibe la proliferación de células de cáncer de mama MCF-7 y BT-549 in vitro.

El GT468 tiene diversas propiedades que lo convierten en un objetivo altamente atractivo para anticuerpos terapéuticos. Siendo un antígeno de diferenciación de un linaje celular que aparece en el cuerpo humano solo en un estado tan excepcional como el embarazo, está tan ausente de los tejidos sanos relevantes para la toxicidad como puede ser un autoantígeno. Su alta prevalencia en una variedad de entidades tumorales haría que un gran número de pacientes fuera elegible para el tratamiento con terapias dirigidas a GT468. En el caso del cáncer de mama, por ejemplo, el 82% de los pacientes tienen este objetivo. Her2/neu, por el contrario, el objetivo de Herceptina, el único mAb disponible para el tratamiento de este tipo de cáncer, se sobreexpresa en solo 20-25% de los pacientes con cáncer de mama (Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J., Ullrich, A. et al. (1989) Science 244, 707-712). Para el cáncer de pulmón y para el cáncer gástrico, en el que GT468 se expresa en el 42 y el 58% de los casos, respectivamente, hasta ahora no hay un tratamiento de mAb aprobado debido a la falta de objetivos apropiados en estos tipos de cáncer.

GT468 es regulable por anticuerpos en células vivas y tales anticuerpos pueden precipitar efectos antitumorales tales como la inhibición de la proliferación. GT468 está involucrado no solo en la proliferación, sino también en la movilidad celular, la migración y la invasión. Lo más interesante es que todos estos atributos no solo contribuyen sustancialmente al fenotipo tumoral, sino que también son propiedades inherentes del trofoblasto humano, cuyas características fisiológicas deben crecer rápidamente e invadir eficazmente el tejido del útero. Se espera que se puedan diseñar mAbs contra GT468, que intervienen con todas estas funciones a la vez, además de su potencial para mediar funciones efectoras inmunes como ADCC y CDC.

Resumen

El alcance de la presente invención está definido por las reivindicaciones. Cualquier información que no se encuentre dentro de las reivindicaciones se brinda solo a título informativo. La presente invención proporciona en general anticuerpos útiles como agentes terapéuticos para tratar y/o prevenir enfermedades asociadas con células que expresan GT468 y/o se caracterizan por asociación de GT468 con su superficie celular, incluyendo enfermedades relacionadas con tumores tales como cáncer, en particular cáncer de mama, pulmón cáncer, cáncer gástrico, cáncer de ovario, cáncer hepatocelular, cáncer de colon, cáncer de páncreas, cáncer de esófago, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, en particular carcinoma de células renales, cáncer de próstata, cáncer de hígado, melanoma, sarcoma, mieloma, neuroblastoma, coriocarcinoma placentario, cáncer de cuello uterino y cáncer de tiroides, y sus formas metastásicas. En una realización, la enfermedad del cáncer es cáncer metastásico en el pulmón.

En un aspecto, las actuales enseñanzas se refieren a un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a GT468. Los anticuerpos descritos en este documento preferiblemente son anticuerpos monoclonales aislados que se unen específicamente a un epítipo presente en GT468, preferiblemente un epítipo localizado dentro del dominio extracelular de GT468, más preferiblemente SEQ ID No: 3-10 y 35-82. Preferiblemente, el anticuerpo tiene la capacidad de unirse a GT468 localizado en la superficie celular y preferiblemente se une a uno o más epítopos localizados dentro del dominio extracelular de GT468, preferiblemente dentro de los residuos de aminoácidos 23-212 de GT468, y lo más preferiblemente se une a un epítipo localizado dentro de una de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID Nos: 3-10 y 35-82. En una realización preferida, el anticuerpo es específico para una o más de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID No: 3-10 y 35-82. En diversas realizaciones, el anticuerpo tiene la capacidad de unirse a un péptido que comprende los aminoácidos 29 a 119, preferiblemente los aminoácidos 29 a 212 y más preferiblemente los aminoácidos 23 a 212 de la SEQ ID No: 2.

Los anticuerpos monoclonales abarcados por la presente invención incluyen anticuerpos IgA, IgG1-4, IgE, IgM e IgD. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1, más particularmente un isotipo IgG1, kappa o IgG1, lambda. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgG3, más particularmente un isotipo lambda IgG3, kappa o IgG3. En otra realización más, el anticuerpo es un anticuerpo IgG4, más particularmente un isotipo lambda IgG4, kappa o IgG4. En otra realización más, el anticuerpo es un anticuerpo IgA1 o IgA2. En otra realización más, el anticuerpo es un anticuerpo IgM.

En una realización, el anticuerpo de la invención se une a uno o más de los péptidos de acuerdo con las SEQ ID Nos: 75-79. En una realización, el anticuerpo se une al péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 75 y/o el péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 76, más preferiblemente se une al péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 75 y el péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 76. En otra realización, el anticuerpo se une al péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 77 y/o el péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 78 y/o el péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 79, más preferiblemente se une al péptido de acuerdo con SEQ ID No: 78 y el péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 79 o se une al péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 77, el péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 78 y el péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 79.

5 En una realización, el anticuerpo de las enseñanzas se obtiene utilizando el péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 4 o el péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 80 para inmunización. En otra realización, el anticuerpo de la invención se obtiene utilizando el péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 6 o el péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 81 para inmunización. Preferiblemente, el anticuerpo de la invención se une a uno o más de dichos péptidos.

10 En una realización adicional, el anticuerpo que se une al péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 75 y/o el péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 76, se une más preferiblemente al péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 75 y el péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 76 se obtiene utilizando el péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 4 o el péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 80 para inmunización. En otra realización, el anticuerpo que se une al péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 77 y/o el péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 78 y/o el péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 79, se une más preferiblemente al péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 78 y el péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 79 o se une al péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 77, se obtiene el péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 78 y el péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 79 utilizando el péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 6 o el péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 81 para inmunización.

20 En una realización, el anticuerpo de la invención se une a uno o más de los péptidos de acuerdo con las SEQ ID No: 61-66. En una realización, el anticuerpo se une al péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 61 y/o el péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 62, más preferiblemente se une al péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 61 y el péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 62. En otra realización, el anticuerpo se une al péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 64 y/o el péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 65, más preferiblemente se une al péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 64 y el péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 65. En otra realización, el anticuerpo se une al péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 65 y/o el péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 66, más preferiblemente se une al péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 65 y el péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 66.

25 En una realización, el anticuerpo de la invención se obtiene utilizando el péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 82 para inmunización. Preferiblemente, el anticuerpo de la invención se une a dicho péptido. El péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 82 tiene un enlazador GS C-terminal que se ha agregado para ayudar en la formación de un enlace disulfuro entre los aminoácidos 1 y 16 del péptido. Este péptido presumiblemente se parece a la conformación nativa de GT468. Los anticuerpos producidos por el hibridoma 51-1A-1 que se ha obtenido utilizando el péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 82 para inmunización mostraron una fuerte actividad inhibidora sobre la proliferación y formación de colonias de células cancerosas que expresan GT468.

30 En una realización adicional, el anticuerpo que se une al péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 64 y/o el péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 65, se une más preferiblemente al péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 64 y el péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 65 o el anticuerpo que se une al péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 65 y/o el péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 66, más preferiblemente se une al péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 65 y el péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 66 se obtiene utilizando el péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 82 para inmunización.

35 En una realización, el anticuerpo de las actuales enseñanzas se une a uno o más de los péptidos de acuerdo con las SEQ ID No: 57-60. En una realización, el anticuerpo se une al péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 57 y/o el péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 58 y/o el péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 59, más preferiblemente se une al péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 57 y el péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 58 y el péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 59. En otra realización, el anticuerpo se une al péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 59 y/o el péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 60, más preferiblemente se une al péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 59 y el péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 60.

40 Preferiblemente, el anticuerpo de las actuales enseñanzas se une a células cancerosas, en particular células de los tipos de cáncer mencionados aquí y, preferiblemente, no se une sustancialmente a células no cancerosas, más preferiblemente no se une sustancialmente a células no cancerosas distintas de las células placentarias, y células testiculares. Preferiblemente, la unión de dicho anticuerpo a células que expresan GT468 y/o se caracterizan por asociación de GT468 con su superficie celular tal como células cancerígenas media la muerte de dichas células y/o inhibe una o más actividades de tales células tales como motilidad, migración, invasión, proliferación y/o formación de colonias. Preferiblemente, el anticuerpo inhibe la proliferación y/o la formación de colonias de dichas células.

45 La eliminación de las células y/o la inhibición de una o más actividades de las células, en particular la proliferación celular y la formación de colonias, mediante el anticuerpo de la invención se inducen preferiblemente mediante la unión del anticuerpo a GT468 expresado por dichas células y/o asociado con la superficie celular de dichas células. Tal eliminación de células y/o inhibición de una o más actividades de células se puede utilizar terapéuticamente como se describe en este documento. En particular, la muerte de células y/o la inhibición de la proliferación de células y/o la inhibición de la formación de colonias de células se pueden utilizar para tratar o prevenir el cáncer, incluida la metástasis del cáncer. La inhibición de la motilidad, migración, invasión, proliferación y/o formación de colonias de células puede utilizarse, en particular, para tratar o prevenir la metástasis del cáncer y la diseminación metastásica de células cancerosas.

50 Las células que expresan GT468 y/o se caracterizan por asociación de GT468 con su superficie celular son preferiblemente células cancerosas y, en particular, se seleccionan del grupo que consiste en células cancerígenas

tumorigénicas de las siguientes enfermedades cancerosas: cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de ovario, cáncer hepatocelular, cáncer de colon, cáncer de páncreas, cáncer de esófago, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, en particular carcinoma de células renales, cáncer de próstata, cáncer de hígado, melanoma, sarcoma, mieloma, neuroblastoma, coriocarcinoma placentario, cáncer de cuello uterino y cáncer de tiroides, y las formas metastásicas de los mismos. En una realización, la enfermedad del cáncer es cáncer metastásico en el pulmón.

El anticuerpo de las actuales enseñanzas se puede unir a una o más fracciones efectoras terapéuticas, por ejemplo, radiomarcadores, citotoxinas, enzimas terapéuticas, agentes que inducen apoptosis y similares para proporcionar citotoxicidad dirigida, es decir, eliminación de células tumorales.

Preferiblemente, el anticuerpo de las actuales enseñanzas media la muerte de células induciendo citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), lisis mediada por anticuerpos, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), apoptosis, adhesión homotípica y/o fagocitosis, preferiblemente induciendo lisis mediada por CDC y/o lisis mediada por ADCC. Sin embargo, la presente invención también incluye realizaciones en las que el anticuerpo ejerce su actividad como se describe en el presente documento tal como la muerte de células y/o la inhibición de una o más actividades de células, por ejemplo, proliferación celular y/o formación de colonias, sin inducir lisis mediada por citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), lisis mediada por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), apoptosis, adhesión homotípica y/o fagocitosis. Por ejemplo, el anticuerpo de las actuales enseñanzas también puede ejercer un efecto simplemente uniéndose a GT468 en la superficie celular, por lo tanto, por ejemplo, bloqueando la proliferación de las células. En una realización, el anticuerpo de las actuales enseñanzas no induce la lisis de células mediada por CDC.

Preferiblemente, la lisis de células mediada por ADCC tiene lugar en presencia de células efectoras, que en realizaciones particulares se seleccionan del grupo que consiste en monocitos, células mononucleares, células NK y PMN, y la fagocitosis es por macrófagos.

En una realización particularmente preferida, el anticuerpo de la invención tiene la actividad de inhibir o reducir la proliferación de células que expresan GT468 y/o se caracteriza por asociación de GT468 con su superficie celular, preferiblemente células cancerosas tales como células de cáncer de mama. Esta actividad puede medirse in vitro al determinar la proliferación de células cancerosas que expresan GT468 en un ensayo que usa bromodesoxiuridina (5-bromo-2-desoxiuridina, BrdU). BrdU es un nucleósido sintético que es un análogo de la timidina y puede incorporarse al ADN recién sintetizado de células replicantes (durante la fase S del ciclo celular), sustituyendo a la timidina durante la replicación del ADN. La detección de la sustancia química incorporada utilizando, por ejemplo, anticuerpos específicos para BrdU indica células que estaban replicando activamente su ADN. Las líneas celulares BT-549, Caov-3, EFO-21, SK-BR-3, MCF-7, MDA-MB-468 y MDA-MB-231 se pueden utilizar como células cancerosas que expresan GT468. En una realización preferida, el anticuerpo de la invención inhibe o reduce la proliferación de una o más de las líneas celulares SK-BR-3, MCF-7 y MDA-MB-468, preferiblemente inhibe o reduce la proliferación de ambas líneas celulares SK-BR-3 y MCF-7, y lo más preferiblemente inhibe o reduce la proliferación de todas las líneas celulares SK-BR-3, MCF-7 y MDA-MB-468. Los anticuerpos preferidos de la invención a este respecto se seleccionan del grupo que consiste en (i) anticuerpos producidos por y/u obtenibles a partir de los hibridomas 35-48B-1, 35-50A-2a, 38-10B-1, 38-1A-1, 45-2A-1, 45-8A-2, 48-3B-1, 48-4A-1, 49-3A-1, 51-1A-1, 53-13A-2, 53-29-A1, 56-4A-2, 62-9B-1, 78H11 1H6 y 44-3A-2, (ii) anticuerpos que son formas quimerizadas o humanizadas de los anticuerpos en (i) y (iii) anticuerpos que tienen la especificidad de los anticuerpos en (i) y, en particular, anticuerpos que comprenden la porción de unión a antígeno o el sitio de unión a antígeno, en particular la región variable, de los anticuerpos en (i). Los anticuerpos particularmente preferidos de la invención a este respecto se seleccionan del grupo que consiste en (i) anticuerpos producidos por y/u obtenibles a partir de los hibridomas 35-48B-1, 48-3B-1, 51-1A-1 y 56-4A-2, (ii) anticuerpos que son formas quimerizadas o humanizadas de los anticuerpos en (i) y (iii) anticuerpos que tienen la especificidad de los anticuerpos en (i) y, en particular, anticuerpos que comprenden la porción de unión al antígeno o el antígeno sitio de unión, en particular la región variable, de los anticuerpos en (i).

En una realización particularmente preferida, el anticuerpo de las enseñanzas tiene la actividad de inhibir o reducir la formación de colonias de células que expresan GT468 y/o que se caracteriza por asociación de GT468 con su superficie celular, preferiblemente células cancerosas tales como células de cáncer de mama. Esta actividad puede medirse in vitro en un ensayo clonogénico. Las líneas celulares BT-549, Caov-3, EFO-21, SK-BR-3, MCF-7, MDA-MB-468 y MDA-MB-231 se pueden utilizar como células cancerosas que expresan GT468. Un ensayo clonogénico es una técnica de microbiología para estudiar la efectividad de agentes específicos en la supervivencia y proliferación de las células. se utiliza con frecuencia en los laboratorios de investigación del cáncer para determinar el efecto de los fármacos o la radiación sobre las células tumorales en proliferación. El experimento implica tres pasos principales: (i) aplicar un tratamiento a una muestra de células, en particular células cancerosas, (ii) plaquear las células en un recipiente de cultivo tisular y (iii) permitir que las células crezcan. Las colonias producidas son fijas, teñidas y contadas. La formación de colonias es importante con respecto a la formación de metástasis si las células tumorales individuales colonizan los órganos. La actividad inhibidora de los anticuerpos indica su potencial para suprimir la formación de metástasis. Los anticuerpos que tienen la actividad de inhibir o reducir la formación de colonias en un ensayo clonogénico son particularmente útiles para tratar o prevenir la metástasis y la diseminación metastásica de células cancerosas, en particular de los tipos de cáncer mencionados aquí. Los anticuerpos preferidos de la invención a este respecto se seleccionan del grupo que consiste en (i) anticuerpos producidos por y/u obtenibles a partir de los hibridomas 51G6 2H3

2B4, 78H11 1H6, 16-5B-1, 22-1A-1, 29-8B-1 y 51-1A-1, (ii) anticuerpos que son formas quimerizadas o humanizadas de los anticuerpos en (i) y (iii) anticuerpos que tienen la especificidad de los anticuerpos en (i) y, en particular, anticuerpos que comprenden la porción de unión al antígeno o el sitio de unión al antígeno, en particular la región variable, de los anticuerpos en (i). Los anticuerpos particularmente preferidos de la invención a este respecto se seleccionan del grupo que consiste en (i) anticuerpos producidos por y/o obtenibles a partir de los hibridomas 51G6 2H3 2B4, 29-8B-1 y 51-1A-1, (ii) anticuerpos que son formas quimerizadas o humanizadas de los anticuerpos en (i) y (iii) anticuerpos que tienen la especificidad de los anticuerpos en (i) y, en particular, anticuerpos que comprenden la porción de unión al antígeno o sitio de unión al antígeno, en particular la región variable, de los anticuerpos en (i).

En una realización particularmente preferida, el anticuerpo de la invención tiene la actividad de inhibir o reducir la proliferación de células que expresan GT468 y/o que se caracteriza por asociación de GT468 con su superficie celular como se explicó anteriormente y tiene la actividad de inhibir o reducir la formación de colonias de células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular como se explicó anteriormente. Los anticuerpos preferidos de la invención a este respecto se seleccionan del grupo que consiste en (i) anticuerpos producidos por y/o que pueden obtenerse a partir del hibridoma 51-1A-1, (ii) anticuerpos que son formas quiméricas o humanizadas de los anticuerpos en (i), y (iii) anticuerpos que tienen la especificidad de los anticuerpos en (i) y, en particular, anticuerpos que comprenden la porción de unión a antígeno o sitio de unión a antígeno, en particular la región variable, de los anticuerpos en (i).

En una realización, las actuales enseñanzas se refieren a anticuerpos que (i) se unen a células que expresan GT468 y/o se caracterizan por asociación de GT468 con su superficie celular, y (ii) no se unen a células que no expresan GT468 y/o no se caracterizan por asociación de GT468 con su superficie celular. Los anticuerpos preferiblemente (i) median la muerte y/o inhiben la proliferación de células que expresan GT468 y/o se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular, y (ii) no intervienen en la muerte y/o no inhiben la proliferación de células que no expresan GT468 y/o que no se caracterizan por asociación de GT468 con su superficie celular.

El anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo monoclonal, quimérico, humano o humanizado, o un fragmento de un anticuerpo y se puede seleccionar del grupo que consiste en una IgG1, una IgG2, preferiblemente IgG2a e IgG2b, una IgG3, una IgG4, una IgM, una IgA1, una IgA2, una IgA secretora, una IgD y un anticuerpo IgE.

Los anticuerpos de la invención incluyen anticuerpos completamente humanos. Dichos anticuerpos pueden producirse en un animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico, capaz de producir múltiples isotipos de anticuerpos monoclonales humanos para GT468 experimentando recombinación V-D-J y cambio de isotipo. Tal animal transgénico también puede ser un conejo transgénico para producir anticuerpos policlonales tal como se divulga en el documento US 2003/0017534.

La unión de un anticuerpo de la invención al antígeno GT468 puede mediar en la muerte de células que expresan GT468 y/o que se caracteriza por asociación de GT468 con su superficie celular (por ejemplo, una célula tumoral), por ejemplo, mediante la activación del sistema del complemento, y/o puede inhibir la proliferación de células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular (por ejemplo, una célula tumoral). Alternativamente o además de mediar en la muerte de células que expresan GT468 y/o que se caracteriza por la asociación de GT468 con su superficie celular y/o inhibir la proliferación de células que expresan GT468 y/o que se caracteriza por asociación de GT468 con su superficie celular, unión de un anticuerpo de la invención al antígeno GT468 puede inhibir la motilidad, migración, formación de colonias y/o invasión de células que expresan GT468 y/o que se caracteriza por asociación de GT468 con su superficie celular (por ejemplo, una célula tumoral) y, por lo tanto, puede inhibir la propagación metastásica de células tumorales. La muerte de células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por asociación de GT468 con su superficie celular puede producirse por uno o más de los siguientes mecanismos: citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) de células que expresan GT468 y/o caracterizadas por asociación de GT468 con su superficie celular; apoptosis de células que expresan GT468 y/o se caracterizan por asociación de GT468 con su superficie celular; fagocitosis de células efectoras de células que expresan GT468 y/o caracterizadas por asociación de GT468 con su superficie celular; o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo de célula efectora (ADCC) de células que expresan GT468 y/o caracterizadas por asociación de GT468 con su superficie celular.

De acuerdo con todos los aspectos de las actuales enseñanzas, GT468 es preferiblemente GT468 humano, que preferiblemente tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID No: 2, más preferiblemente que tiene la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID No: 2, en particular que tiene la secuencia de aminoácidos que abarca desde los aminoácidos 23 a 212 de SEQ ID No: 2.

En realizaciones preferidas particulares, el anticuerpo de las enseñanzas se une a epítomos nativos de GT468 presentes en la superficie de células vivas tales como las de SEQ ID No: 3-10 y 35-82. En realizaciones preferidas adicionales, el anticuerpo de las enseñanzas es específico para células cancerosas, preferiblemente células de cáncer de mama. Preferiblemente, el anticuerpo de la invención es específico para células cancerosas que expresan GT468 tales como las líneas celulares BT-549, Caov-3, EFO-21, SK-BR-3, MCF-7, MDA-MB-468 y MDA-MB-231 y no se une a las células cancerosas que no expresan GT468, como las células de cáncer gástrico NUG-C4.

En ciertas realizaciones de la invención, GT468 se expresa y/o se asocia con la superficie de las células.

Los anticuerpos descritos aquí se pueden obtener mediante un método que comprende la etapa de inmunizar un animal con una proteína o péptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID No: 2-10 y 35-82, o un fragmento inmunogénico o su derivado, o un ácido nucleico o célula anfitriona que expresa dicha proteína o péptido, o fragmento inmunogénico o derivado del mismo. Preferiblemente, un anticuerpo de las enseñanzas es específico para las proteínas, péptidos o fragmentos inmunogénicos o derivados anteriormente mencionados de los mismos. En el contexto de una proteína o péptido utilizado en la inmunización, un derivado se refiere a una variante de dicha proteína o péptido que tiene las mismas propiedades inmunogénicas que la proteína o péptido del que se deriva. En particular, la derivada de una proteína o péptido cuando se utiliza en la inmunización para la producción de anticuerpos, en particular anticuerpos monoclonales, proporciona anticuerpos que tienen la misma especificidad que los anticuerpos obtenidos cuando se utiliza la proteína o el péptido en la inmunización. Por ejemplo, tal derivado puede incluir la eliminación, sustitución o adición de uno o más aminoácidos. En particular, puede incluir la adición de uno o más aminoácidos tales como cisteína en el extremo N o el extremo C o ambos.

En una realización particularmente preferida, el anticuerpo de la invención se produce mediante un clon que tiene el número de acceso. DSM ACC2822 (4E9-1H9), DSM ACC2826 (9B6-2A9), DSM ACC2824 (59D6-2F2), DSM ACC2825 (61C11-2B5), DSM ACC2823 (78H11-1H6), DSM ACC2895 (22-1A-1), DSM ACC2893 (22-2A-1), DSM ACC2896 (22-9B-1), DSM ACC2897 (23-33A-1), DSM ACC2891 (23-19A-1), DSM ACC2894 (F11#33F7D12), DSM ACC2892 (4A12 2D4 1A10), DSM ACC2898 (4E9 1D12 2D4), DSM ACC2961 (42H11 1C11 2B2), DSM ACC2962 (51G6 2H3 2B4), DSM ACC2943 (16-5B-1), DSM ACC2956 (20-11A-1), DSM ACC2947 (29-1A-2), DSM ACC2964 (29-8B-1), DSM ACC2959 (35-48B-1), DSM ACC2963 (35-50A-2a), DSM ACC2957 (38-10B-1), DSM ACC2958 (38-1A-1), DSM ACC2948 (44-3A-2), DSM ACC2949 (45-2A-1), DSM ACC2950 (45-8A-2), DSM ACC2951 (48-3B-1), DSM ACC2952 (48-4A-1), DSM ACC2946 (49-3A-1), DSM ACC2945 (49-8A-1), DSM ACC2944 (51-1A-1), DSM ACC2953 (53-13A-2), DSM ACC2955 (53-29A-1), DSM ACC2960 (54-4B-2), DSM ACC2954 (56-4A-2) o DSM ACC3001 (62-9B-1).

En una realización, el anticuerpo descrito aquí se acopla a un agente terapéutico tal como una toxina, un radioisótopo, un fármaco o un agente citotóxico.

En un aspecto adicional, las actuales enseñanzas se refieren a un hibridoma capaz de producir el anticuerpo de la invención. Los hibridomas preferidos son aquellos que tienen el número de acceso. DSM ACC2822 (4E9-1H9), DSM ACC2826 (9B6-2A9), DSM ACC2824 (59D6-2F2), DSM ACC2825 (61C11-2B5), DSM ACC2823 (78H11-1H6), DSM ACC2895 (22-1A-1), DSM ACC2893 (22-2A-1), DSM ACC2896 (22-9B-1) 5 DSM ACC2897 (23-33A-1), DSM ACC2891 (23-19A-1), DSM ACC2894 (F11 # 33F7D12), DSM ACC2892 (4A12 2D4 1A10), DSM ACC2898 (4E9 1D12 2D4), DSM ACC2961 (42H11 1C11 2B2), DSM ACC2962 (51G6 2H3 2B4), DSM ACC2943 (16-5B-1), DSM ACC2956 (20-1 1A-1), DSM ACC2947 (29-1A-2), DSM ACC2964 (29-8B-1), DSM ACC2959 (35-48B-1), DSM ACC2963 (35-50A-2a), DSM ACC2957 (38-10B-1), DSM ACC2958 (38-1A-1), DSM ACC2948 (44-3A-2), DSM ACC2949 (45-2A-1), DSM ACC2950 (45-8A-2), DSM ACC2951 (48-3B-1), DSM ACC2952 (48-4A-1), DSM ACC2946 (49-3A-1), DSM ACC2945 (49-8A-1), DSM ACC2944 (51-1A-1), DSM ACC2953 (53-13A-2), DSM ACC2955 (53-29A-1), DSM ACC2960 (54-4B-2), DSM ACC2954 (56-4A-2) o DSM ACC3001 (62-9B-1).

Los anticuerpos de la invención se designan aquí haciendo referencia a la designación del anticuerpo y/o haciendo referencia al clon que produce el anticuerpo, por ejemplo, 4E9-1H9.

Preferiblemente, los anticuerpos de la invención tienen la capacidad de discriminar variantes de GT468 expresadas por diferentes tipos de células que incluyen células cancerosas y células no malignas.

Los anticuerpos de la invención preferiblemente intervienen en la muerte de células que expresan GT468 y/o se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular uniéndose a GT468. Preferiblemente GT468 se expresa en la superficie de dichas células. En una realización, los anticuerpos de la invención inducen citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), por ejemplo, por lo menos aproximadamente 20-40% de lisis mediada por CDC, preferiblemente aproximadamente 40-50% de lisis mediada por CDC, y más preferiblemente más de 50% de lisis mediada por CDC de células que expresan GT468 y/o caracterizadas por asociación de GT468 con su superficie celular. Alternativamente o además de inducir CDC, los anticuerpos de la invención pueden inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de células que expresan GT468 y/o que se caracteriza por asociación de GT468 con su superficie celular en presencia de células efectoras (por ejemplo, monocitos, mononucleares células, células NK y PMN). Los anticuerpos de la invención pueden tener la capacidad de inducir apoptosis de células que expresan GT468 y/o que se caracteriza por asociación de GT468 con su superficie celular, inducir la adhesión homotípica de células que expresan GT468 y/o que se caracteriza por asociación de GT468 con su superficie celular y/o inducen fagocitosis de células que expresan GT468 y/o se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular en presencia de macrófagos. Los anticuerpos de la invención pueden tener una o más de las propiedades funcionales descritas anteriormente. Preferiblemente, los anticuerpos de la invención inducen lisis mediada por CDC y lisis mediada por ADCC de células que expresan GT468 y/o se caracterizan por asociación de GT468 con su superficie celular y más preferiblemente inducen lisis mediada por ADCC de células que expresan GT468 y/o se caracterizan por asociación de GT468 con su superficie celular mientras que no inducen la lisis mediada por CDC de dichas células. Las células objetivo de ejemplo para los anticuerpos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, células cancerosas que expresan GT468 y/o se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular. En una realización preferida particular, la muerte de células mediadas por anticuerpos

de las actuales enseñanzas es específica de GT468, es decir, los anticuerpos de las enseñanzas median la muerte, preferiblemente lisis mediada por CDC y/o ADCC, de células que expresan GT468 y/o se caracterizan por asociación de GT468 con su superficie celular, pero no intervienen en la muerte de células que no expresan GT468 y/o no se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular. Los anticuerpos descritos anteriormente se pueden utilizar para mediar la muerte de células tumorales en el tratamiento o prevención del cáncer como cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de ovario, cáncer hepatocelular, cáncer de colon, cáncer de páncreas, cáncer de esófago y cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, en particular carcinoma de células renales, cáncer de próstata, cáncer de hígado, melanoma, sarcoma, mieloma, neuroblastoma, coriocarcinoma placentario, cáncer de cuello uterino y cáncer de tiroides, y sus formas metastásicas. En una realización, la enfermedad del cáncer es cáncer metastásico en el pulmón.

Los anticuerpos de las enseñanzas se pueden derivar de diferentes especies, que incluyen, pero no se limitan a, ratón, rata, conejo, cobaya y ser humano. Los anticuerpos de las enseñanzas también incluyen moléculas quiméricas en las que una región constante de anticuerpo derivada de una especie, preferiblemente humana, se combina con el sitio de unión a antígeno derivado de otra especie. Además, los anticuerpos de la invención incluyen moléculas humanizadas en las que se combinan los sitios de unión a antígeno de un anticuerpo derivado de una especie no humana con regiones constantes y estructurales de origen humano.

Los anticuerpos de las enseñanzas incluyen anticuerpos policlonales y monoclonales e incluyen IgG2a (por ejemplo, IgG2a, K, λ), IgG2b (por ejemplo, IgG2b, K, λ), IgG3 (por ejemplo, IgG3, K, λ) y anticuerpos IgM. Sin embargo, las enseñanzas también abarcan otros isotipos de anticuerpos, que incluyen anticuerpos IgG1, IgA1, IgA2, IgA secretora, IgD e IgE. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos completos o fragmentos de unión a antígeno de estos que incluyen, por ejemplo, Fab, F(ab')₂, Fv, fragmentos de Fv de cadena sencilla o anticuerpos biespecíficos. Adicionalmente, los fragmentos de unión a antígeno incluyen proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión que comprenden (i) un polipéptido de dominio de unión (tal como una región variable de cadena pesada o una región variable de cadena ligera) que está fusionado a un polipéptido de región bisagra de inmunoglobulina, (ii) una región constante CH2 de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada a la región bisagra, y (iii) una región constante CH3 de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada a la región constante CH2. Dichas proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión se describen adicionalmente en los documentos US2003/0118592 y US 2003/0133939.

Los anticuerpos de las actuales enseñanzas preferiblemente se disocian de GT468 con una constante de equilibrio de disociación (K_D) de aproximadamente 1-100 nM o menos. Preferiblemente, los anticuerpos de las enseñanzas no reaccionan de forma cruzada con antígenos de superficie celular relacionados y, por lo tanto, no inhiben su función.

En realizaciones preferidas, los anticuerpos de las actuales enseñanzas se pueden caracterizar por una o más de las siguientes propiedades:

a) especificidad para GT468;

b) una afinidad de unión a GT468 de aproximadamente 100 nM o menos, preferiblemente, aproximadamente 5-10 nM o menos y, más preferiblemente, aproximadamente 1-3 nM o menos,

c) la capacidad de mediar un alto nivel de CDC en cualquiera de las células CD55/59 positivas o CD55/59 negativas;

d) la capacidad de inhibir el crecimiento de células que expresan GT468 y/o se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular;

e) la capacidad de inducir la apoptosis de células que expresan GT468 y/o se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular;

f) la capacidad de inducir la adhesión homotípica de células que expresan GT468 y/o se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular;

g) la capacidad de inducir ADCC de células que expresan GT468 y/o se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular en presencia de células efectoras;

h) la capacidad de prolongar la supervivencia de un sujeto que tiene células tumorales que expresan GT468 y/o se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular;

i) la capacidad de agotar las células que expresan GT468 y/o se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular;

j) la capacidad de reducir las células que expresan niveles bajos de GT468 y/o se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular y/o

k) la capacidad de agregar GT468 en la superficie de las células vivas

Los anticuerpos anti-GT468 descritos aquí se pueden derivatizar, unir o coexpresar a otras especificidades de unión. En una realización particular, las actuales enseñanzas proporcionan una molécula biespecífica o multiespecífica que comprende por lo menos una primera especificidad de unión para GT468 (por ejemplo, un anticuerpo anti-GT468 o mimético de la misma) y una segunda especificidad de unión para una célula efectora, tal como una especificidad de unión para un receptor de Fc (por ejemplo, un receptor de Fc-gamma, tal como Fc-gamma RI, o cualquier otro receptor de Fc) o un receptor de células T, por ejemplo, CD3.

De acuerdo con lo anterior, las actuales enseñanzas incluyen moléculas biespecíficas y multiespecíficas que se unen tanto a GT468 como a un receptor de Fc o un receptor de células T, por ejemplo, CD3. Los ejemplos de receptores de Fc son receptor de IgG, receptor de Fc-gamma (FcγR), tal como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16). Otros receptores de Fc, como los receptores de IgA (por ejemplo, FcαRI), también pueden ser dirigidos. El receptor de Fc está situado preferiblemente en la superficie de una célula efectora, por ejemplo, un monocito, macrófago o una célula mononuclear activada. En una realización preferida, las moléculas biespecíficas y multiespecíficas se unen a un receptor de Fc en un sitio que es distinto del sitio de unión del receptor a la inmunoglobulina Fc (por ejemplo, IgG o IgA). Por lo tanto, la unión de las moléculas biespecíficas y multiespecíficas no está bloqueada por niveles fisiológicos de inmunoglobulinas.

En otro aspecto más, los anticuerpos anti-GT468 descritos aquí se derivan, unen o coexpresan con otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, un fragmento Fab'). Por ejemplo, un anticuerpo de las enseñanzas puede estar funcionalmente unido (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) a una o más entidades moleculares diferentes, tales como otro anticuerpo (por ejemplo, para producir un anticuerpo biespecífico o multiespecífico), una citotoxina, ligando celular o antígeno (por ejemplo, para producir un inmunoconjugado, tal como una inmunotoxina). Un anticuerpo de las enseñanzas se puede unir a otras fracciones terapéuticas, por ejemplo, un radioisótopo, un fármaco anticancerígeno de molécula pequeña, una citocina recombinante o quimioquina. Por consiguiente, las actuales enseñanzas abarcan una gran variedad de conjugados de anticuerpos, moléculas biespecíficas y multiespecíficas, y proteínas de fusión, todas las cuales se unen a células que expresan GT468 y/o a células que se caracterizan por asociación de GT468 con su superficie celular y que se pueden utilizar para dirigir otras moléculas a tales células.

En general, para los fines de las actuales enseñanzas, todos los derivados de anticuerpos tales como conjugados de anticuerpos, moléculas biespecíficas y multiespecíficas, y proteínas de fusión descritas en este documento están abarcados por el término "anticuerpo".

En un aspecto adicional, las enseñanzas también prevén proteínas de unión a GT468 derivadas de dominios no inmunoglobulínicos, en particular proteínas monocatenarias. Tales proteínas de unión y métodos para su producción se describen, por ejemplo, en Binz et al. (2005) Nature Biotechnology 23 (10): 1257-1268. Debe entenderse que las enseñanzas dadas en el presente documento con respecto a las moléculas de unión derivadas de inmunoglobulina o inmunoglobulina se aplican correspondientemente también a moléculas de unión derivadas de dominios que no son inmunoglobulinas. En particular, utilizando tales moléculas de unión derivadas de dominios no inmunoglobulínicos es posible bloquear GT468 de células que expresan dicho objetivo y/o que se caracteriza por la asociación de dicha objetivo con su superficie celular y de esta manera, producir efectos terapéuticos como se describe aquí para anticuerpos de las enseñanzas, en particular la inhibición de una o más actividades de células tumorales como se describe en el presente documento, tal como proliferación. Aunque no es obligatorio, es posible conferir funciones efectoras de anticuerpos a tales moléculas que no se unen a inmunoglobulinas por ej. fusión a la región Fc de anticuerpos.

Las actuales enseñanzas generalmente abarcan el tratamiento y/o diagnóstico de enfermedades, en particular enfermedades tumorales, dirigiendo GT468 expresado por células y/o estando asociado con la superficie de células. Estos métodos proporcionan la detección selectiva y/o la erradicación de tales células minimizando de este modo los efectos adversos a las células normales que no expresan GT468 y/o que no se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular. Las enfermedades preferidas para una terapia o diagnóstico son aquellas en las que están implicadas células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por asociación de GT468 con su superficie celular tales como enfermedades tumorales, en particular enfermedades de cáncer tales como las descritas en este documento.

En un aspecto, las enseñanzas proporcionan composiciones, por ejemplo, composiciones/kits farmacéuticos y de diagnóstico, que comprenden un anticuerpo o una combinación de anticuerpos de la invención. Una composición farmacéutica puede comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable y opcionalmente puede comprender uno o más adyuvantes, estabilizantes, etc. En una realización particular, la composición incluye una combinación de anticuerpos que se unen a epítopos distintos o que poseen características funcionales distintas, tales como inducir CDC y/o ADCC e inducir apoptosis. En esta realización, los anticuerpos se pueden utilizar en combinación, por ejemplo, como una composición farmacéutica que comprende dos o más anticuerpos monoclonales anti-GT468. Por ejemplo, los anticuerpos anti-GT468 que tienen actividades diferentes pero complementarias se pueden combinar en una sola terapia para lograr un efecto terapéutico deseado. En una realización preferida, la composición incluye un anticuerpo anti-GT468 que media CDC combinado con otro anticuerpo anti-GT468 que induce la apoptosis. En otra realización, la composición incluye un anticuerpo anti-GT468 que interviene en la muerte altamente eficaz de células objetivo en presencia de células efectoras, combinado con otro anticuerpo anti-GT468 que inhibe el crecimiento de células que expresan GT468 y/o se caracteriza por asociación de células. GT468 con su superficie celular.

5 Las actuales enseñanzas también incluyen la administración simultánea o secuencial de dos o más anticuerpos anti-GT468 de la invención, en el que preferiblemente por lo menos uno de dichos anticuerpos es un anticuerpo quimérico anti-GT468 y por lo menos otro anticuerpo es un anticuerpo anti-GT468 humano, los anticuerpos que se unen a los mismos o diferentes epítomos de GT468. Preferiblemente, se administra primero un anticuerpo GT468 quimérico de las enseñanzas seguido de la administración de un anticuerpo anti-GT468 humano de las enseñanzas, en el que el anticuerpo anti-GT468 humano se administra preferiblemente durante un período de tiempo prolongado, es decir, como terapia de mantenimiento.

10 Los anticuerpos, conjugados, moléculas biespecíficas/multiespecíficas y composiciones de las actuales enseñanzas se pueden utilizar en una variedad de métodos para inhibir el crecimiento de células que expresan GT468 y/o que se caracteriza por asociación de GT468 con su superficie celular y/o matar selectivamente células que expresan GT468 y/o se caracteriza por la asociación de GT468 con su superficie celular al poner en contacto las células con una cantidad eficaz del anticuerpo, conjugado, molécula o composición biespecífica/multiespecífica, de modo que se inhibe el crecimiento de la célula y/o se mata la célula. En una realización, el método incluye matar la célula que expresa GT468 y/o se caracteriza por la asociación de GT468 con su superficie celular, opcionalmente en presencia de células efectoras, por ejemplo, por CDC, apoptosis, ADCC, fagocitosis, o por una combinación de dos o más de estos mecanismos. Las células que expresan GT468 y/o se caracterizan por asociación de GT468 con su superficie celular que se puede inhibir o eliminar utilizando los anticuerpos de las enseñanzas incluyen células cancerosas.

20 Los anticuerpos, conjugados y moléculas y composiciones biespecíficas/multiespecíficas de las actuales enseñanzas se pueden utilizar para tratar y/o prevenir una diversidad de enfermedades que implican células que expresan GT468 y/o se caracterizan por asociación de GT468 con su superficie celular administrando los anticuerpos a pacientes que sufren de tales enfermedades. Las enfermedades a modo de ejemplo que se pueden tratar (por ejemplo, mejorar) o prevenir incluyen, pero no se limitan a, enfermedades tumorigénicas. Ejemplos de enfermedades tumorigénicas, que pueden tratarse y/o prevenirse, incluyen enfermedades cancerosas tales como cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de ovario, cáncer hepatocelular, cáncer de colon, cáncer de páncreas, cáncer de esófago, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, en particular carcinoma de células renales, cáncer de próstata, cáncer de hígado, melanoma, sarcoma, mieloma, neuroblastoma, coriocarcinoma placentario, cáncer de cuello uterino y cáncer de tiroides, y sus formas metastásicas. En una realización, la enfermedad del cáncer es cáncer metastásico en el pulmón.

30 En un aspecto, las enseñanzas se refiere a un método para inhibir una o más actividades seleccionadas de motilidad, migración, invasión, crecimiento (proliferación) y formación de colonias, preferiblemente crecimiento y/o formación de colonias de una célula que expresa GT468 y/o caracterizada por asociación de GT468 con su superficie celular, que comprende poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de un anticuerpo, conjugado, molécula biespecífica/multiespecífica o composición de la enseñanza. GT468 se expresa preferiblemente en la superficie de dicha célula.

40 En un aspecto adicional, las enseñanzas se refieren a un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno que implica células que expresan GT468 y/o se caracteriza por asociación de GT468 con su superficie celular que comprende administrar a un sujeto un anticuerpo, conjugado, molécula biespecífica/multiespecífica o composición de las enseñanzas. Preferiblemente la enfermedad o trastorno es una enfermedad relacionada con tumores y en realizaciones particulares se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de ovario, cáncer hepatocelular, cáncer de colon, cáncer de páncreas, cáncer de esófago, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, en particular carcinoma de células renales, cáncer de próstata, cáncer de hígado, melanoma, sarcoma, mieloma, neuroblastoma, coriocarcinoma placentario, cáncer de cuello uterino y cáncer de tiroides, y las formas metastásicas de los mismos. En una realización, la enfermedad del cáncer es cáncer metastásico en el pulmón. GT468 se expresa preferentemente en la superficie de dichas células.

50 Las enseñanzas pueden implicar el uso de los agentes y composiciones descritos en este documento para un tratamiento profiláctico y/o terapéutico de enfermedades tumorales, es decir, para tratar a un paciente que tiene una enfermedad tumoral o que está en riesgo de desarrollar una enfermedad tumoral. En un aspecto, las enseñanzas proporcionan métodos para inhibir el crecimiento tumoral que comprende la administración de uno o más de los agentes y composiciones descritos en este documento.

55 Preferiblemente, los agentes y composiciones descritos en este documento se administran de manera que la sustancia terapéuticamente activa no se administra o no se administra sustancialmente a un tejido u órgano donde las células cuando el tejido u órgano está libre de tumores expresan sustancialmente GT468 y/o caracterizado por la expresión de GT468 con su superficie celular tal como tejido de placenta y/o tejido de testículo. Para este fin, los agentes y composiciones descritos en este documento pueden administrarse localmente.

60 En un aspecto, las enseñanzas proporcionan un anticuerpo como se describe en el presente documento para uso en los métodos de tratamiento descritos en este documento. En una realización, las enseñanzas proporcionan una composición farmacéutica como se describe en el presente documento para uso en los métodos de tratamiento descritos en este documento.

- 5 En una realización particular de las enseñanzas, el sujeto que se administra el anticuerpo se trata adicionalmente con un agente quimioterapéutico, radiación o un agente que modula, por ejemplo, potencia o inhibe, la expresión o actividad de un receptor de Fc, por ejemplo, un receptor Fc-gamma, tal como una citocina. Las citoquinas típicas para la administración durante el tratamiento incluyen factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), interferón- γ (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral (TNF). Los agentes terapéuticos típicos incluyen, entre otros, agentes antineoplásicos tales como doxorubicina, cisplatino, taxotere, 5- fluoruracilo, metotrexato, gemcitabina y ciclofosfamida.
- 10 En otro aspecto más, las enseñanzas se refieren a una estrategia de inmunización para inmunizar animales no humanos tales como ratones con GT468 humano o un fragmento de péptido de este para obtener anticuerpos. Los péptidos preferidos para inmunización son aquellos seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID No: 2-10 y 35-82, o derivados de los mismos. De acuerdo con lo anterior, en realizaciones preferidas, los anticuerpos de las enseñanzas son los obtenidos por inmunización utilizando péptidos seleccionados del grupo que consiste en las SEQ ID No: 2-10 y 35-82, o derivados de las mismas. Análogamente, los anticuerpos contra GT468 pueden generarse en un animal transgénico no humano, tal como un ratón transgénico. El animal transgénico no humano puede ser un ratón transgénico que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada y un transgén de cadena ligera que codifica todo o una porción de un anticuerpo.
- 20 Se pueden inmunizar animales de tipo silvestre, así como animales no humanos transgénicos con una preparación purificada o enriquecida de antígeno GT468 y/o ácidos nucleicos y/o células que expresan GT468 o un fragmento peptídico de los mismos. Preferiblemente, el animal no humano es capaz de producir múltiples isotipos de anticuerpos monoclonales humanos para GT468 (por ejemplo, IgG, IgA y/o IgM) sometiéndose a recombinación V-D-J y cambio de isotipo. La conmutación de isotipo puede producirse, por ejemplo, mediante el cambio de isotipo clásico o no clásico.
- 25 De acuerdo con lo anterior, en otro aspecto más, las enseñanzas proporcionan células B aisladas de un animal no humano como se describió anteriormente. Las células B aisladas pueden immortalizarse entonces por fusión a una célula inmortalizada para proporcionar una fuente (por ejemplo, un hibridoma) de anticuerpos de las enseñanzas. Dichos hibridomas (es decir, que producen anticuerpos de las enseñanzas) también se incluyen dentro del alcance de la invención.
- 30 En un aspecto adicional, las actuales enseñanzas se refieren a métodos para el diagnóstico, detección o monitorización de una enfermedad tumoral que comprende la detección y/o determinación de la cantidad de GT468 o células que expresan GT468 y/o se caracterizan por la asociación de GT468 con su célula superficie en una muestra biológica aislada de un paciente utilizando un anticuerpo de las enseñanzas. La muestra biológica puede aislarse de un paciente que tenga una enfermedad tumoral, que se sospeche que tiene o caiga enfermo con una enfermedad tumoral o que tenga un potencial para una enfermedad tumoral.
- 35 En una realización del método para el diagnóstico, detección o monitorización de una enfermedad tumoral de acuerdo con las enseñanzas, una muestra biológica y/o una muestra de control/referencia procede de un tejido u órgano correspondiente al tejido u órgano que se va a diagnosticar, detectado o monitoreado con respecto a la afección por una enfermedad tumoral; por ejemplo, la enfermedad tumoral que debe diagnosticarse, detectarse o controlarse es el cáncer de mama y la muestra biológica y/o la muestra de control/referencia es tejido mamario. Dichos tejidos y órganos se describen en el presente documento, por ejemplo, en relación con diferentes enfermedades tumorales y cánceres.
- 40 En una realización de los métodos para diagnóstico, detección o monitorización de una enfermedad tumoral, la muestra biológica procede de un tejido u órgano en el que las células cuando el tejido u órgano están libres de tumores no expresan sustancialmente GT468 y/o no están caracterizadas por asociación sustancial de GT468 con su superficie celular. Preferiblemente, dicho tejido es un tejido diferente al tejido de placenta o tejido de testículo.
- 45 Típicamente, el nivel de una molécula objetivo en una muestra biológica se compara con un nivel de referencia, en el que una desviación de dicho nivel de referencia es indicadora de la presencia y/o etapa de una enfermedad tumoral en un sujeto. El nivel de referencia puede ser un nivel determinado en una muestra de control (por ejemplo, de un tejido o sujeto sano) o un nivel medio de sujetos sanos. Una "desviación" de dicho nivel de referencia designa cualquier cambio significativo, tal como un aumento o disminución en por lo menos 10%, 20% o 30%, preferiblemente en por lo menos 40% o 50%, o incluso más. Preferiblemente, la presencia de GT468 o células que expresan GT468 y/o se caracterizan por asociación de GT468 con su superficie celular en dicha muestra biológica o una cantidad de GT468 o células que expresan GT468 y/o se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular en la muestra biológica que se incrementa en comparación con un nivel de referencia indica la presencia de una enfermedad tumoral.
- 50 Típicamente, la detección y/o determinación de la cantidad en los métodos de las enseñanzas implican el uso de anticuerpos marcados que se unen específicamente a una molécula objetivo.
- 60 En un aspecto particular, las enseñanzas se refieren a un método para la detección, es decir, la determinación de la posición o sitio, de una enfermedad tumoral, por ejemplo, un tejido u órgano particular, que comprende administrar un anticuerpo de las actuales enseñanzas que está acoplado a un marcador detectable a un paciente. El marcaje de un tejido u órgano en dicho paciente puede indicar la presencia o el riesgo de una enfermedad tumoral en dicho tejido u órgano.
- 65

- Como se ejemplifica aquí, los anticuerpos de las enseñanzas se pueden obtener directamente de hibridomas que expresan el anticuerpo, o se pueden clonar y expresar de forma recombinante en una célula anfitriona (por ejemplo, una célula CHO o una célula linfocítica). Otros ejemplos de células anfitrionas son microorganismos, tales como E. coli, y hongos, tales como levadura. Alternativamente, pueden producirse de forma recombinante en un animal o planta transgénica no humana. Sin embargo, las actuales enseñanzas también prevén realizaciones en las que los anticuerpos se producen mediante inmunización o vacunación utilizando estrategias de inmunización como se describe aquí in situ en un paciente.
- Las células de hibridoma preferidas para producir anticuerpos de las enseñanzas son las depositadas en DSMZ (Inhoffenstr. 7B, 38124 Braunschweig, Alemania) con las siguientes designaciones y números de acceso:
1. 4E9-1H9, número de acceso DSM ACC2822, depositado el 13 de marzo, 2007
 2. 9B6-2A9, número de acceso DSM ACC2826, depositado el 13 de marzo, 2007
 3. 59D6-2F2, número de acceso DSM ACC2824, depositado el 13 de marzo, 2007
 4. 61C11-2B5, número de acceso DSM ACC2825, depositado el 13 de marzo, 2007
 5. 78H11-1H6, número de acceso DSM ACC2823, depositado el 13 de marzo de 2007
 6. 22-1A-1, número de acceso DSM ACC2895, depositado el 11 de marzo, 2008
 7. 22-2A-1, número de acceso DSM ACC2893, depositado el 11 de marzo, 2008
 8. 22-9B-1, número de acceso DSM ACC2896, depositado el 11 de marzo, 2008
 9. 23-33A-1, número de acceso DSM ACC2897, depositado el 11 de marzo, 2008
 10. 23-19A-1, número de acceso DSM ACC2891, depositado el 11 de marzo de 2008
 11. F11#33F7D12, número de acceso DSM ACC2894, depositado el 11 de marzo, 2008
 12. 4A12 2D4 1A10, número de acceso DSM ACC2892, depositado el 11 de marzo, 2008
 13. 4E9 1D12 2D4, número de acceso DSM ACC2898, depositado el 11 de marzo, 2008
 14. 42 H11 1C11 2B2, número de acceso DSM ACC2961, depositado el 1 de septiembre, 2008
 15. 51G6 2H3 2B4, número de acceso DSM ACC2962, depositado el 1 de septiembre de 2008
 16. 16-5B-1, número de acceso DSM ACC2943, depositado el 1 de septiembre, 2008
 17. 20-11A-1, número de acceso DSM ACC2956, depositado el 1 de septiembre, 2008
 18. 29-1A-2, número de acceso DSM ACC2947, depositado el 1 de septiembre, 2008
 19. 29-8B-1, número de acceso DSM ACC2964, depositado el 2 de septiembre, 2008
 20. 35-48B-1, número de acceso DSM ACC2959, depositado el 1 de septiembre de 2008
 21. 35-50A-2a, número de acceso DSM ACC2963, depositado el 1 de septiembre, 2008
 22. 38-10B-1, número de acceso DSM ACC2957, depositado el 1 de septiembre, 2008
 23. 38-1A-1, número de acceso DSM ACC2958, depositado el 1 de septiembre, 2008
 24. 44-3A-2, número de acceso DSM ACC2948, depositado el 1 de septiembre, 2008
 25. 45-2A-1, número de acceso DSM ACC2949, depositado el 1 de septiembre de 2008
 26. 45-8A-2, número de acceso DSM ACC2950, depositado el 1 de septiembre, 2008
 27. 48-3B-1, número de acceso DSM ACC2951, depositado el 1 de septiembre, 2008

28. 48-4A-1, acceso no. DSM ACC2952, depositado el 1 de septiembre, 2008
29. 49-3A-1, número de acceso DSM ACC2946, depositado el 1 de septiembre, 2008
- 5 30. 49-8A-1, número de acceso DSM ACC2945, depositado el 1 de septiembre de 2008
31. 51-1A-1, número de acceso DSM ACC2944, depositado el 1 de septiembre, 2008
32. 53-13A-2, número de acceso DSM ACC2953, depositado el 1 de septiembre, 2008
- 10 33. 53-29A-15 número de acceso DSM ACC2955, depositado el 1 de septiembre, 2008
34. 54-4B-2, número de acceso DSM ACC2960, depositado el 1 de septiembre de 2008
- 15 35. 56-4A-2, número de acceso DSM ACC2954, depositado el 1 de septiembre, 2008
36. 62-9B-1, número de acceso DSM ACC3001, depositado el 16 de julio, 2009

20 Los anticuerpos preferidos de las enseñanzas son aquellos producidos por y obtenibles a partir de los hibridomas descritos anteriormente y las formas quimerizadas y humanizadas de los mismos. Otros anticuerpos preferidos de las enseñanzas son aquellos que tienen la especificidad de los anticuerpos producidos por, y obtenibles a partir de los hibridomas descritos anteriormente y, en particular, los que comprenden la porción de unión a antígeno o sitio de unión a antígeno, en particular la región variable, de los anticuerpos producidos mediante y obtenible a partir de los hibridomas descritos anteriormente.

25 En realizaciones preferidas, los anticuerpos, en particular las formas quimerizadas de anticuerpos de acuerdo con las enseñanzas incluyen anticuerpos que comprenden una región constante de cadena pesada (CH) que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de una región constante de cadena pesada humana tal como la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No: 17 o 24 o un fragmento de este. En otras realizaciones preferidas, los anticuerpos, en particular las formas quimerizadas de anticuerpos de acuerdo con las enseñanzas incluyen anticuerpos que comprenden una región constante de cadena ligera (CL) que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de una región constante de cadena ligera humana tal como la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No: 18 o 22 o un fragmento de este. En una realización preferida particular, los anticuerpos, en particular las formas quimerizadas de anticuerpos de acuerdo con las enseñanzas incluyen anticuerpos que comprenden un CH que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de un CH humano tal como la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No: 17 o 24 o un fragmento del mismo y que comprende un CL que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de una CL humana tal como la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID No: 18 o 22 o un fragmento de la misma.

40 Un CH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No: 17 puede estar codificado por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID No: 20. Un CH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No: 24 puede estar codificado por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID No: 23. Una CL que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID No: 18 puede estar codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID No: 19. Una CL que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID No: 22 puede estar codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID No: 21.

50 "Fragmento" o "fragmento de una secuencia de aminoácidos" como se utiliza anteriormente se refiere a una parte de una secuencia de anticuerpo, es decir, una secuencia que representa la secuencia de anticuerpo acortada en el extremo N y/o C, que cuando reemplaza dicho anticuerpo la secuencia en un anticuerpo retiene la unión de dicho anticuerpo a GT468 y preferiblemente funciones de dicho anticuerpo como se describe aquí, por ejemplo, lisis mediada por CDC o lisis mediada por ADCC. Preferiblemente, un fragmento de una secuencia de aminoácidos comprende por lo menos 80%, preferiblemente por lo menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de los residuos de aminoácidos de dicha secuencia de aminoácidos. Los fragmentos de las secuencias de aminoácidos descritas en este documento pueden estar codificados por fragmentos respectivos de secuencias de ácido nucleico que codifican dichas secuencias de aminoácidos.

60 Las actuales enseñanzas también se refieren a ácidos nucleicos que comprenden genes o secuencias de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o partes de estos, por ejemplo, una cadena de anticuerpo, como se describe en este documento. Los ácidos nucleicos pueden estar comprendidos en un vector, por ejemplo, Un plásmido, cósmido, virus, bacteriófago u otro vector utilizado, por ejemplo, convencionalmente en ingeniería genética. El vector puede comprender otros genes tales como genes marcadores que permiten la selección del vector en una célula anfitriona adecuada y en condiciones adecuadas. Además, el vector puede comprender elementos de control de la expresión que permiten la expresión adecuada de las regiones de codificación en anfitriones adecuados. Dichos elementos de control son conocidos por el técnico y pueden incluir un promotor, un casete de empalme y un codón de iniciación de la traducción.

Preferiblemente, el ácido nucleico de las enseñanzas se une operativamente a las secuencias de control de la expresión anteriores permitiendo la expresión en células eucarióticas o procarióticas. Los elementos de control que aseguran la expresión en células eucarióticas o procarióticas son bien conocidos por los expertos en la técnica.

5 Los métodos para la construcción de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con las actuales enseñanzas, para la construcción de vectores que comprenden las moléculas de ácido nucleico anteriores, para la introducción de los vectores en células anfitrionas elegidas apropiadamente, para provocar o lograr la expresión son bien conocidos en la técnica.

10 Un aspecto adicional de las actuales enseñanzas se refiere a una célula anfitriona que comprende un ácido nucleico o vector como se divulga en este documento.

Otras características y ventajas de las actuales enseñanzas serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y reivindicaciones.

15 Breve descripción de los dibujos

Figura 1. GT468 es un marcador de linaje trofoblástico activado de forma aberrante en células cancerosas. (A) RT-PCR de 35 ciclos de punto final en tejidos normales, muestras primarias de cáncer de mama y líneas celulares de cáncer (1, MCF-7; 2, MDA-MB-435S; 3, BT-549; 4, MDA-MB-231; 5, SNU-16; 6, LCLC-103H; 7, KYSE-510; 8, KYSE-30; 9, EFO-27; 20 10, TOV-21G; 11, TOV-112D; 12, CAOv-3; 13, EFO-21; 14, FU-OV-I; 15, LNCAP; 16, CAPAN-2). (B) RT-PCR cuantitativa de 40 ciclos en tiempo real en tejidos normales (1, Testículo; 2, Placenta; 3, Cerebro; 4, Pulmón; 5, Pecho; 6, Colon; 7, Hígado; 8, Estómago; 9, Riñón; 10, próstata; 11, páncreas; 12, ovario; 13, bazo; 14, piel; 15, miocardio; 16, endometrio; 17, PBMC de rest.; 18, prolif. de PBMC; 19, glándula suprarrenal), muestras primarias de cáncer de mama y (C) líneas celulares de cáncer. (D) Análisis cuantitativo en tiempo real de RT-PCR del silenciamiento de GT468 mediado por siARN en células de cáncer de mama MCF-7 y BT-549. (E) Análisis de transferencia de Western de la disminución mediada por siARN de la expresión de la proteína GT468. Las células de control no se trataron o transfectaron con un dúplex no silenciado codificado (ns-siARN). (F) Análisis de transferencia Western de los niveles de proteína GT468 en tejidos humanos normales y neoplásicos. (G) Inmunohistoquímica de secciones derivadas del tejido mamario humano normal (izquierda) y cáncer de mama (derecha) utilizando un anticuerpo específico GT468.

30 Figura 2. GT468 es una proteína asociada a la superficie celular. (A) Tinción de células de cáncer de mama MCF-7 y BT-549 fijadas en metanol y (B) no fijadas con anticuerpo anti-GT468/C-terminal después de la transfección con siARN específico de GT468 (siARN#1) o siARN no silenciador (ns-siARN).

35 Figura 3. La expresión de GT468 promueve la motilidad, la migración y la invasión de las células de cáncer de mama. (A) El análisis de quimioquinesis (motilidad) en ensayos de migración de Transwell con FCS al 5% añadido a la cámara superior y la cámara inferior se analizó después de 12 h. (B) Análisis de quimiotaxis de las células MCF-7 y BT-549 en ensayos de migración de Transwell 12 h después de 5% de FCS se han agregado a la cámara inferior solo para obtener un gradiente. (C) Análisis de la invasión quimiotáctica en Matrigel 24 h después de que se haya agregado 5% FCS como quimioatrayente a la cámara inferior.

40 Figura 4. La expresión de GT468 promueve la proliferación de células de cáncer de mama. (A) El análisis de la proliferación en células MCF-7 y BT-549 72 h después de atenuación ha sido iniciado por dúplex de siARN específicos de GT468. (B) El análisis del ciclo celular de las células 72 h después del inicio del silenciamiento de GT468 se muestra como un gráfico de barras de las fracciones celulares en diferentes estados del ciclo celular. (C) Apoptosis de células según se determina por tinción con anexina V 72 h después de la transfección con siARN. Como control positivo para las células de tinción de Anexina V se trataron con Camptotecina 6 μ M durante 12 h.

50 Figura 5. GT468 es susceptible de ser convertido en fármaco por anticuerpos que antagonizan la función. Análisis de proliferación de células MCF-7 y BT-549 después de la incubación con diferentes cantidades de anticuerpo anti-GT468 y anticuerpo de control (control de isotipo) durante 48 h.

Figura 6. Ciclina D1 y AKT quinasa están involucradas en la función GT468. (A) Análisis cuantitativo en tiempo real de RT-PCR y (B) análisis de western blot de ciclina D1 después de que las células se trataron durante 72 h con dúplex de siARN específico de GT468. Análisis Western blot de la fosforilación de AKT Ser473 después de (C) 72 h de atenuación de GT468 y después de (D) 1 h de tratamiento con anticuerpo anti-GT468/C-terminal.

60 Figura 7. ELISA de péptidos para determinar la especificidad de los anticuerpos generados contra GT468 en sobrenadantes de hibridoma. Los sobrenadantes de hibridoma solo son reactivos con los péptidos utilizados para la inmunización.

Figura 8. Tinción de células CHO transfectadas con una construcción GT468-eGFP por sobrenadantes de hibridoma que contienen anticuerpos producidos contra GT468. Los sobrenadantes de hibridoma tiñen específicamente las células que expresan GT468-eGFP.

65

Figura 9. GT468 es susceptible de ser convertido en fármaco por anticuerpos monoclonales que antagonizan la función. Análisis de proliferación de diferentes líneas celulares de cáncer después de la incubación con sobrenadantes de hibridoma durante 72 h.

5 Figura 10. Crudo-lisado (CrELISA) (A) o péptido específico ELISA (B) para determinar la especificidad de los anticuerpos generados contra GT468 en sobrenadantes de hibridoma. Los sobrenadantes de hibridoma solo son reactivos con el lisado GT468 (A) o el péptido respectivo usado para la inmunización (B).

10 Figura 11. Análisis de citometría de flujo para determinar la especificidad de los anticuerpos contra GT468 en sobrenadantes de hibridoma. Todos los sobrenadantes de hibridoma mostraron tinción específica de células transfectadas con GT468, mientras que no se observó tinción en células transfectadas simuladas.

15 Figura 12. Se realiza Western blot para determinar la especificidad de los anticuerpos generados contra GT468 en sobrenadantes de hibridoma. Todos los sobrenadantes de hibridoma mostraron reactividad específica con lisados de células HEK293 transfectadas con plásmido de expresión pcADN3.1 GT468, mientras que los lisados de células transfectadas simuladas no mostraron señal. La señal tenue del sobrenadante de hibridoma 23-33A-1 en el lisado simulado se debe al desbordamiento del lisado HEK GT468.

20 Figura 13. ELISA de péptidos para identificar epítomos de unión a anticuerpos en la proteína GT468. Los sobrenadantes de hibridoma 22-1A-1, 23-33A-1 y 23-19A-1 muestran cada uno unión a dos péptidos de sobreposición que implican reactividad a un epítipo lineal de GT468. Los patrones de unión de 22-2A-1 y 22-9B-1 implican reactividad a un epítipo conformacional (epítipo discontinuo) de la proteína GT468.

25 Figura 14. GT468 es susceptible de ser convertido en fármaco por anticuerpos monoclonales que antagonizan la función. Análisis de proliferación de diferentes líneas de células cancerosas después de la incubación con sobrenadantes de hibridoma purificado durante 72 h o 12 horas.

30 Figura 15. Análisis de citometría de flujo para determinar la especificidad de los anticuerpos producidos contra GT468 en sobrenadantes de hibridoma. Los sobrenadantes de hibridoma mostraron tinción específica de células transfectadas con GT468aa 116-212, mientras que no se observó tinción en células transfectadas simuladas.

35 Figura 16A,B. Análisis de citometría de flujo para determinar la unión específica de los anticuerpos monoclonales a células tumorales no fijadas que expresan endógenamente células de cáncer de mama GT468 (MCF-7, MDA-MB-468 y SK-BR-3). Las células de cáncer gástrico NUG-C4 que no expresan GT468 se usaron como control negativo. Los anticuerpos son capaces de unirse a las células tumorales que expresan GT468.

40 Figura 17. Se realiza Western blot para determinar la especificidad de los anticuerpos generados contra GT468 en sobrenadantes de hibridoma. Todos los sobrenadantes de hibridoma mostraron reactividad específica con los lisados de las células HEK293 transfectadas con un plásmido de expresión GT468, mientras que los lisados de células transfectadas simuladas no mostraron señal.

45 Figura 18. GT468 es susceptible de ser convertido en fármaco por anticuerpos monoclonales que antagonizan la función. Análisis de proliferación de diferentes líneas celulares de cáncer después de la incubación con sobrenadantes de hibridoma purificado durante 72 h.

Figura 19. Ensayo clonogénico para analizar la actividad inhibidora de anticuerpos monoclonales contra GT468 en la formación de colonias de células SK-BR-3 que expresan GT468 de forma endógena. Incubar las células con anticuerpo reduce o inhibe la formación de colonias.

50 Figura 20A-B. Cuantificación de la expresión de GT468 en tejidos normales utilizando RT-PCR en tiempo real. Se analizaron los tejidos de tres individuos para cada tipo de tejido normal. Solo se pudieron detectar cantidades mínimas de transcripciones de GT468 en tejidos normales después de 40 ciclos de RT-PCR. El único tejido normal que excedió el límite de expresión (línea discontinua, expresión media de todos los tejidos normales + 3 ETS (percentil 99%)) fueron placenta y testículo. Barras de error, STD. Además del cáncer de mama (véase Fig. 1), se encontró una alta expresión de GT468 en muestras de cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de células renales, cáncer hepático, sarcoma, cáncer de tiroides y cabeza y cáncer de cuello.

60 Figura 21. Análisis de transferencia de Western de la expresión de GT468 en líneas celulares de cáncer. La expresión de GT468 se detectó en células FIEK293 transfectadas con plásmido de expresión GT468 (control positivo), SK-BR-3 (cáncer de mama), BEWO (coriocarcinoma placentario), JAR (coriocarcinoma placentario), HCT-15 (cáncer de colon), LnCaP (próstata cáncer), HeLa (cáncer de cuello uterino), MDA-MB-468 (cáncer de mama), JEG-3 (coriocarcinoma placentario), JIMT-1 (cáncer de mama), LA1-55n (neuroblastoma), PC-3 (cáncer de próstata), BT-20 (cáncer de mama) y NCI-H929 (mieloma). MelHO (melanoma maligno) y NUGC4 (cáncer gástrico) dieron negativo.

Figura 22. GT468 es susceptible de ser convertido en fármaco por anticuerpos monoclonales que antagonizan la función. Análisis de proliferación de células de cáncer de mama GT468 positivo MDA-MB-468 y células de cáncer gástrico NUGC4 negativo GT468 después de la incubación con sobrenadantes de hibridoma purificado durante 72 h.

5 Figura 23. Se realiza Western blot para determinar la especificidad de los anticuerpos producidos contra GT468 en sobrenadantes de hibridoma. Los sobrenadantes de hibridoma mostraron reactividad específica con lisados de células HEK293 transfectadas con un plásmido de expresión GT468, mientras que lisados de células transfectadas simuladas no mostraron señal.

10 Figura 24. El tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-GT468 atenúa el crecimiento tumoral de xenogama del coriocarcinoma placentario BEWO en ratones atímicos. Después de la inyección de células BEWO s.c. los animales se trataron con anticuerpos monoclonales purificados (200 µg) dos veces a la semana durante 2 semanas.

15 Figura 25. ELISA de péptidos para identificar epítomos de unión a anticuerpos en la proteína GT468. Los sobrenadantes de hibridoma 29-8B-1, 35-48B-1, 44-3A-2, 49-3A-1, 49-8A-1, 51-1A-1, 53-13A-2 y 62-9B1 mostraron cada uno unión a uno o más péptidos de sobreposición que implican reactividad a un epítipo lineal de GT468. Los patrones de unión de 29-1A-2 y 54-4B-2 implican reactividad a un epítipo conformacional (epítipo discontinuo) de la proteína GT468.

20 Figura 26. El tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-GT468 afecta significativamente la diseminación metastásica de células de cáncer de mama MCF-7 en ensayos de metástasis experimentales. Después de la inyección de 1×10^6 células MCF-7 i.v. los animales se trataron con anticuerpos monoclonales purificados (200 µg) dos veces a la semana. La carga tumoral metastásica en los pulmones de los animales se determinó 5 semanas después de la inoculación mediante PCR cuantitativa utilizando oligonucleótidos específicos para ADN de microsatélites humanos.

25 Definición de términos

Para que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, primero se definen ciertos términos. Se establecen definiciones adicionales a lo largo de la descripción detallada.

30 El término "GT468" se refiere preferiblemente a GT468 humano, y en particular a (i) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia amino de SEQ ID No: 2 tal como un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 o (ii) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 2, e incluye cualquier variante de dichas secuencias, en particular mutantes, variantes de empalme, conformaciones, isoformas, variantes alélicas, variantes de especies y homólogos de especies, en particular aquellos que están naturalmente presentes. Una variante alélica se relaciona con una alteración en la secuencia normal de un gen, cuya importancia a menudo no está clara. La secuenciación completa de genes a menudo identifica numerosas variantes alélicas para un gen determinado. Un homólogo de especie es una secuencia de ácido nucleico o aminoácido con una especie de origen diferente de la de un ácido nucleico o secuencia de aminoácidos dada. El término "GT468" abarcará (i) variantes de empalme GT468, (ii) variantes modificadas postraduccionalmente GT468, que incluyen particularmente variantes con diferente glicosilación, como el estado de N-glicosilación, (iii) variantes de conformación GT468, (iv) variantes GT468 relacionadas con cáncer y variantes GT468 no relacionadas con el cáncer.

45 En una realización, el término "GT468" se refiere a la porción de GT468 correspondiente al dominio extracelular o ectodominio y preferiblemente se refiere a la secuencia de aminoácidos de GT468 que no incluye el dominio hidrófobo N-terminal. El término "GT468" incluye una proteína que comprende los aminoácidos 29 a 119, preferiblemente los aminoácidos 29 a 212 y más preferiblemente los aminoácidos 23 a 212 de la SEQ ID No: 2 o los aminoácidos correspondientes de una variante de SEQ ID No: 2.

50 De acuerdo con la invención, los términos "dominio extracelular" o "ectodominio" con respecto a GT468 se refieren a la porción de GT468 que se encuentra en asociación con la superficie de las células que expresan GT468. Preferiblemente, dicho "dominio extracelular" o "ectodominio" está presente en el compartimento extracelular. El "dominio extracelular" GT468 o "ectodominio" se refiere preferiblemente a la porción de GT468 de longitud completa que carece del dominio hidrófobo N-terminal. De acuerdo con la invención, el término "dominio hidrófobo" con respecto a GT468 se refiere a que la porción de GT468 no es parte del dominio extracelular y preferiblemente incluye una secuencia hidrófoba localizada cerca del extremo N-terminal de GT468. El "dominio hidrófobo" de GT468 puede incluir una secuencia que precede a la secuencia hidrófoba y que se localiza en el extremo N-terminal de GT468. Con respecto a la SEQ ID No: 2, el dominio hidrófobo N-terminal preferiblemente comprende los aminoácidos 1 a 22. Se entenderá que los dominios o secuencias hidrófobos identificados para los polipéptidos GT468 de la presente invención se identifican de acuerdo con los criterios rutinariamente empleados en la técnica para identificar dominios o secuencias hidrófobos. Los límites exactos de un dominio hidrófobo pueden variar, pero muy probablemente en no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquier extremo del dominio como se identifica inicialmente en el presente documento. Opcionalmente, por lo tanto, un dominio extracelular de un polipéptido GT468 puede contener de aproximadamente 5 o menos aminoácidos en cualquier lado del dominio hidrófobo/límite del dominio extracelular como se identifica aquí.

65 La "superficie de la célula" se utiliza de acuerdo con su significado normal en la técnica, y por lo tanto incluye el exterior de la célula que es accesible a la unión por proteínas y otras moléculas.

La expresión "GT468 expresada en la superficie de las células" significa que GT468 expresado por las células se encuentra en asociación con la superficie de dichas células.

5 GT468 está asociado con la superficie de las células si está ubicado en la superficie de dichas células y es accesible a la unión por los anticuerpos específicos de GT468 agregados a las células. En realizaciones preferidas, una célula que se caracteriza por la asociación de GT468 con su superficie celular es una célula que expresa GT468. Debe entenderse que en el caso en que GT468 es expresado por células, el GT468 asociado con la superficie de dichas células puede ser solo una porción del GT468 expresado, en particular el dominio extracelular del mismo como se definió anteriormente.

10 De acuerdo con la invención, GT468 no se expresa sustancialmente en una célula y/o no está sustancialmente asociado con una superficie celular si el nivel de expresión y/o asociación es menor en comparación con la expresión y/o asociación en células de placenta o tejido de placenta. Preferiblemente, el nivel de expresión y/o asociación es menor que 10%, preferiblemente menor que 5%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1% o 0.05% de la expresión y/o asociación en células placentarias o tejido placentario o incluso más bajo. Preferiblemente, GT468 no se expresa sustancialmente en una célula y/o no está sustancialmente asociado con una superficie celular si el nivel de expresión y/o asociación excede el nivel de expresión y/o asociación en tejido no cancerígeno no canceroso de uno o más de cerebro, pulmón, mama, colon, hígado, estómago, riñón, próstata, páncreas, ovario, bazo, piel, miocardio y endometrio en no más de 2 veces, preferiblemente 1,5 veces, y preferiblemente no excede el nivel de expresión y/o asociación en dicho(s) tejido(s) no cancerígeno(s) no tumorigénico. Preferiblemente, GT468 no se expresa sustancialmente en una célula y/o no está sustancialmente asociado con una superficie celular si el nivel de expresión o asociación está por debajo del límite de detección y/o si el nivel de expresión o asociación es demasiado bajo para permitir la unión por anticuerpos específicos GT468 agregados a las células.

25 De acuerdo con la enseñanza, GT468 se expresa en una célula y/o se asocia con una superficie celular si el nivel de expresión y/o asociación excede el nivel de expresión y/o asociación en tejido no cancerígeno no canceroso de uno o más de cerebro, pulmón, mama, colon, hígado, estómago, riñón, próstata, páncreas, ovario, bazo, piel, miocardio y endometrio, preferiblemente en más de 2 veces, preferiblemente 10 veces, 100 veces, 1000 veces o 10000 veces. Preferiblemente, GT468 se expresa en una célula y/o se asocia con una superficie celular si el nivel de expresión o asociación está por encima del límite de detección y/o si el nivel de expresión o asociación es lo suficientemente alto como para permitir la unión por anticuerpos específicos GT468 agregado a las celdas preferiblemente, GT468 expresado en una célula se expresa o expone en la superficie de dicha célula.

35 El término "balsa" se refiere a los microdominios de membrana ricos en esfingolípidos y colesterol localizados en el área de la valva exterior de la membrana plasmática de una célula. La capacidad de ciertas proteínas para asociarse dentro de dichos dominios y su capacidad de formar "agregados" o "agregados focales" puede afectar la función de la proteína. Por ejemplo, la translocación de las moléculas de GT468 a tales estructuras, después de unirse a los anticuerpos de la actual enseñanza, crea una alta densidad de complejos de antígeno-anticuerpo GT468 en las membranas plasmáticas. Tal alta densidad de complejos antígeno-anticuerpo GT468 puede permitir la activación eficiente del sistema del complemento durante la CDC.

40 De acuerdo con la invención, el término "enfermedad" se refiere a cualquier estado patológico, que incluye cáncer, en particular aquellas formas de cáncer descritas aquí.

45 "Enfermedades asociadas con células que expresan GT468 y/o caracterizadas por asociación de GT468 con su superficie celular" significa de acuerdo con la invención que la expresión y/o asociación en células de un tejido u órgano enfermo aumenta preferiblemente en comparación con el estado en un tejido u órgano saludable. Un aumento se refiere a un aumento de por lo menos 10%, en particular por lo menos 20%, por lo menos 50%, por lo menos 100%, por lo menos 200%, por lo menos 500%, por lo menos 1000%, por lo menos 10000% o incluso Más. En una realización, la expresión y/o asociación con la superficie celular solo se encuentra en un tejido enfermo, mientras que la expresión en un tejido sano se reprime. De acuerdo con la invención, las enfermedades asociadas con células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular incluyen enfermedades tumorales tales como enfermedades de cáncer. Además, de acuerdo con la invención, las enfermedades tumorales tales como las enfermedades del cáncer son preferiblemente aquellas en las que las células tumorales o cancerosas expresan GT468 y/o se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular.

55 Como se utiliza en el presente documento, una "enfermedad tumoral", "enfermedad relacionada con tumor" o "enfermedad tumorigénica" incluye una enfermedad caracterizada por crecimiento celular regulado aberrantemente, proliferación, diferenciación, adhesión y/o migración, que puede dar como resultado la producción de o tendencia a producir tumores y/o metástasis tumorales. Por "célula tumoral" se entiende una célula anormal que crece por una proliferación celular rápida e incontrolada y continúa creciendo después de que cesan los estímulos que iniciaron el nuevo crecimiento.

60 Por "tumor" se entiende un grupo anormal de células o un tejido que crece por una proliferación celular rápida e incontrolada y continúa creciendo después de que cesan los estímulos que iniciaron el nuevo crecimiento. Los tumores muestran una falta parcial o completa de organización estructural y coordinación funcional con el tejido normal, y generalmente forman una masa distinta de tejido, que puede ser benigna, premaligna o maligna.

Preferiblemente, una “enfermedad tumoral”, “enfermedad relacionada con el tumor” o “enfermedad tumorigénica” de acuerdo con la invención es una enfermedad cancerosa, es decir, una enfermedad maligna y una célula tumoral es una célula cancerosa. Preferiblemente, una “enfermedad tumoral”, “enfermedad relacionada con tumor” o “enfermedad tumorigénica” se caracteriza por células que expresan GT468 y/o se caracterizan por asociación de GT468 con su superficie celular y una célula tumoral expresa GT468 y/o se caracteriza por asociación de GT468 con su superficie celular.

Una célula que expresa GT468 y/o que se caracteriza por la asociación de GT468 con su superficie celular preferiblemente es una célula tumoral o célula cancerosa, preferiblemente de los tumores y cánceres descritos en este documento. Preferiblemente, dicha célula es una célula diferente de una célula placentaria y/o célula de testículo.

Las enfermedades o cánceres preferidos de acuerdo con la invención se seleccionan del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de ovario, cáncer hepatocelular, cáncer de colon, cáncer de páncreas, cáncer de esófago, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, en particular carcinoma de células renales, cáncer de próstata, cáncer de hígado, melanoma, sarcoma, mieloma, neuroblastoma, coriocarcinoma placentario, cáncer de cuello uterino y cáncer de tiroides, y sus formas metastásicas. En una realización, la enfermedad del cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer metastásico en el pulmón.

De acuerdo con la invención, un “carcinoma” es un cáncer que comienza en la capa de revestimiento (células epiteliales) de los órganos.

El coriocarcinoma es un cáncer maligno, trofoblástico y agresivo, generalmente de la placenta. Se caracteriza por una diseminación hematógena temprana a los pulmones.

Un sarcoma es un cáncer del tejido conjuntivo (hueso, cartílago, grasa) que resulta en la proliferación del mesodermo. Esto está en contraste con los carcinomas, que son de origen epitelial.

El carcinoma de células renales también conocido como cáncer de células renales o adenocarcinoma de células renales es un cáncer de riñón que se origina en el revestimiento del túbulo contorneado proximal, los tubos muy pequeños en el riñón que filtran la sangre y eliminan los productos de desecho. El carcinoma de células renales es con mucho el tipo más común de cáncer de riñón en adultos y el más letal de todos los tumores genitorurarios. Distintos subtipos de carcinoma de células renales son el carcinoma de células renales de células claras y el carcinoma de células renales papilar. El carcinoma de células renales de células claras es la forma más común de carcinoma de células renales. Cuando se observan bajo un microscopio, las células que componen el carcinoma de células renales de células claras aparecen muy pálidas o claras. El carcinoma papilar de células renales es el segundo subtipo más común. Estos cánceres forman pequeñas proyecciones similares a dedos (llamadas papilas) en algunos, si no la mayoría, de los tumores.

Por “metástasis” se entiende la propagación de las células cancerosas desde su sitio original a otra parte del cuerpo. La formación de metástasis es un proceso muy complejo y depende del desprendimiento de células malignas del tumor primario, invasión de la matriz extracelular, penetración de las membranas basales endoteliales para ingresar en la cavidad corporal y los vasos, y luego, después de ser transportado por la sangre, infiltración de órganos objetivo. Finalmente, el crecimiento de un nuevo tumor en el sitio objetivo depende de la angiogénesis. La metástasis tumoral a menudo ocurre incluso después de la extirpación del tumor primario porque las células o los componentes del tumor pueden permanecer y desarrollar un potencial metastásico. En una realización, el término “metástasis” de acuerdo con la invención se refiere a “metástasis a distancia” que se refiere a una metástasis que está alejada del tumor primario y el sistema de ganglios linfáticos regionales.

Las células de un tumor secundario o metastásico son como las del tumor original. Esto significa, por ejemplo, que, si el cáncer de ovario se metastatiza en el hígado, el tumor secundario está formado por células ováricas anormales, no por células anormales del hígado. El tumor en el hígado se llama cáncer de ovario metastásico, no cáncer de hígado.

El término “tratamiento de una enfermedad” incluye curado, acortamiento de la duración, mejora, prevención, ralentización o inhibición de la progresión o empeoramiento, o prevención o retraso de la aparición de una enfermedad o los síntomas de esta.

El término “paciente” significa de acuerdo con la invención un ser humano, un primate no humano u otro animal, en particular un mamífero tal como una vaca, caballo, cerdo, oveja, cabra, perro, gato o un roedor como un ratón y rata. En una realización particularmente preferida, el paciente es un ser humano.

De acuerdo con la invención, una muestra puede ser cualquier muestra útil de acuerdo con la presente invención, en particular una muestra biológica tal como muestra de tejido, que incluye fluidos corporales, y/o una muestra celular y puede obtenerse de la manera convencional tal como por tejido biopsia, incluyendo biopsia con sacabocados, y tomando sangre, aspirado bronquial, esputo, orina, heces u otros fluidos corporales. De acuerdo con la invención, el término “muestra biológica” también incluye fracciones de muestras biológicas.

El término “anticuerpo” se refiere a una glicoproteína que comprende por lo menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o una porción de unión a antígeno de este. El término

“anticuerpo” también incluye todas las formas recombinantes de anticuerpos, en particular de los anticuerpos descritos en el presente documento, por ejemplo, anticuerpos expresados en procarióticas, anticuerpos no glicosilados y cualquier fragmento y derivado de anticuerpo que se une a antígeno como se describe en este documento. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada en este documento como VH) y una región constante de cadena pesada. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada en este documento como VL) y una región constante de cadena ligera. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL está compuesto de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del huésped, que incluyen diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico.

El término “anticuerpo humanizado” se refiere a una molécula que tiene un sitio de unión a antígeno que se deriva sustancialmente de una inmunoglobulina de una especie no humana, donde la estructura de inmunoglobulina restante de la molécula se basa en la estructura y/o secuencia de una inmunoglobulina humana. El sitio de unión a antígeno puede comprender dominios variables completos fusionados en dominios constantes o solo las regiones determinantes de complementariedad (CDR) injertadas en regiones marco apropiadas en los dominios variables. Los sitios de unión a antígeno pueden ser de tipo silvestre o modificados por una o más sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, modificado para parecerse más a las inmunoglobulinas humanas. Algunas formas de anticuerpos humanizados conservan todas las secuencias de CDR (por ejemplo, un anticuerpo de ratón humanizado que contiene las seis CDR del anticuerpo de ratón). Otras formas tienen una o más CDR que están alteradas con respecto al anticuerpo original.

El término “anticuerpo quimérico” se refiere a aquellos anticuerpos en los que una porción de cada una de las secuencias de aminoácidos de cadenas pesadas y ligeras es homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase particular, mientras que el segmento restante de la cadena es homólogo a las secuencias correspondientes en otro. Típicamente, la región variable de ambas cadenas ligera y pesada imita las regiones variables de anticuerpos derivados de una especie de mamíferos, mientras que las porciones constantes son homólogas a secuencias de anticuerpos derivadas de otras. Una clara ventaja de tales formas quiméricas es que la región variable puede derivarse convenientemente de fuentes actualmente conocidas que utilizan células B fácilmente disponibles o hibridomas de organismos hospedadores no humanos en combinación con regiones constantes derivadas de, por ejemplo, preparaciones de células humanas. Si bien la región variable tiene la ventaja de facilitar la preparación y la fuente no afecta a la especificidad, la región constante es humana, es menos probable que provoque una respuesta inmunitaria de un sujeto humano cuando se inyectan los anticuerpos que la región constante de una fuente no humana. Sin embargo, la definición no está limitada a este ejemplo particular.

El término “porción de unión a antígeno” de un anticuerpo (o simplemente “parte de unión”), como se utiliza en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término “porción de unión a antígeno” de un anticuerpo incluyen (i) fragmentos Fab, fragmentos monovalentes que consisten en los dominios VL, VH, CL y CH; (ii) fragmentos F(ab')₂, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) fragmentos Fd que consisten en los dominios VH y CH; (iv) fragmentos Fv que consisten en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) fragmentos dAb (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546), que consisten en un dominio VH; (vi) regiones determinantes de complementariedad aisladas (CDR), y (vii) combinaciones de dos o más CDR aisladas que pueden unirse opcionalmente mediante un enlazador sintético. Adicionalmente, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, se pueden unir, utilizando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite formarse como una sola cadena de proteína en la que el VL y las regiones VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena única (scFv); véase, por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242: 423-426; y Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883). Dichos anticuerpos monocatenarios también pretenden incluirse dentro del término “porción de unión a antígeno” de un anticuerpo. Un ejemplo adicional es proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión que comprenden (i) un polipéptido de dominio de unión que está fusionado a un polipéptido de región bisagra de inmunoglobulina, (ii) una región constante de CH₂ de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada a la región de bisagra y (iii) una inmunoglobulina región constante de CH₃ de cadena pesada fusionada a la región constante de CH₂. El polipéptido del dominio de fusión puede ser una región variable de cadena pesada o una región variable de cadena ligera. Las proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión se divulgan adicionalmente en los documentos US 2003/0118592 y US 2003/0133939. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen utilizando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se criban para determinar su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

El término “epítipo” significa un determinante de proteína capaz de unirse a un anticuerpo, en el que el término “unión” en el presente documento se refiere preferiblemente a una unión específica. Los epítipos generalmente consisten en agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activas, tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y, por lo general, tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga

específicas. Los epítomos conformacionales y no conformacionales se distinguen porque la unión al primero, pero no al último se pierde en presencia de disolventes desnaturizantes.

5 El término "epítomo discontinuo", como se utiliza en el presente documento, significa un epítomo conformacional en un antígeno de proteína que se forma a partir de por lo menos dos regiones separadas en la secuencia primaria de la proteína.

10 El término "molécula biespecífica" pretende incluir cualquier agente, por ejemplo, un complejo de proteína, péptido o proteína o péptido, que tiene dos especificidades de unión diferentes. Por ejemplo, la molécula puede unirse o interactuar con (a) un antígeno de superficie celular, y (b) un receptor de Fc en la superficie de una célula efectora. El término "molécula multiespecífica" o "molécula heteroespecífica" pretende incluir cualquier agente, por ejemplo, un complejo de proteína, péptido o proteína o péptido, que tenga más de dos especificidades de unión diferentes. Por ejemplo, la molécula se puede unir a, o interactuar con, (a) un antígeno de superficie celular, (b) un receptor de Fc en la superficie de una célula efectora, y (c) por lo menos otro componente. De acuerdo con lo anterior, la invención incluye, pero no se limita a, moléculas biespecíficas, trispecíficas, tetraspecíficas y otras multiespecíficas que se dirigen a GT468, y a otros objetivos, tales como receptores de Fc sobre células efectoras. El término "anticuerpos biespecíficos" también incluye diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes biespecíficos en los que los dominios VH y VL se expresan en una sola cadena polipeptídica, pero utilizando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, lo que obliga a los dominios a emparejarse con dominios de otra cadena y la creación de dos sitios de unión a antígeno (véase, por ejemplo, Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Poljak, R.J., et al. (1994) Estructura 2: 1121-1123).

20 Las enseñanzas también incluyen derivados de los anticuerpos descritos en el presente documento que, para los fines de la invención, están abarcados por el término "anticuerpo". El término "derivados de anticuerpos" se refiere a cualquier forma modificada de un anticuerpo, por ejemplo, un conjugado del anticuerpo y otro agente o anticuerpo. Tal como se utiliza en el presente documento, un anticuerpo se deriva de una secuencia de línea germinal particular si el anticuerpo se obtiene de un sistema inmunizando un animal o explorando una colección de genes de inmunoglobulina, y en el que el anticuerpo seleccionado es por lo menos 90%, más preferiblemente por lo menos 95%, aún más preferiblemente por lo menos 96%, 97%, 98%, o 99% idénticos en secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal. Típicamente, un anticuerpo derivado de una secuencia particular de la línea germinal mostrará no más de 10 diferencias de aminoácidos, más preferiblemente, no más de 5, o incluso más preferiblemente, no más de 4, 3, 2 o 1 diferencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal.

25 Como se utiliza en el presente documento, el término "heteroanticuerpos" se refiere a dos o más anticuerpos, derivados de estos, o regiones de unión a antígenos unidos entre sí, por lo menos dos de los cuales tienen especificidades diferentes. Estas diferentes especificidades incluyen una especificidad de unión por un receptor de Fc en una célula efectora, y una especificidad de unión por un antígeno o epítomo en una célula objetivo, por ejemplo, una célula tumoral.

40 Los anticuerpos descritos en este documento pueden ser anticuerpos humanos. El término "anticuerpo humano", como se utiliza en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de las enseñanzas pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio in vitro o por mutación somática in vivo).

45 El término "anticuerpo monoclonal" como se utiliza en el presente documento se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Un anticuerpo monoclonal muestra una única especificidad de unión y afinidad por un epítomo particular. En una realización, los anticuerpos monoclonales se producen mediante un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano, por ejemplo, un ratón, fusionado a una célula inmortalizada.

50 El término "anticuerpo recombinante", como se utiliza en este documento, incluye todos los anticuerpos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico con respecto a los genes de inmunoglobulina o un hibridoma preparado a partir de ellos, (b) anticuerpos aislados de una célula anfitriona transformada para expresar el anticuerpo, por ejemplo, de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una colección recombinante de anticuerpos combinatoria, y (d) anticuerpos preparados, expresado, creado o aislado por cualquier otro medio que implique el empalme de secuencias del gen de inmunoglobulina a otras secuencias de ADN.

60 El término "transfectoma", como se utiliza en este documento, incluye células anfitrionas eucarióticas recombinantes que expresan un anticuerpo, tales como células CHO, células NS/O, células HEK293, células HEK293T, células vegetales u hongos, que incluyen células de levadura.

65 Como se utiliza en el presente documento, un "anticuerpo heterólogo" se define en relación con un organismo transgénico que produce dicho anticuerpo. Este término se refiere a un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácidos nucleicos codificante correspondiente a la encontrada en un organismo que no está constituido por el organismo transgénico, y que generalmente deriva de una especie distinta del organismo transgénico.

Como se utiliza en el presente documento, un “anticuerpo heterohíbrido” se refiere a un anticuerpo que tiene cadenas ligeras y pesadas de diferentes orígenes de organismos. Por ejemplo, un anticuerpo que tiene una cadena pesada humana asociada con una cadena ligera murina es un anticuerpo heterohíbrido.

5 Los anticuerpos descritos en el presente documento están preferiblemente aislados. Un “anticuerpo aislado” como se utiliza en este documento, pretende referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas diferentes (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a GT468 está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de GT468) Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítipo, isoforma o variante de GT468 humano puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo, de otras especies (por ejemplo, homólogos de especies de GT468). Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos. En una realización de la invención, una combinación de anticuerpos monoclonales “aislados” se refiere a anticuerpos que tienen especificidades diferentes y se combinan en una composición bien definida.

15 El término “unión” de acuerdo con la invención preferiblemente se refiere a una unión específica. “Unión específica” significa que un agente tal como un anticuerpo se une más fuerte a un objetivo (predeterminado) tal como un antígeno o un epítipo para el que es específico en comparación con la unión a otro objetivo. Un agente se une más fuerte a un primer objetivo en comparación con un segundo objetivo si se une al primer objetivo con una constante de disociación (K_D) que es menor que la constante de disociación para el segundo objetivo. Preferiblemente, la constante de disociación (K_D) para el objetivo al que el agente se une específicamente es más de 10 veces, preferiblemente más de 20 veces, más preferiblemente más de 50 veces, incluso más preferiblemente más de 100 veces, 200 veces, 500 veces o 1000 veces menor que la constante de disociación (K_D) para el objetivo al que el agente no se une específicamente. Típicamente, el anticuerpo se une con una afinidad correspondiente a una K_D de aproximadamente 1×10^7 M o menos, y se une al antígeno predeterminado con una afinidad correspondiente a una K_D que es por lo menos dos órdenes de magnitud menor que su afinidad para unirse a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado.

El término “ K_D ” (M), tal como se utiliza en el presente documento, pretende referirse a la constante de equilibrio de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular.

30 Como se utiliza en este documento, “isotipo” se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1) que está codificada por genes de la región constante de la cadena pesada.

35 Como se utiliza en el presente documento, “conmutación de isotipo” se refiere al fenómeno por el cual la clase, o isotipo, de un anticuerpo cambia de una clase de Ig a una de las otras clases de Ig.

El término “de origen natural”, tal como se utiliza en el presente documento, aplicado a un objeto se refiere al hecho de que un objeto se puede encontrar en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de polipéptido o polinucleótido que está presente en un organismo (incluyendo virus) que puede aislarse de una fuente en la naturaleza y que no ha sido modificada intencionalmente por el hombre en el laboratorio se produce en forma natural.

45 El término “reorganizado” como se utiliza en este documento se refiere a una configuración de un locus de inmunoglobulina de cadena pesada o cadena ligera en el que un segmento V está inmediatamente adyacente a un segmento D-J o J en una conformación que codifica esencialmente un dominio VH o VL completo, respectivamente. Un locus del gen de inmunoglobulina (anticuerpo) reorganizado se puede identificar por comparación con el ADN de la línea germinal; un locus redistribuido tendrá por lo menos un elemento de homología de heptámero/nonámero recombinado.

50 El término “configuración no reordenada” o “línea germinal” tal como se utiliza en el presente documento con referencia a un segmento V se refiere a la configuración en la que el segmento V no se recombina para estar inmediatamente adyacente a un segmento D o J.

El término “molécula de ácido nucleico”, como se utiliza en el presente documento, pretende incluir moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferiblemente es ADN de doble cadena.

55 Los ácidos nucleicos descritos de acuerdo con la invención se han aislado preferiblemente. El término “ácido nucleico aislado” significa de acuerdo con la invención que el ácido nucleico fue (i) amplificado in vitro, por ejemplo, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), (ii) producido recombinantemente por clonación, (iii) purificado, por ejemplo, por fraccionamiento y fraccionamiento electroforético en gel, o (iv) sintetizado, por ejemplo, por síntesis química. Un ácido nucleico aislado es un ácido nucleico que está disponible para la manipulación mediante técnicas de ADN recombinante.

60 Los ácidos nucleicos pueden, de acuerdo con la invención, estar presentes solos o en combinación con otros ácidos nucleicos, que pueden ser homólogos o heterólogos. En realizaciones preferidas, un ácido nucleico está unido funcionalmente a secuencias de control de la expresión que pueden ser homólogas o heterólogas con respecto a dicho ácido nucleico, donde el término “homólogo” significa que el ácido nucleico también está funcionalmente unido a la

secuencia de control de expresión de forma natural y el término “heterólogo” significa que el ácido nucleico no está funcionalmente unido a la secuencia de control de la expresión de forma natural.

5 Un ácido nucleico, tal como un ácido nucleico que expresa ARN y/o proteína o péptido, y una secuencia de control de expresión están “funcionalmente” unidos entre sí, si están unidos covalentemente entre sí de tal manera que la expresión o transcripción de dicho el ácido nucleico está bajo el control o bajo la influencia de dicha secuencia de control de la expresión. Si el ácido nucleico se va a traducir en una proteína funcional, entonces, con una secuencia de control de expresión funcionalmente unida a una secuencia codificante, la inducción de dicha secuencia de control de expresión da como resultado la transcripción de dicho ácido nucleico, sin provocar un cambio de marco en la secuencia codificante o
10 dicha secuencia de codificación no puede traducirse en la proteína o péptido deseado.

El término “secuencia de control de la expresión” comprende, de acuerdo con la invención, promotores, sitios de unión a ribosomas, potenciadores y otros elementos de control que regulan la transcripción de un gen o la traducción de un mRNA. En realizaciones particulares de la invención, las secuencias de control de la expresión se pueden regular. La estructura
15 exacta de las secuencias de control de la expresión puede variar como una función de la especie o tipo de célula, pero generalmente comprende secuencias 5' -no transcritas y 5' y 3' – no traducidas que participan en el inicio de la transcripción y traducción, respectivamente, tales como Caja TATA, secuencia de tapado, secuencia CAAT, y similares. Más específicamente, las secuencias de control de expresión 5' no transcritas comprenden una región promotora que incluye una secuencia promotora para el control transcripcional del ácido nucleico unido funcionalmente. Las secuencias
20 de control de expresión también pueden comprender secuencias potenciadoras o secuencias activadoras aguas arriba.

De acuerdo con la invención, el término “promotor” o “región promotora” se refiere a una secuencia de ácido nucleico que se localiza aguas arriba (5') a la secuencia de ácido nucleico que se expresa y controla la expresión de la secuencia proporcionando un sitio de reconocimiento y unión para ARN-polimerasa. La “región promotora” puede incluir sitios de
25 reconocimiento y unión adicionales para otros factores que están implicados en la regulación de la transcripción de un gen. Un promotor puede controlar la transcripción de un gen procariótico o eucariótico. Adicionalmente, un promotor puede ser “inducible” y puede iniciar la transcripción en respuesta a un agente inductor o puede ser “constitutivo” si la transcripción no está controlada por un agente inductor. Un gen que está bajo el control de un promotor inducible no se expresa o solo se expresa en una pequeña medida si está ausente un agente inductor. En presencia del agente inductor,
30 el gen se enciende o se aumenta el nivel de transcripción. Esto está mediado, en general, por la unión de un factor de transcripción específico.

Los promotores que se prefieren de acuerdo con la invención incluyen promotores para SP6, polimerasa T3 y T7, promotor de ARN U6 humano, promotor de CMV y promotores híbridos artificiales de los mismos (por ejemplo, CMV) donde una parte o partes están fusionadas a una parte o partes de promotores de genes de otras proteínas celulares tales como por
35 ejemplo GAPDH humano (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) e incluyendo o no un(os) intrón(es) adicional(es).

De acuerdo con la invención, el término “expresión” se utiliza en su significado más general y comprende la producción de ARN o de ARN y proteína/péptido. También comprende la expresión parcial de ácidos nucleicos. Adicionalmente, la
40 expresión puede llevarse a cabo de forma transitoria o estable.

En una realización preferida, una molécula de ácido nucleico está de acuerdo con la presente invención en un vector, cuando sea apropiado con un promotor, que controla la expresión del ácido nucleico. El término “vector” se utiliza aquí en su significado más general y comprende cualquier vehículo intermediario para un ácido nucleico que permite que dicho
45 ácido nucleico, por ejemplo, se introduzca en células procarióticas y/o eucarióticas y, cuando sea apropiado, se integre en un genoma. Los vectores de este tipo preferiblemente se replican y/o expresan en las células. Los vectores comprenden plásmidos, fagémidos, bacteriófagos o genomas virales. El término “plásmido”, como se utiliza en el presente documento, se refiere en general a una construcción de material genético extracromosómico, habitualmente un dúplex de ADN circular, que puede replicarse independientemente del ADN cromosómico.
50

Como vector de expresión de un anticuerpo, se puede utilizar ya sea de un tipo de vector en el que están presentes la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo en diferentes vectores o un vector en el que la cadena pesada y la cadena ligera están presentes en el mismo vector.

55 La enseñanza dada en este documento con respecto a secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos específicas, por ejemplo, los que se muestran en el listado de secuencias, deben interpretarse de manera que también se relacionen con modificaciones de dichas secuencias específicas que dan como resultado secuencias que son funcionalmente equivalentes a dichas secuencias específicas, por ejemplo, secuencias de aminoácidos que exhiben propiedades idénticas o similares a las de las secuencias de aminoácidos específicas y secuencias de ácidos nucleicos que codifican
60 secuencias de aminoácidos que exhiben propiedades idénticas o similares a las de las secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias de ácido nucleico específicas. De manera similar, las enseñanzas dadas en este documento con respecto a anticuerpos específicos o hibridomas que producen anticuerpos específicos se deben interpretar de manera que también se relacionen con anticuerpos caracterizados por una secuencia de aminoácidos y/o secuencia de ácido nucleico que se modifica en comparación con la secuencia de aminoácidos y/o secuencia de ácido
65 nucleico de los anticuerpos específicos pero que son funcionalmente equivalentes. Una propiedad importante es retener la unión de un anticuerpo a su objetivo o sostener las funciones efectoras de un anticuerpo. Preferiblemente, una

secuencia modificada con respecto a una secuencia específica, cuando reemplaza la secuencia específica en un anticuerpo, conserva la unión de dicho anticuerpo a GT468 y preferiblemente funciones de dicho anticuerpo como se describe en el presente documento, por ejemplo, lisis mediada por CDC o lisis mediada por ADCC.

5 Los expertos en la técnica apreciarán que, en particular, las secuencias de las regiones CDR, hipervariables y variables pueden modificarse sin perder la capacidad de unirse a GT468. Por ejemplo, las regiones CDR serán idénticas o altamente homólogas a las regiones de anticuerpos especificadas en este documento. Por “altamente homólogo” se contempla que de 1 a 5, preferiblemente de 1 a 4, tal como 1 a 3 o 1 o 2 sustituciones pueden hacerse en las CDR. Además, las regiones hipervariables y variables pueden modificarse de modo que muestren una homología sustancial con las regiones de los anticuerpos divulgados específicamente en este documento.

15 Debe entenderse que los ácidos nucleicos específicos descritos en el presente documento también incluyen ácidos nucleicos modificados con el fin de optimizar el uso de codones en una célula u organismo huésped particular. Las diferencias en el uso de codones entre organismos pueden conducir a una variedad de problemas relacionados con la expresión de genes heterólogos. La optimización de codones cambiando uno o más nucleótidos de la secuencia original puede dar como resultado una optimización de la expresión de un ácido nucleico, en particular en la optimización de la eficacia de traducción, en un hospedador homólogo o heterólogo en el que debe expresarse dicho ácido nucleico. Por ejemplo, si los ácidos nucleicos derivados de las regiones constantes humanas y de codificación y/o las regiones estructurales de los anticuerpos se van a utilizar de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, para preparar anticuerpos quiméricos o humanizados, se puede preferir modificar dichos ácidos nucleicos para optimizar el uso de codones, en particular si dichos ácidos nucleicos, opcionalmente fusionados a ácidos nucleicos heterólogos tales como ácidos nucleicos derivados de otros organismos como se describe aquí, deben expresarse en células de un organismo diferente del humano, como el ratón o el hámster. Por ejemplo, las secuencias de ácidos nucleicos que codifican regiones constantes de cadena ligera y pesada humanas tales como las de SEQ ID No: 19 y 20, respectivamente, se pueden modificar para incluir una o más, preferiblemente, por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 y preferiblemente hasta 10, 15, 20, 25, 30, 50, 70 o 100 o más reemplazos de nucleótidos que dan como resultado un uso optimizado de codones pero que no da como resultado un cambio de la secuencia de aminoácidos. Dichas sustituciones de nucleótidos preferiblemente se refieren a reemplazos de nucleótidos en las SEQ ID No: 19 y 20, respectivamente, seleccionados de los reemplazos mostrados en la siguiente alineación de las SEQ ID No: 19 y 20, respectivamente, con sus contrapartes modificadas y que no resultan en un cambio en la secuencia de aminoácidos codificada o se refieren a reemplazos correspondientes en posiciones correspondientes en otras secuencias de ácidos nucleicos que codifican regiones constantes de cadenas ligeras y pesadas humanas, respectivamente. Preferiblemente, todas las sustituciones mostradas en las siguientes alineaciones de SEQ ID Nos: 19 y 20, respectivamente, con sus homólogos modificados que no dan como resultado un cambio en la secuencia de aminoácidos codificada se efectúan en secuencias de ácidos nucleicos que codifican regiones constantes de cadena ligera y pesada humana, respectivamente.

Alineación de SEQ ID No: 19 y SEQ ID No: 21:

ES 2 659 718 T3

```

CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT 60
|||||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
CGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGTCC 60

GGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAG 120
|||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
GGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAG 120

TGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGAC 180
|||||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
TGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGAC 180

AGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAG 240
|||||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
AGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAAGGCCGACTACGAG 240

AAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCAAAAG 300
|||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
AAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAG 300

AGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG 324
|||||  |||  |||  |||  |||  |||
AGCTTCAACAGGGGCGAGTGCTAG 324

```

Alineación de SEQ ID No: 20 y SEQ ID No: 23:

```

GGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCC 60
|||||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
GGCCCAAGCGTGTTCCCCCCTGGCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCC 60

CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGG 120
|||||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
CTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGAGCTGGAACAGCGGA 120

GCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCC 180
|||||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
GCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCGCCGCTGCTGCAGAGCAGCGCCTGTACAGC 180

CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC 240
|||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
CTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC 240

```

5

ES 2 659 718 T3

```

GTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGAC 300
||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
GTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAAGAGCTGCGAC 300

AAAACTCACACATGCCACCCTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTC 360
|| || || || || || || || || || || || || || || || || || || || || ||
AAGACCCACACCTGCCCCCTGCCAGCCCCAGAGCTGCTGGGCGGACCCAGCGTGTTTC 360

CTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGC 420
|| || || || || || || || || || || || || || || || || || || || || ||
CTGTTCCCCCAAAGCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCGAGGTGACCTGC 420

GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC 480
||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| |||||||
GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC 480

GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCCT 540
||||| ||||||| || || || || || || || || || || || || || || || || || ||
GTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGG 540

GTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC 600
||||| || || || || || || || || || || || || || || || || || || || || ||
GTGGTGTCCTGCTGACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGC 600

AAGGTCTCCAACAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGG 660
||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| || || || || || || ||
AAGGTCTCCAACAAGCCCTGCCAGCCCCATCGAAAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGC 660

CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAAC 720
||||| || || || || || || || || || || || || || || || || || || || || ||
CAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC 720

CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG 780
||||| || || || || || || || || || || || || || || || || || || || || ||
CAGGTGTCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG 780

GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC 840
||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| ||||||| || || || || || || ||
GAGAGCAACGGCCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCAGTGCTGGACAGCGAC 840

GGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC 900
|| || || || || || || || || || || || || || || || || || || || || ||
GGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAAC 900

GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC 960
|| || || || || || || || || || || || || || || || || || || || || ||
GTGTTTCTAGCTGCAGCGTGTGACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGTCCCTG 960

TCCCTGTCTCCGGGTTAAATGA 981
||||| || || || || || ||
AGCCTGAGCCCCGGCAAGTAG 981

```

5 Adicionalmente, se puede desear de acuerdo con la presente invención modificar las secuencias de aminoácidos descritas en este documento, en particular las de las regiones constantes de la cadena pesada humana para adaptar la secuencia a un alotipo deseado, por ejemplo, un alotipo encontrado en la población caucásica. Dichas modificaciones se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en las siguientes sustituciones de aminoácidos dentro de la SEQ ID No: 17 o en las posiciones correspondientes dentro de otras regiones constantes de la cadena pesada humana: K93R, D235E y L237M. Preferiblemente, todas estas modificaciones están incluidas en las secuencias de aminoácidos de las regiones constantes de la cadena pesada humana.

De acuerdo con la invención, el término “posiciones correspondientes” se refiere a nucleótidos o residuos de aminoácidos que en una alineación de secuencia de dos secuencias de ácido nucleico o proteína se alinean entre sí.

5 De acuerdo con la invención, una variante, derivado, forma modificada o fragmento de una secuencia de ácido nucleico, secuencia de aminoácidos o péptido preferiblemente tiene una propiedad funcional de la secuencia de ácido nucleico, secuencia de aminoácidos o péptidos, respectivamente, de la cual ha sido derivado. Tales propiedades funcionales comprenden la interacción o unión a otras moléculas. En una realización, una variante, derivado, forma modificada o fragmento de una secuencia de ácido nucleico, secuencia de aminoácidos o péptido es inmunológicamente equivalente a la secuencia de ácido nucleico, secuencia de aminoácidos o péptido, respectivamente, de la que se ha derivado.

15 Preferiblemente, el grado de identidad entre una secuencia de ácido nucleico específica y una secuencia de ácido nucleico que está modificada con respecto a o que es una variante de dicha secuencia de ácido nucleico específica será de por lo menos 70%, preferiblemente por lo menos 75%, más preferiblemente por lo menos 80%, incluso más preferiblemente por lo menos 90% o más preferiblemente por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99%. Con respecto a las variantes de ácido nucleico GT468, el grado de identidad se da preferiblemente para una región de por lo menos aproximadamente 300, por lo menos aproximadamente 400, por lo menos aproximadamente 450, por lo menos aproximadamente 500, por lo menos aproximadamente 550, por lo menos aproximadamente 600 o por lo menos aproximadamente 630 nucleótidos. En realizaciones preferidas, el grado de identidad se da para toda la longitud de la secuencia de ácido nucleico de referencia, tal como las secuencias de ácido nucleico dadas en la lista de secuencias. Preferiblemente, las dos secuencias son capaces de hibridarse y formar un dúplex estable entre sí, siendo la hibridación preferiblemente llevada a cabo en condiciones que permiten la hibridación específica entre polinucleótidos (condiciones rigurosas). Se describen condiciones rigurosas, por ejemplo, en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook y col., Editors, 2ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989 o *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel et al., Editors, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York y se refieren, por ejemplo, a la hibridación a 65°C en tampón de hibridación (3.5 x SSC, 0.02% Ficoll, 0.02% povidona, 0.02% albúmina de suero bovino, NaH₂PO₄ 2.5 mM (pH 7), SDS al 0.5%, EDTA 2 mM). El SSC es cloruro sódico 0.15 M/citrato sódico 0.15 M, pH 7. Después de la hibridación, la membrana a la que se ha transferido el ADN se lava, por ejemplo, en 2 x SSC a temperatura ambiente y luego en 0.1-0.5 x SSC/0.1 x SSC a temperaturas de hasta 68°C.

30 Para los fines de la presente invención, las “variantes” de una secuencia de aminoácidos comprenden variantes de inserción de aminoácidos, variantes de eliminación de aminoácidos y/o variantes de sustitución de aminoácidos.

35 Preferiblemente, el grado de similitud, preferiblemente la identidad entre una secuencia de aminoácidos específica y una secuencia de aminoácidos que está modificada con respecto a, o, que es una variante de dicha secuencia de aminoácidos específica tal como entre secuencias de aminoácidos que muestran una homología sustancial será de por lo menos 70%, preferiblemente por lo menos 80%, incluso más preferiblemente por lo menos 90% o lo más preferiblemente por lo menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99%. Con respecto a las variantes del polipéptido GT468, el grado de similitud o identidad se da preferiblemente para una región de por lo menos aproximadamente 100, por lo menos aproximadamente 120, por lo menos aproximadamente 140, por lo menos aproximadamente 160, por lo menos aproximadamente 180, por lo menos aproximadamente 200, por lo menos aproximadamente 210 o 212 aminoácidos. En realizaciones preferidas, el grado de similitud o identidad se da para toda la longitud de la secuencia de aminoácidos de referencia tal como las secuencias de aminoácidos dadas en la lista de secuencias.

45 La “similitud de secuencia” indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos o representan sustituciones conservadoras de aminoácidos. La “identidad de secuencia” entre dos secuencias de polipéptido o ácido nucleico indica el porcentaje de aminoácidos o nucleótidos que son idénticos entre las secuencias.

50 El “porcentaje de identidad” se obtiene después de la mejor alineación, este porcentaje es puramente estadístico y las diferencias entre las dos secuencias se distribuyen al azar y en toda su longitud. Las comparaciones de secuencias entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos se llevan a cabo convencionalmente comparando estas secuencias después de haberlas alineado de manera óptima, dicha comparación se lleva a cabo por segmento o por “ventana de comparación” para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. La alineación óptima de las secuencias para comparación puede producirse, además de manualmente, por medio del algoritmo de homología local de Smith y Waterman, 1981, *Ads App. Math.* 2, 482, por medio del algoritmo de homología local de Needleman y Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443, por medio del método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, 1988, *Proc. Natl Acad. Sci. Estados Unidos* 85, 2444, o por medio de programas de ordenador que utilizan estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.).

60 El porcentaje de identidad se calcula determinando el número de posiciones idénticas entre las dos secuencias que se comparan, dividiendo este número por el número de posiciones comparadas y multiplicando el resultado obtenido por 100 para obtener el porcentaje de identidad entre estas dos secuencias.

65 Las “sustituciones conservadoras” pueden hacerse, por ejemplo, sobre la base de la similitud en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o la naturaleza anfipática de los residuos implicados. Por ejemplo: (a) los

- aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina; (b) los aminoácidos neutros polares incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina; (c) los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina; y (d) aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Las sustituciones generalmente se pueden hacer dentro de los grupos (a)-(d). Además, la glicina y la prolina se pueden sustituir entre sí en función de su capacidad para alterar hélices α . Algunas sustituciones preferidas pueden hacerse entre los siguientes grupos: (i) S y T; (ii) P y G; y (iii) A, V, L e I. Dado el código genético conocido, y las técnicas de ADN recombinante y sintético, el experto en la materia puede construir fácilmente ADN que codifiquen las variantes de aminoácidos conservadoras.
- Las actuales enseñanzas comprenden anticuerpos en los que se han realizado alteraciones en la región Fc con el fin de cambiar las propiedades funcionales o farmacocinéticas de los anticuerpos. Dichas alteraciones pueden dar como resultado una disminución o aumento de la unión de C1q y CDC o de la unión de Fc γ R y ADCC. Las sustituciones pueden realizarse, por ejemplo, en uno o más de los restos de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada, provocando de ese modo una alteración en una función efectora mientras se retiene la capacidad de unirse al antígeno en comparación con el anticuerpo modificado, véase documentos US 5,624,821 y US 5,648,260.
- La vida media in vivo de los anticuerpos se puede mejorar modificando el epítipo del receptor de rescate del dominio constante de Ig o un dominio constante de tipo Ig tal que la molécula no comprenda un dominio de CH2 intacto o una región de Fc de Ig intacta, véase US 6,121,022 y US 6,194,551. La vida media in vivo puede aumentarse adicionalmente realizando mutaciones en la región Fc, por ejemplo, sustituyendo treonina por leucina en la posición 252, sustituyendo treonina por serina en la posición 254, o sustituyendo treonina por fenilalanina en la posición 256, véase documento US 6.277.375.
- Adicionalmente, el patrón de glicosilación de los anticuerpos puede modificarse para cambiar la función efectora de los anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden expresar en un transfectoma que no agrega la unidad de fucosa normalmente unida a Asn en la posición 297 de la región Fc con el fin de mejorar la afinidad de la región Fc por receptores Fc que, a su vez, dará como resultado en un incremento de ADCC de los anticuerpos en presencia de células NK, véase Shield et al. (2002) JBC, 277: 26733. Adicionalmente, se puede realizar una modificación de la galactosilación para modificar CDC.
- Alternativamente, en otra realización, las mutaciones pueden introducirse aleatoriamente a lo largo de toda o parte de una secuencia codificante de anticuerpo anti-GT468, tal como por mutagénesis de saturación, y los anticuerpos anti-GT468 modificados resultantes pueden cribarse para actividad de unión.
- El término "célula anfitriona recombinante" (o simplemente "célula hospedadora"), tal como se utiliza en el presente documento, pretende referirse a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Debe entenderse que dichos términos están destinados a referirse no solo a la célula objeto particular sino a la progenie de dicha célula. Debido a que ciertas modificaciones pueden ocurrir en generaciones sucesivas debido a la mutación o influencias ambientales, tal progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero todavía están incluidas dentro del alcance del término "célula huésped" como se utiliza en el presente documento. Las células anfitrionas recombinantes incluyen, por ejemplo, transfectomas, tales como células CHO, células NS/0 y células linfocíticas.
- Como se utiliza en el presente documento, el término "sujeto" incluye cualquier animal humano o no humano. El término "animal no humano" incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc.
- Los términos "animal transgénico" se refieren a un animal que tiene un genoma que comprende uno o más transgenes, preferiblemente transgenes de cadena pesada y/o ligera, o transcromosomas (integrados o no integrados en el ADN genómico natural del animal) y que es preferiblemente capaz de expresar los transgenes. Por ejemplo, un ratón transgénico puede tener un transgén de cadena ligera humana y un transgén de cadena pesada humana o transcromosoma de cadena pesada humana, de manera que el ratón produce anticuerpos humanos anti-GT468 cuando se inmuniza con antígeno GT468 y/o células que expresan GT468. El transgén de la cadena pesada humana puede integrarse en el ADN cromosómico del ratón, como es el caso de los ratones transgénicos, por ejemplo, los ratones HuMAb, como los ratones HCo7 o HCo2, o el transgén de la cadena pesada humana puede mantenerse extracromosómicamente, como es caso para ratones transcromosómicos (por ejemplo, KM) como se describe en el documento WO 02/43478. Dichos ratones transgénicos y transcromosómicos pueden ser capaces de producir múltiples isotipos de anticuerpos monoclonales humanos para GT468 (por ejemplo, IgG, IgA y/o IgE) sometidos a recombinación V-D-J y cambio de isotipo.
- "Reducir" o "inhibir" como se utiliza en este documento significa la capacidad de provocar una disminución global, preferiblemente de 5% o más, 10% o más, 20% o más, más preferiblemente de 50% o más, y más preferiblemente de 75% o mayor en el nivel, por ejemplo, el nivel de proliferación de las células.
- La frase "inhibir la actividad de una célula" o frases similares incluyen una inhibición completa o esencialmente completa de la actividad de la célula y una reducción en la actividad de la célula. Preferiblemente, dicha inhibición de la actividad

de una célula reduce el crecimiento de las células tumorales y/o induce la muerte de las células tumorales y, por lo tanto, tiene un efecto inhibitor de tumores o destructor de tumores.

Mecanismos de acción de mAb

5

Aunque lo que sigue proporciona consideraciones con respecto al mecanismo que subyace a la eficacia terapéutica de los anticuerpos de la enseñanza, no debe considerarse de ninguna manera como limitante de la enseñanza.

10

Los anticuerpos descritos en este documento pueden interactuar con componentes del sistema inmunitario, preferiblemente a través de ADCC o CDC. Los anticuerpos de las enseñanzas también se pueden utilizar para atacar cargas útiles (por ejemplo, radioisótopos, fármacos o toxinas) para destruir directamente células tumorales o se pueden utilizar sinérgicamente con agentes quimioterapéuticos tradicionales, atacando tumores a través de mecanismos de acción complementarios que pueden incluir respuestas inmunes antitumor que pueden haber sido comprometidos debido a los efectos secundarios citotóxicos de un quimioterapéutico sobre los linfocitos T. Sin embargo, los anticuerpos de las enseñanzas también pueden ejercer un efecto simplemente uniéndose a GT468 en la superficie celular, por lo tanto, por ejemplo, bloqueando la proliferación de las células.

15

Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos

20

ADCC describe la capacidad de matar células de células efectoras como se describe en el presente documento, en particular linfocitos, que preferiblemente requieren que la célula objetivo esté marcada por un anticuerpo.

25

La ADCC se produce preferiblemente cuando los anticuerpos se unen a antígenos en las células tumorales y los dominios Fc del anticuerpo activan los receptores Fc (FcR) en la superficie de las células efectoras inmunitarias. Se han identificado varias familias de receptores de Fc, y las poblaciones celulares específicas expresan característicamente receptores de Fc definidos. La ADCC se puede ver como un mecanismo para inducir directamente un grado variable de eliminación tumoral inmediata que conduce a la presentación del antígeno y a la inducción de respuestas de células T dirigidas por el tumor. Preferiblemente, la inducción in vivo de ADCC conducirá a respuestas de células T dirigidas por el tumor y respuestas de anticuerpos derivadas del huésped.

30

Citotoxicidad dependiente del complemento

35

CDC es otro método de eliminación celular que puede ser dirigido por anticuerpos. IgM es el isotipo más efectivo para la activación del complemento. IgG1 e IgG3 también son muy eficaces para dirigir CDC a través de la vía clásica de activación del complemento. Preferiblemente, en esta cascada, la formación de complejos antígeno-anticuerpo da como resultado el descubrimiento de múltiples sitios de unión C1q muy próximos en los dominios C_H2 de moléculas de anticuerpo participantes tales como moléculas IgG (C1q es uno de los tres subcomponentes del complemento C1). Preferiblemente, estos sitios de unión C1q descubiertos convierten la interacción C1q-IgG de baja afinidad a una de alta avidéz, que desencadena una cascada de eventos que implican una serie de otras proteínas del complemento y conduce a la liberación proteolítica de los agentes quimiotácticos/activadores de células efectoras C3a y C5a. Preferiblemente, la cascada del complemento termina en la formación de un complejo de ataque a la membrana, que crea poros en la membrana celular que facilitan el paso libre de agua y solutos hacia y desde la célula.

40

Producción de anticuerpos

45

Los anticuerpos de la enseñanza se pueden producir mediante una variedad de técnicas, que incluyen metodología convencional de anticuerpos monoclonales, por ejemplo, la técnica de hibridación de células somáticas estándar de Kohler and Milstein, Nature 256: 495 (1975). Aunque se prefieren los procedimientos de hibridación de células somáticas, en principio, se pueden emplear otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales, por ejemplo, la transformación viral u oncogénica de linfocitos B o técnicas de presentación en fagos utilizando colecciones de genes de anticuerpos.

50

El sistema animal preferido para preparar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales es el sistema murino. La producción de hibridoma en el ratón es un procedimiento muy bien establecido. Los protocolos y técnicas de inmunización para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para la fusión son conocidos en la técnica. Los socios de fusión (por ejemplo, células de mieloma murino) y los procedimientos de fusión también son conocidos.

55

Otros sistemas animales preferidos para preparar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales son el sistema de rata y conejo (por ejemplo, descrito en Spieker-Polet et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92: 9348 (1995), ver también Rossi et al., Am. J. Clin. Pathol. 124: 295 (2005)).

60

En aún otra realización preferida, los anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra GT468 pueden generarse utilizando ratones transgénicos o transcromosómicos que portan partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema del ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones conocidos como ratones HuMAb y ratones KM, respectivamente, y se denominan colectivamente aquí como "ratones transgénicos". "La producción de anticuerpos humanos en tales ratones transgénicos se puede realizar como se describe en detalle para CD20 en WO2004 035607

65

Todavía otra estrategia para generar anticuerpos monoclonales es aislar directamente genes que codifican anticuerpos de linfocitos que producen anticuerpos de estrategia definida, por ejemplo, ver Babcock et al., 1996; Una nueva estrategia para generar anticuerpos monoclonales a partir de linfocitos únicos y aislados que producen anticuerpos de estrategia definida. Para obtener detalles sobre la ingeniería de anticuerpos recombinantes, ver también Welschof and Kraus, Antibombas recombinantes para terapia del cáncer ISBN-0-89603-918-8 y Benny K.C. Lo Antibody Engineering ISBN 1-58829-092-1.

Inmunizaciones

Para generar anticuerpos contra GT468, los ratones pueden inmunizarse con péptidos conjugados con portadores derivados de la secuencia GT468, una preparación enriquecida de antígeno GT468 expresado de forma recombinante o fragmentos de estos y/o células que expresan GT468, como se describe. Alternativamente, los ratones pueden inmunizarse con ADN que codifica GT468 humana de longitud completa (por ejemplo, SEQ ID No: 1) o fragmentos de estos, en particular los que codifican las SEQ ID Nos: 3-10 y 35-82. En el caso de que las inmunizaciones que utilizan una preparación purificada o enriquecida del antígeno GT468 no den como resultado anticuerpos, los ratones también pueden inmunizarse con células que expresan GT468, por ejemplo, una línea celular, para promover respuestas inmunitarias.

La respuesta inmunitaria puede controlarse a lo largo del protocolo de inmunización con muestras de plasma y suero que se obtienen por vena de la cola o hemorragias retroorbitarias. Se pueden utilizar ratones con suficientes valores de inmunoglobulina anti-GT468 para las fusiones. Los ratones pueden reforzarse por vía intraperitoneal o intravenosa con células que expresan GT468 3 días antes del sacrificio y la extracción del bazo para aumentar la tasa de hibridomas que secretan anticuerpos específicos.

Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales

Para generar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales para GT468, los esplenocitos y las células de ganglios linfáticos de ratones inmunizados se pueden aislar y fusionar a una línea celular inmortalizada apropiada, tal como una línea celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes se pueden cribar para la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Los pozos individuales se pueden cribar mediante ELISA para hibridomas que secretan anticuerpos. Mediante análisis de inmunofluorescencia y FACS utilizando células que expresan GT468, se pueden identificar anticuerpos con especificidad para GT468. Los hibridomas que secretan anticuerpos se pueden volver a replantar, cribar de nuevo, y si todavía son positivos para anti-GT468, los anticuerpos monoclonales se pueden subclonar mediante dilución limitante. Los subclones estables pueden cultivarse in vitro para generar anticuerpos en un medio de cultivo tisular para su caracterización.

Generación de transfectomas que producen anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos de la invención también pueden producirse en un transfectoma de célula anfitriona utilizando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección génica como son bien conocidos en la técnica (Morrison, S. (1985) Science 229: 1202).

Por ejemplo, en una realización, los genes de interés, por ejemplo, genes de anticuerpos, pueden ligarse en un vector de expresión tal como un plásmido de expresión eucariota tal como el usado por el sistema de expresión del gen GS descrito en WO 87/04462, WO. 89/01036 y EP 338 841 u otros sistemas de expresión bien conocidos en la técnica. El plásmido purificado con los genes de anticuerpo clonados se puede introducir en células anfitrionas eucarióticas tales como células CHO, células NS/0, células HEK293T o células HEK293 o, alternativamente, otras células eucarióticas como células derivadas de plantas, células fúngicas o de levadura. El método usado para introducir estos genes puede ser un método descrito en la técnica tal como electroporación, lipofectina, lipofectamina u otros. Después de la introducción de estos genes de anticuerpos en las células huésped, las células que expresan el anticuerpo se pueden identificar y seleccionar. Estas células representan los transfectomas que luego pueden amplificarse para su nivel de expresión y ampliarse para producir anticuerpos. Los anticuerpos recombinantes se pueden aislar y purificar a partir de estos sobrenadantes y/o células de cultivo.

Alternativamente, los genes del anticuerpo clonado se pueden expresar en otros sistemas de expresión, que incluyen células procarióticas, tales como microorganismos, por ejemplo, E. coli. Además, los anticuerpos pueden producirse en animales transgénicos no humanos como en leche de ovejas y conejos o en huevos de gallinas, o en plantas transgénicas; ver p. Verma, R., et al. (1998) J. Immunol. Meth. 216: 165-181; Pollock, et al. (1999) J. Immunol. Meth. 231: 147-157; y Fischer, R., et al. (1999) Biol. Chem. 380: 825-839.

Uso de secuencias de anticuerpos parciales para expresar anticuerpos intactos (es decir, humanización y quimerización).

a) Quimerización

Los anticuerpos monoclonales murinos se pueden utilizar como anticuerpos terapéuticos en seres humanos cuando se marcan con toxinas o isótopos radiactivos. Los anticuerpos murinos no marcados son altamente inmunogénicos en el

hombre cuando se aplican repetidamente, lo que conduce a la reducción del efecto terapéutico. La inmunogenicidad principal está mediada por las regiones constantes de la cadena pesada. La inmunogenicidad de los anticuerpos murinos en el hombre puede reducirse o evitarse completamente si los anticuerpos respectivos se quimerizan o se humanizan. Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos, cuyas diferentes partes se derivan de diferentes especies animales, tales como las que tienen una región variable derivada de un anticuerpo murino y una región constante de inmunoglobulina humana. La quimerización de anticuerpos se logra uniendo las regiones variables de la cadena pesada y ligera del anticuerpo murino con la región constante de cadena pesada y ligera humana (por ejemplo, como describen Kraus et al., en la serie *Methods in Molecular Biology*, anticuerpos recombinantes para cáncer terapia ISBN-O- 89603-918-8). En una realización preferida, se generan anticuerpos quiméricos uniendo la región constante de la cadena ligera kappa humana con la región variable de la cadena ligera murina. En una realización también preferida, se pueden generar anticuerpos quiméricos uniendo la región constante de la cadena lambda-liviana humana con la región variable de la cadena ligera murina. Las regiones constantes de cadena pesada preferidas para la generación de anticuerpos quiméricos son IgG1, IgG3 e IgG4. Otras regiones constantes de cadena pesada preferidas para la generación de anticuerpos quiméricos son IgG2, IgA, IgD e IgM.

15 b) Humanización

Los anticuerpos interactúan con antígenos objetivo predominantemente a través de residuos de aminoácidos que están localizados en las seis regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada y ligera (CDR). Por esta razón, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDR son más diversas entre los anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Debido a que las secuencias CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de anticuerpos naturales específicos construyendo vectores de expresión que incluyen secuencias CDR del anticuerpo natural específico injertado en secuencias marco de un anticuerpo diferente con diferentes propiedades (véase, por ejemplo, Riechmann, L. et al. (1998) *Nature* 332: 323-327; Jones, P. et al. (1986) *Nature* 321: 522-525; y Queen, C. et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86: 10029-10033). Dichas secuencias marco pueden obtenerse a partir de bases de datos de ADN públicas que incluyen secuencias génicas de anticuerpos de línea germinal. Estas secuencias de la línea germinal diferirán de las secuencias del gen del anticuerpo maduro porque no incluirán genes variables completamente ensamblados, que están formados por la unión V (D) J durante la maduración de las células B. Las secuencias génicas de la línea germinal también diferirán de las secuencias de un anticuerpo del repertorio secundario de alta afinidad en individuos de manera uniforme en toda la región variable. Por ejemplo, las mutaciones somáticas son relativamente infrecuentes en la porción amino terminal de la región marco 1 y en la porción carboxi terminal de la región marco 4. Además, muchas mutaciones somáticas no alteran significativamente las propiedades de unión del anticuerpo. Por esta razón, no es necesario obtener la secuencia de ADN completa de un anticuerpo particular para recrear un anticuerpo recombinante intacto que tenga propiedades de unión similares a las del anticuerpo original (véase el documento WO 99/45962). Las secuencias parciales de cadena pesada y ligera que abarcan las regiones CDR son típicamente suficientes para este propósito. La secuencia parcial se utiliza para determinar qué parte de la línea germinal y segmentos génicos de unión contribuyeron a los genes variables de anticuerpos recombinados. La secuencia de la línea germinal se utiliza para completar las partes faltantes de las regiones variables. Las secuencias líderes de la cadena pesada y ligera se escinden durante la maduración de la proteína y no contribuyen a las propiedades del anticuerpo final. Para añadir secuencias faltantes, las secuencias de ADN clonadas se pueden combinar con oligonucleótidos sintéticos mediante ligación o amplificación por PCR. Alternativamente, la región variable completa puede sintetizarse como un grupo de oligonucleótidos cortos que se sobreponen y se combinan mediante amplificación por PCR para crear un clon de región variable completamente sintético. Este proceso tiene ciertas ventajas tales como eliminación o inclusión o sitios de restricción particulares, u optimización de codones particulares.

Las secuencias de nucleótidos de transcritos de cadena pesada y ligera a partir de hibridomas se utilizan para diseñar un conjunto de oligonucleótidos sintéticos superpuestos para crear secuencias V sintéticas con capacidades de codificación de aminoácidos idénticas a las secuencias naturales. Las secuencias sintéticas pesada y de cadena kappa pueden diferir de las secuencias naturales de tres maneras: cadenas de bases de nucleótidos repetidas se interrumpen para facilitar la síntesis de oligonucleótidos y la amplificación por PCR; los sitios de inicio de traducción óptimos se incorporan de acuerdo con las reglas de Kozak (Kozak, 1991, *J. Biol. Chem.* 266: 19867-19870); y los sitios HindIII están diseñados aguas arriba de los sitios de iniciación de la traducción.

Para las regiones variables tanto de cadena pesada como ligera, la codificación optimizada y las secuencias de hebra no codificantes correspondientes se descomponen en 30-50 nucleótidos aproximadamente en el punto medio del correspondiente oligonucleótido no codificante. Por lo tanto, para cada cadena, los oligonucleótidos se pueden ensamblar en conjuntos de doble cadena superpuestos que abarcan segmentos de 150-400 nucleótidos. Las agrupaciones se utilizan a continuación como plantillas para producir productos de amplificación por PCR de 150-400 nucleótidos. Típicamente, un conjunto único de oligonucleótidos de la región variable se dividirá en dos conjuntos que se amplifican por separado para generar dos productos de PCR de sobreposición. Estos productos superpuestos se combinan luego mediante amplificación por PCR para formar la región variable completa. También puede ser deseable incluir un fragmento de sobreposición de la región constante de la cadena pesada o ligera en la amplificación por PCR para generar fragmentos que pueden clonarse fácilmente en las construcciones del vector de expresión.

Las regiones variables de cadena pesada y ligera quimerizadas o humanizadas reconstruidas se combinan a continuación con promotor clonado, líder, iniciación de traducción, región constante, 3' no traducida, poliadenilación y secuencias de

5 terminación de la transcripción para formar construcciones de vector de expresión. Las construcciones de expresión de
 10 cadena pesada y ligera se pueden combinar en un solo vector, cotransfectarse, transfectarse en serie o transfectarse por
 separado en células anfitrionas que luego se fusionan para formar una célula anfitriona que expresa ambas cadenas. Se
 describen plásmidos para uso en la construcción de vectores de expresión para IgGk humana. Los plásmidos se pueden
 5 construir de modo que las secuencias de ADNc de la cadena ligera V pesada y V kappa amplificadas por PCR puedan
 usarse para reconstruir los minigenes completos de cadena pesada y ligera. Estos plásmidos se pueden utilizar para
 expresar anticuerpos IgG1, Kappa o IgG4, Kappa completamente humanos o quiméricos. Se pueden construir plásmidos
 similares para la expresión de otros isotipos de cadena pesada, o para la expresión de anticuerpos que comprenden
 10 cadenas ligeras lambda.

10 Por lo tanto, en otro aspecto de la invención, las características estructurales de los anticuerpos anti-GT468 de la invención
 se utilizan para crear anticuerpos anti-GT468 humanizados estructuralmente relacionados que retienen por lo menos una
 propiedad funcional de los anticuerpos de la invención, tales como la unión a GT468. Más específicamente, una o más
 15 regiones CDR de anticuerpos monoclonales de ratón pueden combinarse de forma recombinante con regiones
 flanqueantes humanas conocidas y CDR para crear anticuerpos anti-GT468 humanizados, de ingeniería recombinante,
 adicionales de la invención.

Unión a células que expresan antígeno

20 La capacidad del anticuerpo para unirse a GT468 se puede determinar utilizando ensayos de unión estándar, tales como
 los expuestos en los ejemplos (por ejemplo, ELISA, transferencia de Western, inmunofluorescencia y análisis de citometría
 de flujo)

Aislamiento y caracterización de anticuerpos

25 Para purificar anticuerpos anti-GT468, se pueden cultivar hibridomas seleccionados en frascos giratorios de dos litros
 para la purificación de anticuerpos monoclonales. Alternativamente, los anticuerpos anti-GT468 se pueden producir en
 biorreactores basados en diálisis. Los sobrenadantes pueden filtrarse y, si es necesario, concentrarse antes de la
 30 cromatografía de afinidad con proteína G-sefarosa o proteína A-sefarosa. El IgG eluido puede controlarse mediante
 electroforesis en gel y cromatografía líquida de alta resolución para garantizar la pureza. La solución tampón puede
 intercambiarse en PBS, y la concentración se puede determinar mediante OD280 utilizando el coeficiente de extinción
 1.43. Los anticuerpos monoclonales se pueden dividir en alícuotas y almacenar a -80 °C.

35 Para determinar si los anticuerpos monoclonales anti-GT468 seleccionados se unen a epítomos únicos, se puede utilizar
 la mutagénesis dirigida al sitio o dirigida a múltiples sitios.

Determinación del isotipo

40 Para determinar el isotipo de anticuerpos purificados, el isotipo ELISA con varios kits comerciales (por ejemplo, Zymed,
 Roche Diagnostics) se puede realizar. Los pozos de las placas de microtitulación se pueden recubrir con Ig anti-ratón.
 Después del bloqueo, las placas se hacen reaccionar con anticuerpos monoclonales o controles de isotipo purificado, a
 temperatura ambiente durante dos horas. Los pozos pueden hacerse reaccionar con IgG1 de ratón, IgG2a, IgG2b o IgG3,
 45 IgA o sondas conjugadas con peroxidasa específicas de IgM de ratón. Después del lavado, las placas pueden
 desarrollarse con sustrato ABTS (1 mg/ml) y analizarse a una DO de 405-650. Alternativamente, se puede utilizar el equipo
 IsoStrip Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit (Roche, Cat. No. 1493027) como lo describe el fabricante.

Análisis citométrico de flujo

50 Con el fin de demostrar la presencia de anticuerpos anti-GT468 en sueros de ratones inmunizados o la unión de
 anticuerpos monoclonales a células vivas que expresan GT468, se puede utilizar citometría de flujo. Las líneas celulares
 que expresan naturalmente o después de transfección GT468 y los controles negativos que carecen de expresión GT468
 (cultivados en condiciones de crecimiento estándar) pueden mezclarse con diversas concentraciones de anticuerpos
 monoclonales en sobrenadantes de hibridoma o en PBS que contiene 1% de FBS, y pueden incubarse a 4°C durante 30
 55 minutos. Después del lavado, el anticuerpo anti IgG marcado con APC o Alexa647 puede unirse al anticuerpo monoclonal
 unido a GT468 en las mismas condiciones que la tinción del anticuerpo primario. Las muestras se pueden analizar
 mediante citometría de flujo con un instrumento FACS que usa propiedades de luz y dispersión lateral para atravesar las
 células vivas únicas. Con el fin de distinguir los anticuerpos monoclonales específicos de GT468 de los aglutinantes no
 60 específicos en una sola medición, se puede emplear el método de cotransfección. Las células transfectadas
 transitoriamente con plásmidos que codifican GT468 y un marcador fluorescente pueden teñirse tal como se describió
 anteriormente. Las células transfectadas se pueden detectar en un canal de fluorescencia diferente que las células teñidas
 con anticuerpo. Como la mayoría de las células transfectadas expresan ambos transgenes, los anticuerpos monoclonales
 específicos de GT468 se unen preferentemente a las células que expresan el marcador de fluorescencia, mientras que
 65 los anticuerpos no específicos se unen en una relación comparable a las células no transfectadas. Se puede utilizar un
 ensayo alternativo utilizando microscopía de fluorescencia además o en lugar del ensayo de citometría de flujo. Las células
 pueden teñirse exactamente como se describió anteriormente y examinarse mediante microscopía de fluorescencia.

Microscopía de inmunofluorescencia

Con el fin de demostrar la presencia de anticuerpos anti-GT468 en sueros de ratones inmunizados o la unión de anticuerpos monoclonales a células vivas que expresan GT468, se puede utilizar el análisis por microscopía de inmunofluorescencia. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan espontáneamente o después de transfección GT468 y controles negativos que carecen de expresión GT468 se cultivan en portaobjetos en condiciones de crecimiento estándar en medio DMEM/F12, suplementado con suero de ternera fetal al 10% (FCS), L-glutamina 2 mM, 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. Las células pueden fijarse entonces con metanol o paraformaldehído o dejarse sin tratar. Las células pueden reaccionar con anticuerpos monoclonales contra GT468 durante 30 minutos, a 25°C. Después del lavado, las células pueden hacerse reaccionar con un anticuerpo secundario IgG anti-ratón marcado con Alexa555 (Molecular Probes) en las mismas condiciones. Las células pueden luego examinarse mediante microscopía de fluorescencia.

Los niveles totales de GT468 en las células se pueden observar cuando las células son fijadas con metanol o fijadas con paraformaldehído y permeabilizadas con Triton X-100. Se pueden examinar las células vivas y la localización de la superficie de las células fijadas con paraformaldehído no permeabilizado de GT468. Adicionalmente, la orientación de GT468 a uniones estrechas se puede analizar mediante co-tinción con marcadores de unión ajustados tales como ZO-1. Además, se pueden examinar los efectos de la unión del anticuerpo y la localización de GT468 dentro de la membrana celular.

Western Blot

Anti-GT468 IgG puede analizarse adicionalmente para determinar su reactividad con el antígeno GT468 mediante transferencia Western. Brevemente, se pueden preparar extractos celulares de células que expresan GT468 y controles negativos apropiados y someterlos a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS). Después de la electroforesis, los antígenos separados se transferirán a membranas de nitrocelulosa, se bloquearán y se sondarán con los anticuerpos monoclonales que se analizarán. La unión a IgG se puede detectar utilizando peroxidasa IgG anti-ratón y desarrollar con sustrato ECL.

Inmunohistoquímica

Las IgG de ratón anti-GT468 pueden analizarse adicionalmente para determinar la reactividad con el antígeno GT468 mediante inmunohistoquímica de una manera bien conocida por el experto, por ejemplo, utilizando paraformaldehído o acetona, secciones fijas de tejido fijadas con paraformaldehído de tejido no canceroso o muestras de tejido canceroso obtenidas de pacientes durante procedimientos quirúrgicos rutinarios o de ratones portadores de tumores xenoinjertados inoculados con líneas celulares que expresan espontáneamente o después de la transfección GT468. Para la inmunotinción, se pueden incubar anticuerpos reactivos a GT468 seguidos por anticuerpos de cabra anti-ratón o anti-conejo de cabra conjugados con peroxidasa de rábano (DAKO) de acuerdo con las instrucciones de los proveedores.

Actividades fagocíticas y de eliminación celular de anticuerpos in vitro

Además de unirse específicamente a GT468, los anticuerpos anti-GT468 se pueden probar para determinar su capacidad para mediar en la fagocitosis y la muerte de células que expresan GT468 y/o que se caracteriza por la asociación de GT468 con su superficie celular. La prueba de la actividad de anticuerpos monoclonales in vitro proporcionará una selección inicial antes de probar modelos in vivo.

Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC):

Brevemente, las células polimorfonucleares (PMN), células NK, monocitos, células mononucleares u otras células efectoras, de donantes sanos se pueden purificar mediante centrifugación en densidad Ficoll Hypaque, seguido de lisis de eritrocitos contaminantes. Las células efectoras lavadas pueden suspenderse en RPMI suplementado con 10% de suero de ternera fetal inactivado por calor o, alternativamente, con suero humano inactivado con calor al 5% y mezclado con células objetivo marcadas con ⁵¹Cr que expresan GT468 y/o caracterizadas por asociación de GT468 con su superficie celular, a varias proporciones de células efectoras para dirigirse a las células. Alternativamente, las células objetivo se pueden marcar con un ligando potenciador de fluorescencia (BATDA). Un quelato altamente fluorescente de Europium con el ligando potenciador que se libera de las células muertas se puede medir con un fluorómetro. Otra técnica alternativa puede utilizar la transfección de células objetivo con luciferasa. El amarillo lucifer añadido puede ser luego oxidado solo por células viables. Las IgG anti-GT468 purificadas se pueden agregar luego en diversas concentraciones. La IgG humana irrelevante se puede utilizar como control negativo. Los ensayos se pueden llevar a cabo durante 4 a 20 horas a 37°C, dependiendo del tipo de célula efectora utilizada. Las muestras pueden analizarse para determinar la citólisis midiendo la liberación de ⁵¹Cr o la presencia del quelato de EuTDA en el sobrenadante del cultivo. Alternativamente, la luminiscencia resultante de la oxidación del amarillo lucifer puede ser una medida de células viables.

Los anticuerpos monoclonales anti-GT468 también se pueden analizar en diversas combinaciones para determinar si la citólisis se potencia con múltiples anticuerpos monoclonales.

Citotoxicidad dependiente del complemento (CDC):

Los anticuerpos monoclonales anti-GT468 pueden analizarse para determinar su capacidad para mediar en CDC utilizando una variedad de técnicas conocidas. Por ejemplo, el suero para el complemento se puede obtener de la sangre de una manera conocida por el experto. Para determinar la actividad CDC de los mAbs, se pueden utilizar diferentes métodos. La liberación de ⁵¹Cr se puede medir, por ejemplo, o la permeabilidad de membrana elevada se puede evaluar utilizando un ensayo de exclusión de yoduro de propidio (PI). Brevemente, las células objetivo se pueden lavar y se pueden incubar 5 x 10⁵/ml con diversas concentraciones de mAb durante 10-30 minutos. a temperatura ambiente o a 37°C. Luego puede agregarse suero o plasma a una concentración final de 20% (v/v) y las células incubarse a 37°C durante 20-30 minutos. Todas las células de cada muestra se pueden agregar a la solución PI en un tubo FACS. La mezcla puede analizarse inmediatamente mediante análisis de citometría de flujo utilizando una matriz FACS.

En un ensayo alternativo, la inducción de CDC se puede determinar en células adherentes. En una realización de este ensayo, las células se siembran 24 h antes del ensayo con una densidad de 3 x 10⁴/pozo en placas de microtitulación de fondo plano de cultivo tisular. Al día siguiente, se elimina el medio de crecimiento y las células se incuban por triplicado con anticuerpos. Las células de control se incuban con medio de crecimiento o medio de crecimiento que contiene 0.2% de saponina para la determinación de la lisis de fondo y la lisis máxima, respectivamente. Después de la incubación durante 20 min. a temperatura ambiente, se elimina el sobrenadante y se agrega plasma o suero humano al 20% (v/v) en DMEM (precalentado a 37°C) a las células y se incuba durante otros 20 min a 37°C. Todas las células de cada muestra se agregan a la solución de yoduro de propidio (10 µg/ml). Luego, los sobrenadantes se reemplazan por PBS que contiene 2-5 µg/ml de bromuro de etidio y la emisión de fluorescencia por excitación a 520 nm se mide a 600 nm utilizando un Tecan Safire. El porcentaje de lisis específica se calcula de la siguiente manera: % de lisis específica = (fondo de fluorescencia de muestra-fluorescencia)/(fondo de fluorescencia de lisis máxima-fluorescencia) x 100.

Inhibición de la proliferación celular por anticuerpos monoclonales:

Para probar la capacidad de iniciar la apoptosis, los anticuerpos monoclonales anti-GT468 pueden, por ejemplo, incubarse con células tumorales positivas para GT468 o células tumorales transfectadas con GT468 a 37°C durante aproximadamente 20 horas. Las células se pueden cosechar, lavar en tampón de unión a anexina-V (BD biosciences) e incubar con anexina V conjugada con FITC o APC (BD biosciences) durante 15 min. en la oscuridad. Todas las células de cada muestra pueden agregarse a la solución de PI (10 µg/ml en PBS) en un tubo FACS y evaluarse inmediatamente mediante citometría de flujo (como anteriormente). Alternativamente, se puede detectar una inhibición general de la proliferación celular por anticuerpos monoclonales con kits disponibles comercialmente. El kit de proliferación celular DELFIA (Perkin-Elmer, Cat. No. AD0200) es un inmunoensayo no isotópico basado en la medición de la incorporación de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) durante la síntesis de ADN de células proliferantes en microplacas. BrdU incorporado se detecta utilizando anticuerpo monoclonal marcado con europio. Para permitir la detección de anticuerpos, las células se fijan y se desnaturaliza el ADN con la solución Fix. El anticuerpo no unido se elimina por lavado y se agrega DELFIA inductor para disociar los iones de europio del anticuerpo marcado en solución, donde forman quelatos altamente fluorescentes con componentes del inductor DELFIA. La fluorescencia medida, que utiliza la fluorometría resuelta en el tiempo en la detección, es proporcional a la síntesis de ADN en la célula de cada pozo.

Estudios preclínicos

Los anticuerpos monoclonales que se unen a GT468 también pueden analizarse en un modelo in vivo (por ejemplo, en ratones inmunodeficientes portadores de tumores xenoinjertados inoculados con líneas celulares que expresan GT468, posiblemente después de la transfección) para determinar su eficacia en el control del crecimiento de células tumorales que expresan GT468.

Los estudios in vivo después del xenoinjerto de células tumorales que expresan GT468 en ratones inmunocomprometidos u otros animales pueden realizarse utilizando anticuerpos de la invención. Los anticuerpos se pueden administrar a ratones libres de tumor seguido de la inyección de células tumorales para medir los efectos de los anticuerpos para evitar la formación de tumores o síntomas relacionados con el tumor. Los anticuerpos se pueden administrar a ratones portadores de tumores para determinar la eficacia terapéutica de los anticuerpos respectivos para reducir el crecimiento tumoral, la metástasis o los síntomas relacionados con el tumor. La aplicación de anticuerpos se puede combinar con la aplicación de otras sustancias como fármacos citostáticos, inhibidores del factor de crecimiento, bloqueadores del ciclo celular, inhibidores de la angiogénesis u otros anticuerpos para determinar la eficacia sinérgica y la toxicidad potencial de las combinaciones. Para analizar los efectos secundarios tóxicos mediados por los anticuerpos de la invención, los animales se pueden inocular con anticuerpos o reactivos de control y se pueden investigar exhaustivamente los síntomas posiblemente relacionados con la terapia con el anticuerpo GT468. Los posibles efectos secundarios de la aplicación in vivo de los anticuerpos GT468 incluyen particularmente la toxicidad en los tejidos que expresan GT468, incluida la placenta. Anticuerpos que reconocen GT468 en humanos y en otras especies, por ejemplo, ratones, son particularmente útiles para predecir los efectos secundarios potenciales mediados por la aplicación de anticuerpos monoclonales GT468 en humanos.

Mapeo de epítomos

El mapeo de epítomos reconocidos por anticuerpos de la invención se puede realizar como se describe en detalle en "Protocolos de mapeo de epítomos (Métodos en biología molecular) por Glenn E. Morris ISBN-089603-375-9 y en, Mapeo de epítomos: un enfoque práctico" Práctico Approach Series, 248 por Olwyn MR Westwood, Frank C. Hay.

5 I. Moléculas biespecíficas/multiespecíficas que se unen a GT468

En otra realización más de las enseñanzas, los anticuerpos contra GT468 pueden derivarse o unirse a otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, un fragmento Fab') para generar un biespecífico o molécula multispecífica que se une a múltiples sitios de unión o epítomos objetivo. Por ejemplo, un anticuerpo de las enseñanzas puede estar funcionalmente unido (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) a una o más moléculas de unión diferentes, tales como otro anticuerpo, péptido o imitador de unión.

De acuerdo con lo anterior, las actuales enseñanzas incluyen moléculas biespecíficas y multispecíficas que comprenden por lo menos una primera especificidad de unión para GT468 y una segunda especificidad de unión para un segundo epítomo objetivo. En una realización particular de las enseñanzas, el segundo epítomo objetivo es un receptor de Fc, por ejemplo, Fc-gammaRI humano (CD64) o un receptor de Fc-alfa humano (CD89), o un receptor de células T, por ejemplo, CD3. Por lo tanto, las enseñanzas incluyen moléculas biespecíficas y multispecíficas capaces de unirse tanto a células efectoras que expresan Fc-gammaR, Fc-alfaR o Fc-epsilonR (por ejemplo, monocitos, macrófagos o células polimorfonucleares (PMN)), como a células objetivo que expresan GT468 y/o caracterizado por la asociación de GT468 con su superficie celular. Estas moléculas biespecíficas y multispecíficas pueden dirigirse a células que expresan GT468 y/o que se caracteriza por asociación de GT468 con su superficie celular a células efectoras y pueden desencadenar actividades de células efectoras mediadas por receptor de Fc, tales como fagocitosis de células que expresan GT468 y/o caracterizadas por asociación de GT468 con su superficie celular, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), liberación de citocinas o generación de anión superóxido.

Las moléculas biespecíficas y multispecíficas de las enseñanzas pueden incluir además una tercera especificidad de unión, además de una especificidad de unión anti-Fc y una especificidad de unión anti-GT468. En una realización, la tercera especificidad de unión es una parte del factor anti-potenciación (EF), por ejemplo, una molécula que se une a una proteína de superficie implicada en la actividad citotóxica y de ese modo aumenta la respuesta inmunitaria contra la célula objetivo. La "porción de factor anti-potenciación" puede ser un anticuerpo, fragmento de anticuerpo funcional o un ligando que se une a una molécula dada, por ejemplo, un antígeno o un receptor, y de ese modo da lugar a una mejora del efecto de los determinantes de unión para el Fc receptor o antígeno de la célula objetivo. La "parte del factor anti-potenciación" puede unirse a un receptor de Fc o a un antígeno de célula objetivo. Alternativamente, la parte del factor anti-potenciación puede unirse a una entidad que es diferente de la entidad a la que se unen las especificidades de unión primera y segunda. Por ejemplo, la porción del factor anti-potenciación puede unir una célula T citotóxica (por ejemplo, a través de CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 u otra célula inmunitaria que produce una respuesta inmunitaria incrementada contra la célula objetivo).

En una realización, las moléculas biespecíficas y multispecíficas de las enseñanzas comprenden como especificidad de unión por lo menos un anticuerpo, que incluye, por ejemplo, un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv o un Fv de cadena simple. El anticuerpo también puede ser un dímero de cadena ligera o de cadena pesada, o cualquier fragmento mínimo del mismo tal como un Fv o una construcción de cadena simple como se describe en Ladner et al., documento US 4,946,778. El anticuerpo también puede ser una proteína de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión como se describe en los documentos US2003/0118592 y US 2003/0133939.

En una realización, las moléculas biespecíficas y multispecíficas de las enseñanzas comprenden una especificidad de unión para un Fc-gammaR o un Fc-alfaR presente en la superficie de una célula efectora, y una segunda especificidad de unión para un antígeno de célula objetivo, por ejemplo, GT468.

En una realización, la especificidad de unión para un receptor de Fc es proporcionada por un anticuerpo monoclonal, cuya unión no está bloqueada por inmunoglobulina G (IgG) humana. Como se utiliza en el presente documento, el término "receptor de IgG" se refiere a cualquiera de los ocho genes de cadena gamma localizados en el cromosoma 1. Estos genes codifican un total de doce isoformas de receptores transmembrana o solubles que se agrupan en tres clases de receptores Fc-gamma: Fc-gammaRI (CD64), Fc-gammaRII (CD32) y Fc-gammaRIII (CD16). En una realización preferida, el receptor Fc-gamma es un Fc-gammaRI de alta afinidad humana.

La producción y caracterización de estos anticuerpos monoclonales preferidos están descritas por Fanger et al. en el documento WO 88/00052 y en el documento US 4.954.617. Estos anticuerpos se unen a un epítomo de Fc-gammaRI, Fc-gammaRII o Fc-gammaRIII en un sitio que es distinto del sitio de unión del receptor Fcγ y, por lo tanto, su unión no está bloqueada sustancialmente por niveles fisiológicos de IgG. Los anticuerpos específicos anti-Fc-gammaRI útiles en estas enseñanzas son mAb 22, mAb 32, mAb 44, mAb 62 y mAb 197. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-receptor Fcγ es una forma humanizada del anticuerpo monoclonal 22 (H22). La producción y caracterización del anticuerpo H22 se describe en Graziano, R.F. et al. (1995) J. Immunol. 155 (10): 4996-5002 y WO 94/10332. La línea celular productora de anticuerpos H22 se depositó en la American Type Culture Collection el 4 de noviembre de 1992 bajo la designación HAO22CL1 y tiene el número de acceso CRL 11177.

En otras realizaciones preferidas, la especificidad de unión para un receptor de Fc es proporcionada por un anticuerpo que se une a un receptor de IgA humana, por ejemplo, un receptor de Fc-alfa (Fc-alfaRI (CD89)), cuya unión preferiblemente no está bloqueada por inmunoglobulina A humana (IgA). El término "receptor de IgA" pretende incluir el producto génico de un gen alfa (Fc-alfaRI) localizado en el cromosoma 19. Se sabe que este gen codifica varias isoformas transmembrana empalmadas alternativamente de 55 a 110 K_{Da}. Fc-alfaRI (CD89) se expresa constitutivamente en monocitos/macrófagos, granulocitos eosinófilos y neutrófilos, pero no en poblaciones de células no efectoras. Fc-alfaRI tiene una afinidad media para IgA1 e IgA2, que aumenta con la exposición a citoquinas tales como G-CSF o GM-CSF (Morton, H.C. 1996) *Critical Reviews in Immunology* 16: 423-440). Se han descrito cuatro anticuerpos monoclonales específicos de Fc-alfaRI, identificados como A3, A59, A62 y A77, que se unen a Fc-alfaRI fuera del dominio de unión al ligando de IgA (Monteiro, R.C. et al. (1992) *J. Immunol.* 148: 1764).

Fc-alfaRI y Fc-gammaRI son receptores desencadenantes preferidos para utilizar en las enseñanzas porque (1) se expresan principalmente en células efectoras inmunitarias, por ejemplo, monocitos, PMN, macrófagos y células dendríticas; (2) se expresan a altos niveles (por ejemplo, 5.000-100.000 por célula); (3) son mediadores de actividades citotóxicas (por ejemplo, ADCC, fagocitosis); (4) mediar en la presentación mejorada de antígenos de los antígenos, incluidos autoantígenos, dirigidos a ellos.

En otra realización, la molécula biespecífica está compuesta por dos anticuerpos monoclonales de acuerdo con las enseñanzas que tienen actividades funcionales complementarias, tales como un anticuerpo que funciona predominantemente induciendo CDC y el otro anticuerpo que funciona predominantemente induciendo apoptosis.

Un "anticuerpo específico de célula efectora" como se utiliza en el presente documento se refiere a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo funcional que se une al receptor de Fc de células efectoras. Los anticuerpos preferidos para uso en las actuales enseñanzas se unen al receptor de Fc de células efectoras en un sitio que no está unido a inmunoglobulina endógena.

Como se utiliza en este documento, el término "célula efectora" se refiere a una célula inmune que está implicada en la fase efectora de una respuesta inmune, en oposición a las fases cognitivas y de activación de una respuesta inmune. Las células inmunitarias ejemplares incluyen células de origen mieloide o linfoide, por ejemplo, linfocitos (por ejemplo, células B y células T que incluyen células T citolíticas (CTL), células citotóxicas, células citotóxicas naturales, macrófagos, monocitos, eosinófilos, neutrófilos, células polimorfonucleares, granulocitos, mastocitos y basófilos. Algunas células efectoras expresan receptores Fc específicos y llevan a cabo funciones inmunes específicas. En realizaciones preferidas, una célula efectora es capaz de inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), por ejemplo, un neutrófilo capaz de inducir ADCC. Por ejemplo, monocitos, macrófagos, que expresan FcR están implicados en la muerte específica de células objetivo y presentan antígenos a otros componentes del sistema inmunitario, o se unen a células que presentan antígenos. En otras realizaciones, una célula efectora puede fagocitar un antígeno objetivo, célula objetivo o microorganismo. La expresión de un FcR particular en una célula efectora puede ser regulada por factores humorales tales como citoquinas. Por ejemplo, se ha encontrado que la expresión de Fc-gammaRI está regulada positivamente por interferón gamma (IFN- γ). Esta expresión aumentada aumenta la actividad citotóxica de las células que portan Fc-gammaRI contra los objetivos. Una célula efectora puede fagocitar o lisar un antígeno objetivo o una célula objetivo.

"Célula objetivo" significará cualquier célula indeseable en un sujeto (por ejemplo, un ser humano o animal) que pueda ser blanco de un anticuerpo de las enseñanzas. En realizaciones preferidas, la célula objetivo es una célula que expresa o sobreexpresa GT468 y/o que se caracteriza por asociación de GT468 con su superficie celular. Las células que expresan GT468 y/o se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular típicamente incluyen células tumorales.

Las moléculas biespecíficas y multiespecíficas de las presentes enseñanzas pueden prepararse utilizando técnicas químicas (véase, por ejemplo, D. M. Kranz et al (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 5807), técnicas de "polidoma" (Ver US 4.474.893, para Reading), o técnicas de ADN recombinante.

En particular, las moléculas biespecíficas y multiespecíficas de las presentes enseñanzas pueden prepararse conjugando las especificidades de unión constituyentes, por ejemplo, las especificidades de unión anti-FcR y anti-GT468, utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, cada especificidad de unión de la molécula biespecífica y multiespecífica puede generarse por separado y luego conjugarse entre sí. Cuando las especificidades de unión son proteínas o péptidos, se puede utilizar una variedad de agentes de acoplamiento o entrecruzamiento para la conjugación covalente. Los ejemplos de agentes de entrecruzamiento incluyen proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), o-fenilendimaleimida (oPDM), N-succinimidil-3- (2-piridilditio)propionato (SPDP) y sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC) (véase, por ejemplo, Karpovsky y otros (1984) *J. Exp. Medicina.* 160: 1686; Liu, MA y col. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 82: 8648). Otros métodos incluyen los descritos por Paulus (Behring Ins. Guante. (1985) No. 78,118-132); Brennan et al. (*Science* (1985) 229: 81-83), and Glennie et al. (*J. Immunol.* (1987) 139: 2367-2375). Los agentes de conjugación preferidos son SATA y sulfo-SMCC, ambos disponibles de Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Cuando las especificidades de unión son anticuerpos, pueden conjugarse mediante unión por sulfhidrilo de las regiones de bisagra del extremo C de las dos cadenas pesadas. En una realización particularmente preferida, la región de bisagra se modifica para que contenga un número impar de residuos de sulfhidrilo, preferiblemente uno, antes de la conjugación.

Alternativamente, ambas especificidades de unión pueden codificarse en el mismo vector y expresarse y ensamblarse en la misma célula huésped. Este método es particularmente útil cuando la molécula biespecífica y multiespecífica es una proteína de fusión mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')₂ o ligando x Fab. Una molécula biespecífica y multiespecífica de la enseñanza, por ejemplo, una molécula biespecífica, puede ser una molécula monocatenaria, tal como un anticuerpo biespecífico de cadena sencilla, una molécula biespecífica de cadena sencilla que comprende un anticuerpo monocatenario y una molécula de cadena sencilla biespecífica un o determinante de unión, que comprende dos determinantes de unión. Las moléculas biespecíficas y multiespecíficas también pueden ser moléculas monocatenarias o pueden comprender por lo menos dos moléculas monocatenarias. Los métodos para preparar moléculas bi y multiespecíficas se describen, por ejemplo, en los documentos US 5,260,203; US 5,455,030; US 4,881,175; US 5,132,405; US 5,091,513; US 5,476,786; US 5,013,653; US 5,258,498; y US 5,482,858.

La unión de las moléculas biespecíficas y multiespecíficas a sus objetivos específicos puede confirmarse mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), análisis FACS, un bioensayo (por ejemplo, inhibición de crecimiento) o un ensayo de transferencia Western. Cada uno de estos ensayos generalmente detecta la presencia de complejos proteína-anticuerpo de interés particular empleando un reactivo marcado (por ejemplo, un anticuerpo) específico para el complejo de interés. Por ejemplo, los complejos FcR-anticuerpo pueden detectarse utilizando, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo ligado a una enzima que reconoce y se une específicamente a los complejos anticuerpo-FcR. Alternativamente, los complejos se pueden detectar utilizando cualquiera de una variedad de otros inmunoensayos. Por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse radiactivamente y usarse en un radioinmunoensayo (RIA) (véase, por ejemplo, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, marzo de 1986). El isótopo radioactivo se puede detectar por medios tales como el uso de un contador y o un contador de centelleo o por autorradiografía.

II. Inmunoconjugados

En otro aspecto, las presentes enseñanzas presentan un anticuerpo anti-GT468 conjugado con un resto o agente terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o un radioisótopo. Tales conjugados se denominan aquí "inmunoconjugados". Los inmunoconjugados que incluyen una o más citotoxinas se denominan "inmunotoxinas". Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial y, en particular, mata las células. Los ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantranodiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos u homólogos de estos.

Los agentes terapéuticos adecuados para formar inmunoconjugados de la enseñanza incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-fluorouracilo descabazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfan, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC) y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina). En una realización preferida, el agente terapéutico es un agente citotóxico o un agente radiotóxico. En otra realización, el agente terapéutico es un inmunosupresor. En otra realización más, el agente terapéutico es GM-CSF. En una realización preferida, el agente terapéutico es doxorubicina, cisplatino, bleomicina, sulfato, carmustina, clorambucilo, ciclofosfamida o ricina A.

Los anticuerpos de las presentes enseñanzas también pueden conjugarse con un radioisótopo, por ejemplo, yodo-131, itrio-90 o indio-111, para generar productos radiofarmacéuticos citotóxicos para tratar un trastorno relacionado con GT468, tal como un cáncer. Los conjugados de anticuerpos de las enseñanzas se pueden utilizar para modificar una respuesta biológica dada, y el resto del fármaco no debe interpretarse como limitado a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la fracción de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa, o un fragmento activo de la misma, tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina de la difteria; una proteína tal como factor de necrosis tumoral o interferón- γ ; o modificadores de la respuesta biológica, tales como, por ejemplo, linfoquinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos ("GM-CSF"), factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF") u otros factores de crecimiento.

Las técnicas para conjugar dicha fracción terapéutica con anticuerpos son bien conocidas, véase, por ejemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies for Drug Delivery", en Controlled Drug Delivery (2ª edición), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62: 119-58 (1982).

En una realización adicional, los anticuerpos de acuerdo con las enseñanzas están unidos a un enlazador-quelante, por ejemplo, tiuxetan, que permite que el anticuerpo se conjugue con un radioisótopo.

5 III. Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, las presentes enseñanzas proporcionan una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica que contiene uno o una combinación de anticuerpos de las presentes enseñanzas. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, así como con cualquier otro adyuvante y excipiente conocido de acuerdo con técnicas convencionales tales como las divulgadas en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, Gennaro, Ed., Mack Publishing. Co., Easton, PA, 1995. En una realización, las composiciones incluyen una combinación de múltiples (por ejemplo, dos o más) anticuerpos aislados de las enseñanzas que actúan por diferentes mecanismos, por ejemplo, un anticuerpo que actúa predominantemente induciendo CDC en combinación con otro anticuerpo que actúa predominantemente induciendo apoptosis.

Las composiciones farmacéuticas de las enseñanzas también pueden administrarse en terapia de combinación, es decir, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir una composición de las presentes enseñanzas con por lo menos un agente antiinflamatorio o por lo menos un agente inmunosupresor. En una realización, tales agentes terapéuticos incluyen uno o más agentes antiinflamatorios, tales como un fármaco esteroideo o un AINE (fármaco antiinflamatorio no esteroideo). Los agentes preferidos incluyen, por ejemplo, aspirina y otros salicilatos, inhibidores de Cox-2, como rofecoxib (Vioxx) y celecoxib (Celebrex), AINE como ibuprofeno (Motrin, Advil), fenoprofeno (Nalfon), naproxeno (Naprosyn), sulindac (Clinoril), diclofenaco (Voltaren), piroxicam (Feldene), ketoprofeno (Orudis), diflunisal (Dolobid), nabumetona (Relafen), etodolac (Lodine), oxaprozin (Daypro) e indometacina (Indocin).

En otra realización, tales agentes terapéuticos incluyen agentes que conducen al agotamiento o inactivación funcional de células T reguladoras, como ciclofosfamida de baja dosis, anticuerpos anti-CTLA4, anticuerpos anti-IL2 o anti-receptor de IL2.

En otra realización más, tales agentes terapéuticos incluyen uno o más agentes quimioterapéuticos, tales como derivados de Taxol, taxotere, gemcitabina, 5-fluorouracilo, doxorubicina (Adriamicina), cisplatino (Platinol), ciclofosfamida (Cytosan, Procytox, Neosar). En otra realización, los anticuerpos de las actuales enseñanzas pueden administrarse en combinación con agentes quimioterapéuticos, que preferiblemente muestran eficacia terapéutica en pacientes que padecen cáncer de mama, pulmón, gástrico y/o de ovario u otros tipos de cáncer, por ejemplo, como se describe aquí.

En otra realización más, los anticuerpos de las enseñanzas pueden administrarse junto con radioterapia y/o trasplante de células madre periféricas autólogas o de médula ósea.

En otra realización más, los anticuerpos de las enseñanzas pueden administrarse en combinación con uno o más anticuerpos seleccionados de anticuerpos anti-CD25, anticuerpos anti-EPCAM, anticuerpos anti-EGFR, anti-Her2/neu y anti-CD40.

En otra realización más, los anticuerpos de las enseñanzas pueden administrarse en combinación con un anticuerpo anti-C3b (i) para potenciar la activación del complemento.

Como se utiliza en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de la absorción e isotónicos, y similares que son fisiológicamente compatibles. Preferiblemente, el vehículo es adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, por ejemplo, anticuerpo, molécula biespecífica y multiespecífica, se puede revestir en un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que conserva la actividad biológica deseada del compuesto original y no imparte ningún efecto toxicológico no deseado (véase, por ejemplo, Berge, S. M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66: 1-19).

Los ejemplos de dichas sales incluyen sales de adición de ácidos y sales de adición de bases. Las sales de adición de ácido incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como ácido clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fósforo y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos alifáticos mono- y dicarboxílicos, ácidos alcanoico fenil-sustituido, ácidos hidroxialcanoicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos y similares. Las sales de adición de base incluyen aquellas derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletildiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaína y similares.

Una composición de las actuales enseñanzas se puede administrar mediante una diversidad de métodos conocidos en la técnica. Como apreciará el experto en la materia, la ruta y/o el modo de administración variarán dependiendo de los

5 resultados deseados. Los compuestos activos pueden prepararse con vehículos que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biodegradables y biocompatibles, como acetato de vinilo etileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones son generalmente conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sistemas de liberación de fármacos de liberación sostenida y controlada, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

10 Para administrar un compuesto de las enseñanzas por ciertas vías de administración, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o coadministrar el compuesto con, un material para evitar su inactivación. Por ejemplo, el compuesto se puede administrar a un sujeto en un vehículo apropiado, por ejemplo, liposomas, o un diluyente. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen solución salina y soluciones tampón acuosas. Los liposomas incluyen emulsiones CGF de agua en aceite en agua, así como liposomas convencionales (Strejan et al. (1984) J. Neuroimmunol. 7:27).

15 Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas de las enseñanzas. Compuestos activos suplementarios también se pueden incorporar en las composiciones.

20 Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede realizarse incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

25 Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de microfiltración por esterilización.

30 En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y secado por congelamiento (liofilización) que rinden un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente esterilizada filtrada del mismo.

35 Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un único bolo, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según lo indicado por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidad de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma de unidad de dosificación como se utiliza en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas de unidad de dosificación de las enseñanzas está dictada por y depende directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que debe lograrse, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de composición de tal compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

40 Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

45 Para las composiciones terapéuticas, las formulaciones de las actuales enseñanzas incluyen aquellas adecuadas para administración oral, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), rectal, vaginal y/o parenteral. Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en forma de dosificación unitaria y se pueden preparar mediante cualquier método conocido en la técnica de la farmacia. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material de vehículo para producir una única forma de dosificación variará dependiendo del sujeto que se está tratando, y el modo particular de administración. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material de vehículo para producir una única forma de dosificación generalmente será la cantidad de la composición que produce un efecto terapéutico.

En general, de un cien por ciento, esta cantidad variará de aproximadamente 0,01 por ciento a aproximadamente noventa y nueve por ciento de ingrediente activo, preferiblemente de aproximadamente 0,1 por ciento a aproximadamente 70 por ciento, lo más preferiblemente de aproximadamente 1 por ciento a aproximadamente 30 por ciento.

Las formulaciones de las actuales enseñanzas que son adecuadas para administración vaginal también incluyen pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverización que contienen dichos vehículos que se conocen en la técnica como apropiados. Las formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica de las composiciones de esta enseñanza incluyen polvos, aerosoles, ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhalantes. El compuesto activo se puede mezclar en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y con cualquier conservante, tampón o propelente que pueda ser necesario.

Las frases “administración parenteral” y “administrada por vía parenteral”, como se utilizan en el presente documento, significa modos de administración distintos a la administración enteral y tópica, generalmente mediante inyección, e incluye, sin limitación, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica. Inyección e infusión intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal.

Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la enseñanza incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, como el oleato de etilo. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de materiales de revestimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos se puede asegurar tanto mediante procedimientos de esterilización, como mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenolsorbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede conseguirse mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como el monoestearato de aluminio y gelatina.

En una realización, los anticuerpos monoclonales de la enseñanza se administran en forma cristalina mediante inyección subcutánea, véase Yang et al. (2003) PNAS, 100 (12): 6934-6939. Cuando los compuestos de las actuales enseñanzas se administran como productos farmacéuticos, a humanos y animales, se pueden administrar solos o como una composición farmacéutica que contiene, por ejemplo, 0,01 a 99,5% (más preferiblemente, 0,1 a 90%) de ingrediente activo en combinación con un transportador farmacéuticamente aceptable.

Independientemente de la vía de administración seleccionada, los compuestos de las actuales enseñanzas, que se pueden utilizar en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de las actuales enseñanzas, se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables por métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica.

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de las actuales enseñanzas se pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea efectiva para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular, composición y modo de administración, sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de las actuales enseñanzas empleadas, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se está empleando, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, el estado, la salud general y el historial médico previo del paciente que se está tratando, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

Un médico o veterinario que tenga una experiencia normal en la técnica puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad efectiva de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario podría iniciar dosis de los compuestos de la enseñanza empleados en la composición farmacéutica a niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logre el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de una composición de la enseñanza será aquella cantidad del compuesto que sea la dosis más baja efectiva para producir un efecto terapéutico. Dicha dosis efectiva generalmente dependerá de los factores descritos anteriormente. Se prefiere que la administración sea intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea, preferiblemente administrada proximal al sitio del objetivo. Si se desea, la dosis diaria eficaz de una composición terapéutica puede administrarse como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas por separado a intervalos apropiados a lo largo del día, opcionalmente, en formas de dosificación unitarias. Si bien es posible que un compuesto de la presente enseñanza se administre solo, es preferible administrar el compuesto como una formulación (composición) farmacéutica.

5 En una realización, los anticuerpos de las enseñanzas pueden administrarse por infusión, preferiblemente infusión continua lenta durante un período prolongado, tal como más de 24 horas, con el fin de reducir los efectos secundarios tóxicos. La administración también puede realizarse por infusión continua durante un período de 2 a 24 horas, como de 2 a 12 horas. Tal régimen puede repetirse una o más veces según sea necesario, por ejemplo, después de 6 meses o 12 meses. La dosificación se puede determinar o ajustarse midiendo la cantidad de anticuerpos monoclonales anti-GT468 circulantes después de la administración en una muestra biológica utilizando anticuerpos anti-idiotípicos que se dirigen a los anticuerpos anti-GT468.

10 En otra realización más, los anticuerpos se administran mediante terapia de mantenimiento, tal como, por ejemplo, una vez a la semana durante un período de 6 meses o más.

15 En otra realización más, los anticuerpos de acuerdo con la enseñanza se pueden administrar mediante un régimen que incluye una infusión de un anticuerpo contra GT468 seguido de una infusión de un anticuerpo contra GT468 conjugado con un radioisótopo. El régimen puede repetirse, por ejemplo, de 7 a 9 días más tarde.

20 Las composiciones terapéuticas se pueden administrar con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización preferida, una composición terapéutica de la enseñanza se puede administrar con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tal como los dispositivos descritos en el documento US 5,399,163; US 5,383,851; US 5,312,335; US 5,064,413; US 4,941,880; US 4,790,824; o US 4,596,556. Los ejemplos de implantes y módulos bien conocidos útiles en las actuales enseñanzas incluyen los descritos en: US 4,487,603, que describe una bomba de microinfusión implantable para dispensar medicamentos a una velocidad controlada; US 4,486,194, que divulga un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; US 4,447,233, que describe una bomba de infusión de medicación para suministrar medicación a una velocidad de infusión precisa; US 4,447,224, que divulga un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración continua de fármacos; US 4,439,196, que divulga un sistema de administración de fármaco osmótico que tiene compartimentos de cámaras múltiples; y US 4,475,196, que divulga un sistema de administración de fármacos osmóticos.

30 Muchos otros implantes, sistemas de suministro y módulos de este tipo son conocidos por los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, los anticuerpos de las enseñanzas se pueden formular para asegurar la distribución apropiada in vivo. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BBB) excluye muchos compuestos altamente hidrófilos. Para garantizar que los compuestos terapéuticos de las enseñanzas cruzan el BBB (si se desea), se pueden formular, por ejemplo, en liposomas. Para métodos de fabricación de liposomas, ver, por ejemplo, US 4,522,811; US 5,374,548; y US 5,399,331. Los liposomas pueden comprender uno o más fracciones que se transportan selectivamente a células u órganos específicos y, de este modo, potencian la administración dirigida del fármaco (véase, por ejemplo, V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29: 685). Los restos de dirección ejemplares incluyen folato o biotina (ver, por ejemplo, US 5,416,016 a Low et al.); manosidas (Umezawa et al., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153: 1038); anticuerpos (P.G. Bloeman et al. (1995) FEBS Lett. 357: 140; M. Owais et al. (1995) Antimicrob. Agentes Chemother. 39: 180); y receptor de proteína A surfactante (Briscoe y otros (1995) A.m. J. Physiol. 1233: 134).

40 En una realización de las enseñanzas, los compuestos terapéuticos de las enseñanzas se formulan en liposomas. En una realización más preferida, los liposomas incluyen un resto de direccionamiento. En una realización más preferida, los compuestos terapéuticos en los liposomas se administran por inyección en bolo a un sitio proximal al área deseada, por ejemplo, el sitio de un tumor. La composición debe ser fluida en la medida en que exista facilidad de inyección. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos como bacterias y hongos.

50 En una realización adicional, los anticuerpos de las enseñanzas se pueden formular para prevenir o reducir su transporte a través de la placenta. Esto se puede hacer mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante PEGilación de los anticuerpos o mediante el uso de fragmentos F(ab)₂. Se pueden hacer referencias adicionales a "Cunningham-Rundles C, Zhuo Z, Griffith B, Keenan J. (1992) Actividades biológicas de conjugados de inmunoglobulina de polietilenglicol. Resistencia a la degradación enzimática. J. Immunol. Methods, 152: 177-190; y a "Landor M. (1995) transferencia materno-fetal de inmunoglobulinas, Ann. Allergy Asthma Immunol. 74: 279-283.

55 Una "dosis terapéuticamente efectiva" para terapia tumoral puede medirse por respuestas tumorales objetivas que pueden ser completas o parciales. Una respuesta completa (RC) se define como ninguna evidencia clínica, radiológica u otra evidencia de enfermedad. Una respuesta parcial (RP) resulta de una reducción en el tamaño total del tumor de más del 50%. La mediana del tiempo hasta la progresión es una medida que caracteriza la durabilidad de la respuesta tumoral objetiva.

60 Una "dosificación terapéuticamente efectiva" para la terapia tumoral también puede medirse por su capacidad para estabilizar la progresión de la enfermedad. La capacidad de un compuesto para inhibir el cáncer se puede evaluar en un sistema modelo animal que predice la eficacia en tumores humanos. Alternativamente, esta propiedad de una composición puede evaluarse examinando la capacidad del compuesto para inhibir el crecimiento celular o la apoptosis mediante ensayos in vitro conocidos por el experto en la técnica. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño del tumor, o mejorar de otro modo los síntomas en un sujeto. Un experto en la materia podría

determinar tales cantidades basándose en factores tales como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto y la composición o vía de administración particular seleccionada.

5 La composición debe ser estéril y fluida en la medida en que la composición se pueda entregar con una jeringa. Además de agua, el vehículo puede ser una solución salina tamponada isotónica, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, es preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol o sorbitol, y cloruro de sodio en la composición. La absorción a largo plazo de las composiciones inyectables puede realizarse incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina.

15 Cuando el compuesto activo está adecuadamente protegido, como se describió anteriormente, el compuesto puede administrarse por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable.

15 IV. Usos y métodos de la invención

20 Los anticuerpos (incluyendo inmunoconjugados, biespecíficos/multiespecíficos, composiciones y otros derivados descritos en este documento) de las actuales enseñanzas tienen numerosas utilidades terapéuticas que implican el tratamiento de trastornos que implican células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por asociación de GT468 con su superficie celular. Por ejemplo, los anticuerpos pueden administrarse a células en cultivo, por ejemplo, in vitro o ex vivo, o a sujetos humanos, por ejemplo, in vivo, para tratar o prevenir una variedad de trastornos tales como los descritos en este documento. Como se utiliza en el presente documento, el término "sujeto" pretende incluir animales humanos y no humanos que responden a los anticuerpos contra GT468. Los sujetos preferidos incluyen pacientes humanos que tienen trastornos que pueden corregirse o mejorarse matando células enfermas, en particular células caracterizadas por un patrón de expresión alterado de GT468 y/o un patrón alterado de asociación de GT468 con su superficie celular en comparación con células normales.

30 Por ejemplo, en una realización, los anticuerpos de las actuales enseñanzas se pueden utilizar para tratar a un sujeto con un trastorno tumorigénico, por ejemplo, un trastorno caracterizado por la presencia de células tumorales que expresan GT468 y/o se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular incluyendo, por ejemplo, cáncer de mama. Los ejemplos de enfermedades tumorigénicas que pueden tratarse y/o prevenirse abarcan todos los cánceres y entidades tumorales que expresan GT468, incluyendo cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de ovario, cáncer hepatocelular, cáncer de colon, cáncer de páncreas, cáncer de esófago, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, en particular carcinoma de células renales, cáncer de próstata, cáncer de hígado, melanoma, sarcoma, mieloma, neuroblastoma, coriocarcinoma placentario, cáncer de cuello uterino y cáncer de tiroides, y sus formas metastásicas. . Estos cánceres pueden estar en etapas temprana, intermedia o avanzada, por ejemplo, metástasis. En una realización, la enfermedad del cáncer es cáncer metastásico en el pulmón.

40 Las composiciones farmacéuticas y los métodos de tratamiento descritos de acuerdo con las enseñanzas también se pueden utilizar para la inmunización o la vacunación para prevenir una enfermedad descrita en este documento.

45 En otra realización, los anticuerpos de las enseñanzas se pueden utilizar para detectar niveles de GT468 o formas particulares de GT468, o niveles de células que contienen GT468 en su superficie de membrana, niveles que pueden vincularse a ciertas enfermedades o síntomas de enfermedad tales como los descritos anteriormente. Alternativamente, los anticuerpos se pueden utilizar para reducir o interactuar con la función de células que expresan GT468 y/o que se caracteriza por la asociación de GT468 con su superficie celular, implicando de este modo a estas células como importantes mediadores de la enfermedad. Esto se puede lograr poniendo en contacto una muestra y una muestra de control con el anticuerpo anti-GT468 en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo y GT468. Cualquier complejo formado entre el anticuerpo y GT468 se detecta y se compara en la muestra y una muestra de control, es decir, una muestra de referencia.

55 Los anticuerpos de la enseñanza se pueden analizar inicialmente para determinar su actividad de unión asociada con usos terapéuticos o de diagnóstico in vitro. Por ejemplo, los anticuerpos pueden analizarse utilizando ensayos de citometría de flujo como se describe en este documento.

60 Además, puede ensayarse la actividad de los anticuerpos para desencadenar por lo menos una actividad de célula efectora mediada por efector, que incluye inhibir el crecimiento y/o matar células que expresan GT468 y/o que se caracteriza por asociación de GT468 con su superficie celular. Por ejemplo, se puede analizar la capacidad de los anticuerpos para desencadenar CDC y/o apoptosis. Los protocolos para analizar CDC, adhesión homotípica, agrupamiento molecular o apoptosis se describen en este documento.

65 Los anticuerpos de la enseñanza se pueden utilizar para provocar in vivo o in vitro una o más de las siguientes actividades biológicas: inhibir el crecimiento y/o diferenciación de una célula que expresa GT468 y/o que se caracteriza por la asociación de GT468 con su célula superficie; matar una célula que expresa GT468 y/o que se caracteriza por asociación de GT468 con su superficie celular; para mediar en la fagocitosis o ADCC de una célula que expresa GT468 y/o se

5 caracteriza por la asociación de GT468 con su superficie celular en presencia de células efectoras; mediar CDC de una célula que expresa GT468 y/o que se caracteriza por asociación de GT468 con su superficie celular en presencia de complemento; para mediar la apoptosis de una célula que expresa GT468 y/o se caracteriza por la asociación de GT468 con su superficie celular; para inducir la adhesión homotípica; y/o inducir la translocación en balsas lipídicas al unirse a GT468.

10 En una realización particular, los anticuerpos se utilizan in vivo o in vitro para tratar, prevenir o diagnosticar una variedad de enfermedades relacionadas con GT468. Ejemplos de enfermedades relacionadas con GT468 incluyen, entre otros, cánceres tales como cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de ovario, cáncer hepatocelular, cáncer de colon, cáncer de páncreas, cáncer de esófago, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, en particular células de carcinoma renales, cáncer de próstata, cáncer de hígado, melanoma, sarcoma, mieloma, neuroblastoma, coriocarcinoma placentario, cáncer de cuello uterino y cáncer de tiroides, y sus formas metastásicas. En una realización, la enfermedad del cáncer es cáncer metastásico en el pulmón.

15 Las rutas adecuadas de administración de las composiciones de anticuerpos de la enseñanza in vivo e in vitro son bien conocidas en la técnica y pueden ser seleccionadas por los expertos en la técnica.

20 Como se describió anteriormente, los anticuerpos anti-GT468 de la enseñanza se pueden coadministrar con uno u otros agentes terapéuticos más, por ejemplo, un agente citotóxico, un agente radiotóxico, un agente antiangiogénico o un agente inmunosupresor para reducir la inducción de respuestas inmunes contra los anticuerpos de enseñanza. El anticuerpo se puede unir al agente (como un inmunocomplejo) o se puede administrar separado del agente. En este último caso (administración separada), el anticuerpo puede administrarse antes, después o simultáneamente con el agente o puede administrarse conjuntamente con otras terapias conocidas, por ejemplo, una terapia anticancerosa, por ejemplo, radiación. Dichos agentes terapéuticos incluyen, entre otros, agentes antineoplásicos tales como los listados anteriormente. La administración conjunta de los anticuerpos anti-GT468 de la presente enseñanza con agentes quimioterapéuticos proporciona dos agentes anticancerosos que funcionan a través de diferentes mecanismos que producen un efecto citotóxico para las células tumorales. Dicha coadministración puede resolver problemas debido al desarrollo de resistencia a fármacos o a un cambio en la antigenicidad de las células tumorales que los haría no reactivos con el anticuerpo.

30 En otra realización particular de las enseñanzas, el sujeto que se administra el anticuerpo se trata adicionalmente con un agente antiangiogénico que incluye anticuerpos dirigidos a VEGF o VEGFR y uno o más compuestos químicos que inhiben la angiogénesis. El tratamiento previo o la aplicación paralela de estos medicamentos pueden mejorar la penetración de anticuerpos en tumores en volumen. En otra realización particular de las enseñanzas, el sujeto que se administra el anticuerpo se trata adicionalmente con un compuesto que inhibe la señalización del receptor del factor de crecimiento que incluye anticuerpos monoclonales que se unen al receptor EGFR así como compuestos químicos que inhiben la señalización iniciada por el receptor EGFR, Her1 o Her2/neu.

40 Las células efectoras específicas de objetivo, por ejemplo, células efectoras unidas a composiciones (por ejemplo, anticuerpos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la enseñanza también se pueden utilizar como agentes terapéuticos. Las células efectoras para la dirección pueden ser leucocitos humanos tales como macrófagos, neutrófilos o monocitos. Otras células incluyen eosinófilos, células citotóxicas naturales y otras células portadoras de receptores IgG o IgA. Si se desea, pueden obtenerse células efectoras del sujeto que se va a tratar. Las células efectoras específicas de objetivo se pueden administrar como una suspensión de células en una solución fisiológicamente aceptable. El número de células administradas puede ser del orden de 10^8 a 10^9 , pero variará dependiendo del propósito terapéutico. En general, la cantidad será suficiente para obtener la localización en la célula objetivo, por ejemplo, una célula tumoral que expresa GT468 y/o caracterizada por asociación de GT468 con su superficie celular, y para efectuar la muerte celular mediante, por ejemplo, fagocitosis. Las rutas de administración también pueden variar.

50 La terapia con células efectoras específicas del objetivo se puede realizar junto con otras técnicas para la muerte de células objetivo. Por ejemplo, la terapia antitumoral que usa las composiciones de la enseñanza y/o las células efectoras armadas con estas composiciones se puede utilizar junto con la quimioterapia. Además, la inmunoterapia combinada se puede utilizar para dirigir dos poblaciones efectoras citotóxicas distintas hacia el rechazo de células tumorales. Por ejemplo, los anticuerpos anti-GT468 unidos a anti-Fc-RI o anti-CD3 se pueden utilizar junto con agentes de unión específicos de receptor de IgG o IgA.

55 Las moléculas biespecíficas y multiespecíficas de la enseñanza también se pueden utilizar para modular niveles de Fc-gammaR o Fc-alfaR en células efectoras, tal como tapando y eliminando receptores en la superficie celular. Las mezclas de receptores anti-Fc también se pueden utilizar para este propósito.

60 Las composiciones (por ejemplo, anticuerpos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas e inmunoconjugados) de la enseñanza que tienen sitios de unión al complemento, tales como porciones de IgG1, -2 o -3 o IgM que se unen al complemento, también se pueden utilizar en presencia de complemento. En una realización, el tratamiento ex vivo de una población de células que comprenden células objetivo con un agente de unión de la enseñanza y células efectoras apropiadas se puede complementar mediante la adición de complemento o complemento que contiene suero. La fagocitosis de las células objetivo recubiertas con un agente de unión de la enseñanza se puede mejorar mediante la unión de las proteínas del complemento. En otra realización, las células objetivo recubiertas con las composiciones de la

enseñanza también pueden lisarse por complemento. En otra realización más, las composiciones de la enseñanza no activan el complemento.

5 Las composiciones de la enseñanza también se pueden administrar junto con complemento. De acuerdo con lo anterior, dentro del alcance de la enseñanza se encuentran composiciones que comprenden anticuerpos, moléculas multiespecíficas o biespecíficas y suero o complemento. Estas composiciones son ventajosas porque el complemento se localiza muy cerca de los anticuerpos, moléculas multiespecíficas o biespecíficas.

10 Alternativamente, los anticuerpos, moléculas multiespecíficas o biespecíficas de la enseñanza y el complemento o suero se pueden administrar por separado. La unión de las composiciones de las actuales enseñanzas a células objetivo puede provocar la translocación del complejo antígeno-anticuerpo GT468 en balsas lipídicas de la membrana celular. Dicha translocación crea una alta densidad de complejos antígeno-anticuerpo que pueden activar y/o mejorar CDC de manera eficiente.

15 También están dentro del alcance de las actuales enseñanzas kits que comprenden las composiciones de anticuerpos de la enseñanza (por ejemplo, anticuerpos e inmunoconjugados) e instrucciones de uso. El kit puede contener adicionalmente uno o más reactivos adicionales, tales como un reactivo inmunosupresor, un agente citotóxico o un agente radiotóxico, o uno o más anticuerpos adicionales de la enseñanza (por ejemplo, un anticuerpo que tiene una actividad complementaria).

20 De acuerdo con lo anterior, los pacientes tratados con composiciones de anticuerpos de la enseñanza pueden administrarse adicionalmente (antes, simultáneamente o después de la administración de un anticuerpo de la enseñanza) con otro agente terapéutico, tal como un agente citotóxico o radiotóxico, que potencia o aumenta el efecto terapéutico efecto de los anticuerpos de la enseñanza.

25 En otras realizaciones, el sujeto puede tratarse adicionalmente con un agente que modula, por ejemplo, potencia o inhibe, la expresión o actividad de los receptores Fc-gamma o Fc-alfa, por ejemplo, tratando al sujeto con una citoquina. Las citoquinas preferidas incluyen factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), interferón- γ (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral (TNF). Otros agentes importantes para aumentar la eficacia terapéutica de los anticuerpos y composiciones farmacéuticas descritos en la presente son β -glucanos que son homopolisacáridos de residuos de glucosa ramificada y se producen por una variedad de plantas y microorganismos, por ejemplo, bacterias, algas, hongos, levaduras y granos. También se pueden utilizar fragmentos de β -glucanos producidos por organismos. Preferiblemente, el β -glucano es un polímero de $\beta(1, 3)$ glucosa en el que por lo menos algunas de las unidades de glucosa de la cadena principal, por ejemplo, 3-6% de las unidades de glucosa de estructura principal, poseen ramificaciones tales como ramificaciones $\beta(1, 6)$.

35 En una realización particular, las enseñanzas proporcionan métodos para detectar la presencia de antígeno GT468 en una muestra, o medir la cantidad de antígeno GT468, que comprende poner en contacto la muestra, y una muestra de control, con un anticuerpo que se une específicamente a GT468, en condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo o parte de este y GT468. Entonces se detecta la formación de un complejo, en el que una formación de complejo de diferencia entre la muestra en comparación con la muestra de control es indicadora de la presencia del antígeno GT468 en la muestra.

40 En otra realización más, las enseñanzas proporcionan un método para detectar la presencia o cuantificación de la cantidad de células que expresan GT468 y/o se caracteriza por la asociación de GT468 con su superficie celular in vivo o in vitro. El método comprende (i) administrar a un sujeto una composición de la enseñanza conjugada con un marcador detectable; y (ii) exponer al sujeto a un medio para detectar dicho marcador detectable para identificar áreas que contienen células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular.

50 Los métodos descritos anteriormente son útiles, en particular, para diagnosticar enfermedades relacionadas con GT468 y/o la localización de enfermedades relacionadas con GT468 tales como enfermedades de cáncer. Preferiblemente, una cantidad de GT468 en una muestra que es mayor que la cantidad de GT468 en una muestra de control es indicadora de la presencia de una enfermedad relacionada con GT468 en un sujeto, en particular un ser humano, del que se deriva la muestra.

55 Cuando se utiliza en métodos como los descritos anteriormente, un anticuerpo descrito en este documento puede proporcionarse con una etiqueta que funciona para: (i) proporcionar una señal detectable; (ii) interactuar con una segunda etiqueta para modificar la señal detectable proporcionada por la primera o segunda etiqueta, por ejemplo, FRET (Transferencia de Energía por Resonancia de Fluorescencia); (iii) afectar la movilidad, por ejemplo, movilidad electroforética, por carga, hidrofobicidad, forma u otros parámetros físicos, o (iv) proporcionar una fracción de captura, por ejemplo, afinidad, anticuerpo/antígeno o complejación iónica. Son adecuadas como etiqueta las estructuras, tales como etiquetas fluorescentes, luminiscentes, cromóforos, radioisotópicas, isotópicas, preferentemente isotópicas estables, isobáricas, enzimáticas, particuladas, en particular las de partículas metálicas, magnéticas, poliméricas, pequeñas moléculas orgánicas tales como biotina, ligandos de receptores o moléculas de unión tales como proteínas de adhesión celular o lectinas, secuencias marcadoras que comprenden ácidos nucleicos y/o residuos de aminoácidos que pueden detectarse mediante el uso de agentes aglutinantes, etc. Las etiquetas comprenden, de forma no limitativa, sulfato de bario, ácido iocetámico, ácido yopanoico, ipoceto cálcico, diatrizoato de sodio, diatrizoato de meglumina, metrizamida,

tironopanoato de sodio y radiodiagnóstico, incluidos emisores de positrones tales como fluorina-18 y carbono-11, emisores gamma tales como yodo-123, tecnecio-99m, yodo-131 e indio-111, nucleidos para resonancia magnética nuclear, como flúor y gadolinio.

5 En otra realización más, los inmunocombinados de la enseñanza se pueden utilizar para dirigir compuestos (por ejemplo, agentes terapéuticos, marcadores, citotoxinas, inmunosupresores de radiotoxinas, etc.) a células que tienen GT468 asociado con su superficie uniendo tales compuestos al anticuerpo. De este modo, la enseñanza también proporciona métodos para localizar células *ex vivo* o *in vitro* que expresan GT468 y/o se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular, tales como células tumorales circulantes.

10

Las presentes enseñanzas se ilustran adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no se deben considerar como limitativos del alcance de la invención.

15 EJEMPLOS

15

Ejemplo 1: Materiales y métodos

Las técnicas y métodos mencionados en este documento se llevan a cabo de una manera conocida y tal como se describe, por ejemplo, en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., o como se describe a continuación. Todos los métodos, incluido el uso de kits y reactivos, se llevan a cabo de acuerdo con la información del fabricante.

20

Tejidos y líneas celulares

25

El trabajo de ADN recombinante se realizó con el permiso oficial y de acuerdo con las reglas del gobierno estatal de Rheinland-Pfalz. Los tejidos se obtuvieron como materiales excedentes humanos durante el diagnóstico de rutina o procedimientos terapéuticos y se almacenaron a -80°C hasta su uso. Las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y BT549 se cultivaron en DMEM/10% de FCS.

30

Aislamiento de ARN, RT-PCR y RT-PCR en tiempo real

La extracción de ARN, la síntesis de ADNc de primera cadena, la RT-PCR y la RT-PCR en tiempo real se realizaron como se describió previamente (Koslowski, M., Sahin, U., Huber, C. y Tureci, O. (2006) *Hum. Mol. Genet.* 15, 2392-2399). Para el análisis de punto final, se usaron oligonucleótidos específicos de GT468 (sentido 5'-AAA TTT GGC AGC TGC CTT CAC-3'; antisentido 5'-TGA TGC CAC ATT CAG TAA CAC-3', 60°C de hibridación) en un 35 ciclo de RT-PCR. El análisis de expresión cuantitativa en tiempo real se realizó por triplicado en una RT-PCR de 40 ciclos. Después de la normalización a HPRT (sentido 5'-TGA CAC TGG CAA AAC GCA-3', antisentido 5'-GGT CCT TTT CAC CAG CAA GCT-3', 62°C de hibridación) GT468 transcripciones en muestras tumorales se cuantificaron en relación con la normalidad tejidos utilizando el cálculo de $\Delta\Delta CT$. La especificidad de las reacciones de PCR se confirmó por clonación y secuenciación de productos de amplificación a partir de muestras seleccionadas arbitrariamente.

40

Bioinformática

Para la clonación *in silico* de moléculas específicas de trofoblasto, se modificó y adaptó una estrategia de minería de datos descrita en detalle en otra parte (Koslowski, M., Bell, C., Seitz, G., Lehr, H.A., Roemer, K., Muntefering, H., Huber, C., Sahin, U. & Tureci, O. (2004) *Cancer Res.* 64, 5988-5993; Koslowski, M., Tureci, O., Bell, C., Krause, P., Lehr, H.A., Brunner, J., Seitz, G., Nestlé, F.O., Huber, C. y Sahin, U. (2002) *Cancer Res.* 62, 6750-6755; Koslowski, M., Sahin, U., Huber, C. y Tureci, O. (2006) *Hum. Mol. Genet.* 15, 2392-2399). Brevemente, la búsqueda jerárquica de palabras clave de GenBank se combinó con la sustracción digital de colecciones de cADN.

50

Para la búsqueda por palabra clave, se accedió a los archivos de secuencia de nucleótidos en GenBank para que los genes anotados se expresaran específicamente en placenta o tejido trofoblástico utilizando el Sistema de Búsqueda y Recuperación ENTREZ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>). El programa de búsqueda de homología de secuencia BLASTN (<http://ncbi.nlm.nih.gov/blast>) se ejecutó secuencialmente para cada secuencia de nucleótidos contra todas las secuencias de nucleótidos humanas para evitar redundancias. Como segundo filtro se realizó Northern (eNorthern) electrónico para todos los clones obtenidos por búsqueda por palabra clave mediante búsqueda BLAST de cada secuencia de ADN de interés contra la base de datos EST en NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Se tomó en consideración que varias colecciones de cADN en el dominio público no están anotadas adecuadamente (Scheurle, D., De Young, M.P., Binnering, D.M., Page, H., Jahanzeb, M. & Narayanan, R. (2000) *Cancer Res.* 60, 4037-4043).

60

Para la sustracción digital, se utilizó la herramienta cADN xProfiler del Cancer Genome Anatomy Project en NCBI (<http://cgap.nci.nih.gov/Tissues/xProfiler>), que compara la expresión génica entre dos grupos (A y B) de colecciones de ADNc. donde cada grupo puede ser una sola biblioteca o varias colecciones. Las opciones de búsqueda para el Grupo A y el Grupo B se establecieron en "Homo sapiens" para Organismo y "todas las colecciones EST" para que Library Group busque todas las colecciones de cADN en dbEST. Todas las colecciones de ADNc preparadas a partir de tejido de placenta y trofoblasto que coinciden con los ajustes de las opciones de búsqueda se asignaron al grupo A, excluidas las

65

colecciones de tejidos mixtos. Para el grupo B, se seleccionaron todas las colecciones de ADNc preparadas a partir de tejidos normales, excepto placenta, trofoblasto, testículo, ovario y todo el cuerpo del feto.

Para el análisis de la región promotora GT468 se usó el software EMBOSS CpGPlot (Rice, P., Longden, I. & Bleasby, A. (2000) Trends Genet. 16, 276-277). Además, el análisis de la secuencia de la proteína GT468 se realizó con MEMSAT3 (Jones, D.T., Taylor, WR y Thornton, JM (1994) Biochemistry 33, 3038-3049), TMPred (Hofmann, K. y Stoffel, W. (1993) Biol. Chem. Hoppe-Seyler 374, 166), y GOR IV (Gamier, J., Osguthorpe, D. J. y Robson, B. (1978) J. Mol. Biol. 120, 97-120).

10 Antisueros, inmunofluorescencia e inmunológica

El antisuero policlonal producido contra aa 117-127 de GT468 se generó mediante un servicio de anticuerpos personalizado (Squarix, Marl, Alemania). La inmunohistoquímica se realizó en criosecciones tisulares utilizando el kit de sustrato VECTOR NovaRED (Vector, Burlingame, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para el análisis de transferencia Western, se usaron 30 µg de proteína total extraída de células lisadas con Triton-X. Los extractos se diluyeron en tampón de muestra de reducción (Roth, Karlsruhe, Alemania), se sometieron a SDS-PAGE y posteriormente se electrotransfirieron sobre membrana de PVDF (Pall, East Hills, NY). La inmunotinción se realizó con anticuerpos reactivos a pAKT (Cell Signaling, Danvers, MA), AKT (Cell Signaling, Danvers, MA), ciclina D1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) y beta-Actin (Abeam, Cambridge, Reino Unido) seguido de la detección del anticuerpo primario con anticuerpos secundarios de cabra anti-ratón y anti-conejo de cabra conjugados con peroxidasa de rábano (Dako, Glostrup, Dinamarca).

Dúplex siARN

25 El GT468 siARN dúplex (Qiagen, Hilden, Alemania) (sentido 5'-r(CCA UGA GAG UAG CCA GCA) dTdT-3' antisentido 5'-r (UUG CUG GCU ACU CUC AUG G) dAdG-3') nucleótidos dirigidos 670-690 de la secuencia de ARNm de GT468 (NM 021796.3). Como control se usó un dúplex de siARN codificado (sentido 5'-r(UAA CUG UAU AAU CGA CUA G) dTdT-5' antisentido 5'-r(CUA GUC GAU UAU ACA GUU A) dGdA-3'). Para estudios de silenciamiento de GT468, las células se transfectoron con dúplex de siARN 10nM utilizando reactivo de transfección HiPerFect (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Todos los resultados se reprodujeron con un segundo conjunto de dúplex de siARN de GT468 (sentido 5'-r(GGU UCA GGA CAA AGU CCA A) dTdT-3', antisentido 5'-r(UUG GAC UUU GUC CUG AAC C) dGdG-3') dirigidos a los nucleótidos 342-362.

35 Análisis de proliferación celular después de la transfección de siARN

24 h después de la transfección con dúplex de siARN se cultivaron 1x10⁴ células durante 48 h en medio suplementado con FCS al 10%. La proliferación se analizó midiendo la incorporación de BrdU en cadenas de ADN recién sintetizadas utilizando el kit de proliferación celular DELFIA (Perkin Elmer, Boston, MA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante en un contador multietiqueta Wallac Victor² (Perkin Elmer, Boston, MA).

40 Análisis del ciclo celular

45 Las células se cultivaron en medio suplementado con FCS al 10% en concentraciones variables. 72 h después de la transfección con las células dúplex de siARN se recogieron, se fijaron con EtOH, y se tiñeron con yoduro de propidio antes del análisis de contenido de ADN citométrico de flujo. Las células en las diferentes fases del ciclo celular se cuantificaron utilizando CellQuest™ Pro (BD, Franklin Lakes, NJ) y FlowJo™ (Tree Star, Ashland, OR) software de análisis de citometría de flujo. Las células apoptóticas se cuantificaron mediante tinción con AnnexinV 48 h y 72 h después de la transfección con siARN.

50 Ensayo de invasión in vitro y Migración celular

Se realizaron ensayos de migración celular en cámaras transwell con membranas de poro de 8.0 µm (BD Biosciences, San Jose, CA) con células cultivadas en medio libre de suero durante 12 h antes de los experimentos. Para los experimentos de siARN, las células se transfirieron a condiciones libres de suero 24 h después de la transfección con dúplex de siARN como se describió anteriormente. Se añadieron 4x10⁴ células en 400 µl de medio de cultivo sin suero a la cámara superior. Las cámaras inferiores contenían 800 µl de medio de cultivo suplementado con FCS al 5% como quimioatrayentes. 24 h más tarde, las células que habían migrado al lado inferior de la membrana se fijaron en metanol helado; las membranas se cortaron, se colocaron en portaobjetos de microscopio y se montaron con Hoechst (Dako, Glostrup, Dinamarca) para microscopía de fluorescencia. Se contaron las células en cinco campos visuales aleatorios (magnificación 100x) para cada membrana. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los efectos sobre la quimioquinesis de las células se analizaron utilizando la misma configuración experimental con quimioatrayente añadido a la cámara superior e inferior. Para ensayos de invasión in vitro, las cámaras superiores se prepararon con 100 µl de Matrigel (BD Biosciences, San Jose, NJ) diluido a 1 mg/ml en medio sin suero. Las cámaras se incubaron a 37°C durante 5 h para gelificar.

65 Análisis de proliferación celular después de la incubación con anticuerpos

5 Endógenamente, las líneas celulares de cáncer que expresan GT468 BT-549, Caov-3, EFO-21, MCF-7 y MDA-MB-231 se incubaron con sobrenadante de hibridoma diluido 1:2 en medio de cultivo celular DMEM durante 72 h. La proliferación se analizó midiendo la incorporación de BrdU en cadenas de ADN recién sintetizadas utilizando el kit de proliferación celular DELFIA (Perkin Elmer) de acuerdo con las instrucciones del fabricante en un contador Wallac Victor2 de etiquetas múltiples (Perkin Elmer).

10 Alternativamente, las líneas celulares de cáncer que expresan GT468 endógenamente SK-BR-3 y MCF-7, respectivamente, se incubaron con sobrenadantes de hibridoma purificados por HPLC diluidos en medio de cultivo celular DMEM durante 72 horas o 120 horas a concentraciones como se indica. La proliferación se analizó como se describió anteriormente.

15 Alternativamente, las líneas celulares de cáncer que expresan GT468 endógenamente SK-BR-3, MCF-7, MDA-MB-468, y la línea celular de melanoma GT468 negativa MelHo como control se incubaron con Sobrenadantes de hibridoma purificados por FPLC (10 µg/ml y 50 µg/ml) diluidos en DMEM (SK-BR-3, MCF-7, MDA-MB-468) o medio de cultivo celular RPMI (MelHo) durante 72 h. La proliferación se analizó midiendo la incorporación de BrdU en cadenas de ADN recién sintetizadas utilizando el kit de proliferación celular DELFIA (Perkin Elmer) de acuerdo con las instrucciones del fabricante en un contador Wallac Victor2 de etiquetas múltiples (Perkin Elmer).

20 Microscopía de inmunofluorescencia

25 Con el fin de demostrar la presencia de anticuerpos anti-GT468 en sueros de ratones inmunizados o la unión de anticuerpos monoclonales a células vivas que expresan GT468, se utilizó el análisis por microscopía de inmunofluorescencia. Las células CHO transfectadas con GT468-eGFP se cultivaron en portaobjetos en condiciones de crecimiento estándar en medio DMEM/F12, suplementado con 10% de suero de ternera fetal (FCS), 2 mM de L-glutamina, 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. Las células luego se fijaron con metanol o paraformaldehído/0.1% de saponina. Las células se incubaron con anticuerpos contra GT468 durante 60 minutos a 25°C. Después del lavado, las células se incubaron con un anticuerpo secundario IgG anti-ratón marcado con Alexa555 (Molecular Probes) en las mismas condiciones.

30 GT468 específico de péptido ELISA

35 Se recubrieron placas MaxiSorp o Micro pozos (Nunc) durante una hora a 37°C con el péptido GT468 relevante (5 o 10 µg/ml). El bloqueo se realizó con PBS 3% BSA durante la noche a 4°C. Después de lavar con PBS, las placas se cargaron con sobrenadantes de hibridoma (diluidos 1:5 o 1:10 en PBS/BSA al 3% o diluidos 1:2 en 2 x PBS/BSA al 6%, pH 7,3) o anticuerpos purificados (diluidos 1 µg/ml en PBS/BSA al 3%, pH 7,3) y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente (sacudidas orbitales a 90 rpm). Se añadió anticuerpo secundario (IgG de cabra antiratón conjugado con HRPO, subclases 1+2a+2b+3, Jackson ImmunoResearch) en PBS 3% BSA, pH 7,3 después del lavado con PBS, y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación orbital a 90 rpm Después de una etapa de lavado final con PBS, se añadió una solución de sustrato que consistía en ImM o ABTS 1,5 mM en acetato sódico 100 mM (pH 5.2). Inmediatamente antes del uso, la solución de sustrato se complementó con 0,3 µl por ml de 30% de H₂O₂. La absorción a 405 nm se midió en un lector de placas Tecan Safire (Tecan) después de 30-60 minutos.

45 Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos contra GT468

50 Se aislaron esplenocitos de ratón de animales que se habían inmunizado previamente utilizando diferentes protocolos de inmunización como se describe a continuación y se fusionaron con PEG a una línea celular de mieloma de ratón basada en protocolos estándar. Los hibridomas resultantes se rastrearón a continuación para detectar la producción de inmunoglobulinas con especificidad GT468 utilizando ELISA péptido-específico, células GT468 CrELISA y CHO transfectadas con GT468-eGFP por IF.

55 Las suspensiones de células individuales de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados se fusionaron con células de mieloma de ratón no secretoras P3X63Ag8U.1 (ATCC, CRL 1597) (o células de mieloma de ratón P3X63Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) en el caso de 56-4A-2 y 62-9B-1) en una relación 2:1 utilizando 50% de PEG (Roche Diagnostics, CRL 738641). Las células se plaquearon a aproximadamente 3×10^4 /pozo en placas de microtitulación de fondo plano, seguido de una incubación de aproximadamente dos semanas en medio selectivo que contenía suero fetal bovino al 10%, fusión de hibridoma al 2% y suplemento de clonación (HFCS, Roche Diagnostics, CRL 1 363 735) más HEPES 10 mM, 2-mercaptoetanol 0.055 mM, gentamicina 50 µg/ml e HAT 1x (Sigma, CRL H0262). Después de 10 a 14 días, los pozos individuales se cribaron mediante ELISA específico de péptido para anticuerpos monoclonales anti-GT468. Los hibridomas que secretan anticuerpos se replaquearon, se cribaron de nuevo y, si todavía eran positivos para los anticuerpos monoclonales anti-GT468, se subclonaron por dilución limitante. Los subclones estables se cultivaron in vitro para generar pequeñas cantidades de anticuerpos en medio de cultivo tisular para caracterización. Se eligió por lo menos un clon de cada hibridoma, que retuvo la reactividad de las células progenitoras (por ELISA e IF).

65 Purificación de anticuerpos monoclonales a partir de sobrenadantes de hibridoma

5 El anticuerpo se preparó a partir de sobrenadantes de hibridoma realizando una cromatografía de afinidad en un solo paso utilizando HiTrap™ MabSelect SuRe™. Después de la elución con citrato 100 mM, pH 3.0 - pH 4.0 dependiendo del isotipo del anticuerpo, las fracciones recogidas se neutralizaron inmediatamente con Tris 1M, pH 8.0. Para experimentos adicionales, las preparaciones de anticuerpos se dializaron dos veces frente a 5 L de PBS, se esterilizaron por filtración (0.2 µm) y se almacenaron a 4°C.

Isotipado

10 Para el isotipado de sobrenadantes de hibridoma, se usó el kit de isotipado de anticuerpos monoclonales de ratón IsoStrip (Roche) como se describe por el fabricante.

Procedimiento CrELISA utilizando lisados crudos de lisados bacterianos que expresan GT468

15 • Preparación del antígeno

Las bacterias XLOLR de E. coli se transformaron con plásmido GTQ68 pQE o pQE sin inserción (se denominará "referencia") y se cultivaron en medio LB a A600 nm ~ 0.35 E. La expresión de proteína se indujo con 2 mM IPTG y células se dejaron crecer durante 4 h adicionales a 37°C. La adecuada inducción de la expresión de proteínas y su cinética se controlaron mediante análisis de gel de Coomassie. Las bacterias se centrifugaron y se resuspendieron en un pequeño volumen de PBS pH 7.2 que contenía inhibidor de proteasa 0.2 mM AEBSF-clorhidrato (AppliChem). Las células se colocaron en hielo y se rompieron mediante sonicación (Branson Sonic Power A Smithkline). GT468 y los lisados de referencia se diluyeron hasta una concentración de proteína total de 2 mg/ml en PBS que contenía AEBSF 0.2 mM y glicerol al 20% (v/v). Las alícuotas se congelaron en nitrógeno y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

25 • Conducción del ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas

Antes de su uso, GT468, así como los lisados de referencia, se diluyeron en tampón de recubrimiento (HEPES 100 mM, pH 7.2), luego se transfirieron a placas de microplacas F96 Maxisorp de fondo plano (50 µl/pozo, Nunc) y se adsorbieron durante 2 h a 37°C.

Después de la inmovilización del antígeno, las placas se lavaron dos veces con tampón de lavado (Tris 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, pH 7.2) que contenía Tween 20 al 0.1%, y posteriormente dos veces sin detergente. Se añadieron cincuenta microlitros de suero humano diluido 1:100 por pozo y se incubaron durante 1 h en un agitador orbital a temperatura ambiente. En algunos experimentos, los sueros humanos fueron pretratados antes de someterlos al ensayo.

35 Cada muestra de suero individual se probó por duplicado en paralelo en pozos recubiertos con GT468 o lisado de referencia. Las placas se lavaron nuevamente como se describió anteriormente y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con 50 µl/pozo de anticuerpo secundario (IgG-AP de cabra antihumano, Dianova) diluido 1: 5000 en HEPES 50 mM (pH 7.4) que contenía 3% (p/v) leche en polvo. Las placas se desarrollaron con 100 µl/pozo de solución de sustrato [2 mg de sal nitrogenada de 4-nitrofenil fosfato hexahidrato (Merck) por ml de tampón ALP (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania)] durante 30 min a temperatura ambiente, y los valores de absorbancia se leyeron inmediatamente a 405 nm en un lector de microplacas (Victor2 Wallac, Perkin-Elmer, Turku, Finlandia).

45 Análisis de citometría de flujo

Las células HEK293 transfectadas con el plásmido GT468 pcADN3.1 o el plásmido sin inserción (simulado) se recogieron, se fijaron con metanol helado y se bloquearon con PBS/FCS al 10% durante 30 minutos. Las células se incubaron con sobrenadante de hibridoma para 1 h, se lavaron dos veces con PBS/1 FCS durante 10 minutos, y se incubaron con un anticuerpo secundario de cabra anti-Cy3 de ratón (Jackson ImmunoResearch Laboratories).

50 Adicionalmente, se recogieron células SK-BR-3, MCF-7, MDA-MB-468, NUG-C4 o células HEK293 transfectadas con ADN de plásmido GT468 o plásmido sin inserción (simulado), y se bloquearon con PBS/FCS al 5%/0.1 % de azida sódica. Las células se incubaron con sobrenadante de hibridoma o 5 µg/ml de anticuerpo purificado diluido en PBS/FCS al 5%/azida sódica al 0.1% para 1 h, se lavaron tres veces con PBS/FCS al 5%/azida sódica al 0.1% durante 5 min y se incubaron con un anticuerpo secundario anti-APC de cabra anti-ratón (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Las células se analizaron utilizando un FACSarray de Becton Dickinson.

Ensayo clonogénico

60 El ensayo clonogénico o el ensayo de formación de colonias es un ensayo de supervivencia celular in vitro para analizar la capacidad de una sola célula de crecer en una colonia. Este ensayo se realizó para determinar la efectividad de los anticuerpos GT468 en la capacidad de producir colonias. Las células SK-BR-3 que expresan GT468 se sembraron en placas de 48 pozos (2000 células/pozo). Las células se dejaron crecer durante 2 semanas en presencia de anticuerpos purificados por FPLC a partir de sobrenadantes de hibridoma (45 µg/ml), todos los ensayos se realizaron por triplicado. Las colonias se fijaron y se tificaron con 6% de glutaraldehído (vol/vol) y 0,5% de cristal violeta (peso/volumen). Las

imágenes se tomaron de placas teñidas y secas utilizando una cámara compacta digital Olympus (C-750 Ultra Zoom) y se analizaron visualmente.

Western blots

5 Se prepararon lisados de células completas de células HEK293 transfectadas con plásmido GT468 pcADN3.1 o plásmido sin inserción (simulado) utilizando tampón de lisis basado en Triton-X (HEPES 50 mM (pH 7.4), glicerol al 10% (v/v), 1% (v/v) Triton X-100, NaCl 150 mM, 1,5 mM MgCl₂, 5 mM, EDTA 5 mM, NaF 10 mM). Los extractos se diluyeron en tampón de muestra reductor (Roth), se sometieron a SDS-PAGE y posteriormente se electrotransfirieron a membrana de PVDF (Pall). La inmunotinción se realizó con un anticuerpo policlonal reactivo a GT468 (Koslowski et al. 2007) o anticuerpos purificados por FPLC a partir de sobrenadantes de hibridoma (5 µg/ml) seguido de la detección del anticuerpo primario con anticuerpos secundarios de cabra conjugados con peroxidasa de rábano (Jackson ImmunoResearch Laboratories).

Modelo de xenoinjerto de tratamiento temprano

15 5x10⁶ GT468 células de coriocarcinoma placentario BEWO positivas se inyectaron s.c. en ratones atímicos. 3 días después de la inoculación de las células tumorales, los animales se trataron con anticuerpos monoclonales purificados (200 µg i.v., 8 animales por grupo). Los anticuerpos se administraron dos veces a la semana durante 2 semanas. El crecimiento tumoral se controló utilizando la regla de calibre.

Ensayo de metástasis experimental

25 Una semana antes de la inyección de células MCF-7 dependientes de estrógenos se prepararon ratones atímicos atímicos por s.c. implantación de un sedimento de liberación prolongada de 17β-estradiol (Img, 60 días de liberación, Innovative Research of America). Después de la inyección de 1x10⁶ células MCF-7 i.v. los animales se trataron con anticuerpos monoclonales purificados (200 µg) dos veces a la semana. La PCR en tiempo real se usó para la cuantificación de la carga tumoral en los pulmones de ratones atímicos (5-8 animales por grupo) cinco semanas después de la inyección de las células. El ADN de los tejidos del pulmón se extrajo utilizando QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) y un fragmento de 226 pb de la región alfa-satélite del cromosoma humano 17 (sentido 5'-CAG CTG ACT AAA CAG AAG CAG-3'; antisentido 5'-GAG TTG AAT GCA GTC ATC ACA G-3') se amplificó a partir de 200 ng de ADN. La carga tumoral (número de copias de ADN) se cuantificó en referencia a pulmones normales de ratones de control sanos.

Ejemplo 2: GT468 está activado aberrante y altamente expresado en varios tumores

35 Para identificar genes trofoblásticos específicos de la placenta, se adaptó una estrategia de extracción de datos de todo el genoma, que habíamos desarrollado originalmente para la identificación in silico de moléculas específicas de células germinales (Koslowski, M., Bell, C., Seitz, G., Lehr, HA, Roemer, K., Muntefering, H., Huber, C, Sahin, U. & Tureci, O. (2004) Cancer Res. 64, 5988-5993; Koslowski, M., Tureci, O., Bell, C., Krause, P., Lehr, H. A., Brunner, J., Seitz, G., Nestlé, F. O., Huber, C. y Sahin, U. (2002) Cancer Res. 62, 6750-6755; Koslowski, M., Sahin, U., Huber, C. y Tureci, O. (2006) Hum. Mol. Genet. 15, 2392-2399). En principio, la búsqueda jerárquica de palabras clave de GenBank se combinó con la sustracción digital de colecciones de cADN para la predicción de genes auténticamente placentarios. GT468 fue identificado mediante este enfoque.

45 El ARNm GT468 se investigó en un conjunto completo de muestras de tejido normal y neoplásico mediante RT-PCR de punto final y RT-PCR cuantitativa en tiempo real. Se confirmó que la expresión de GT468 está confinada a la placenta. En todas las demás muestras de tejido normal, las cantidades de transcripción están por debajo o justo en el límite de detección de RT-PCR altamente sensible (Fig. 1A, B, C, Tab. 1). La única excepción son los testículos, aunque con niveles de transcripción de 3 a 4 registros inferiores a los observados en la placenta.

50 Tabla 1. Expresión de GT468 en tejidos y líneas celulares tipadas por RT-PCR de punto final

	Expresión GT468
Tejidos normales	
Testículos	2/3
Placenta	3/3
Cerebro	0/3
Pulmón	0/3
Mama	0/3
Colon	0/3
Hígado	0/3
Estomago	0/3
Riñón	0/3
Próstata	0/3
Páncreas	0/3
Ovario	0/3

Bazo	0/3
Piel	0/2
Miocardio	0/2
Endometrio	0/3
Rest. de PBMC	0/3
Proliferación de PBMC	1/6
Intestino delgado	0/3
Timo	0/2
Glándula adrenal	0/2
Tejidos cancerosos	
Cáncer de mama	44/62
Cáncer de pulmón	21/50
Cáncer gástrico	18/31
Cáncer de ovarios	2/9
Carcinoma hepatocelular	1/5
Líneas de células de cáncer	22/40

Sin embargo, en el 38% (86/225) de las muestras de tumores primarios en diferentes tipos de cáncer y en el 55% (22/40) de las líneas celulares tumorales se detectó una activación aberrante de este gen con una transcripción estrechamente controlada. Los niveles de prevalencia y transcripción de GT468 fueron más altos en líneas celulares de cáncer de mama y cáncer de mama (Fig. 1A, B, C). 44 de 62 (82%) muestras de cáncer de mama primario obtuvieron resultados positivos para la expresión de GT468 (definida como por lo menos 100 veces por encima del fondo en tejidos normales no trofoblásticos), con un 24% (15/62) bajo (100-1000 veces), 40% (25/62) mostró una expresión moderada (1000-10.000 veces) y 17% (11/62) mostrando alta (>10.000 veces) (Fig. 1B). Además, encontramos la transcripción de GT468 en 21 de 50 (42%) muestras de cáncer de pulmón, así como en cáncer gástrico y de ovario (Tabla 1). La inducción de GT468 no se correlacionó con el subtipo histológico, estadio tumoral o grado tumoral.

Utilizando RT-PCR en tiempo real, solo se pudieron detectar trazas de transcritos de GT468 en tejidos normales después de 40 ciclos de RT-PCR. El único tejido normal que excedió el límite de expresión (línea discontinua, expresión media de todos los tejidos normales + 3 ETS (percentil 99%)) fueron placenta y testículo (Fig. 20A). Además del cáncer de mama, encontramos alta expresión de GT468 en muestras de cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de células renales, cáncer hepático, sarcoma, cáncer de tiroides y cáncer de cabeza y cuello (Fig. 20B).

Análisis Western blot de la expresión de GT468 en células HEK293 transfectadas con plásmido de expresión GT468 (control positivo), SK-BR-3 (cáncer de mama), BEWO (coriocarcinoma placentario), JAR (coriocarcinoma placentario), HCT-15 (cáncer de colon), LnCaP (cáncer de próstata), HeLa (cáncer de cuello uterino), MDA-MB-468 (cáncer de mama), JEG-3 (coriocarcinoma placentario), JIMT-1 (cáncer de mama), LA1-55n (neuroblastoma), PC-3 (cáncer de próstata), BT-20 (cáncer de mama) y NC1-H929 (mieloma) demostraron la expresión de GT468 en estas líneas celulares cancerosas (Fig. 21). MelHO (melanoma maligno) y NUGC4 (cáncer gástrico) dieron negativo.

Ejemplo 3: GT468 se encuentra en la superficie de las células cancerosas y es accesible para los anticuerpos

Se generó un anticuerpo de conejo policlonal (conejo anti-GT468/C-term) contra un epítipo peptídico específico de GT468 (aa 117-127 de SEQ ID No: 2). La especificidad del anticuerpo se verificó por silenciamiento génico de GT468 utilizando ARN de interferencia pequeña (siARN). Para excluir siARN fuera de actividad objetivo se llevaron a cabo experimentos con dos conjuntos de dúplex de siARN específicos de GT468, un oligonucleótido no silenciado codificado y células no transfectadas. Al transfectar las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y BT-549 con estos dúplex de siARN, se logró una reducción estable y reproducible de la expresión constitutiva del ARNm de GT468 en un 80-90% en comparación con los controles (Fig. 1D). De acuerdo con esta observación, la banda de 26 K_{Da}, detectada de acuerdo con el tamaño predicho de GT468 en Western blot, casi desapareció por completo en ambas líneas celulares (Fig. 1E), lo que demuestra tanto la caída robusta de la expresión de la proteína GT468 como la especificidad del anticuerpo.

La tinción Western Blot de la proteína GT468 en muestras de tejido humano primario con conejo anti-GT468/C-terminal confirmó que este gen es detectable en muestras de cáncer de mama en niveles comparables a la placenta como el único tejido normal en el que se expresa (Fig. 1F). La inmunohistoquímica con conejo anti-GT468/C-terminal en secciones de tumores de mama humanos mostró inmunorreactividad específica en muestras tipadas positivas para la expresión de ARNm de GT468 mediante RT-PCR. La tinción se limitó a la población de células neoplásicas, mientras que las células epiteliales estromales y no neoplásicas adyacentes, así como los tejidos normales emparejados con los pacientes no fueron reactivos (Fig. 1G). La inmunotinción de las células tumorales se acentuó en la membrana plasmática, proporcionando evidencia de que GT468 es una proteína de superficie celular.

El análisis in silico de la topología de la secuencia de la proteína GT468 predijo un dominio hidrófobo que abarca aa 5 a 22 seguido de un dominio extracelular grande constituido por aa 23 a 212. Los aminoácidos 29 a 119 de la parte

extracelular de GT468 representan un dominio de la zona pelúcida (ZP) truncada. El dominio ZP se encuentra en una variedad de proteínas similares a receptores expuestas extracelularmente, incluyendo TGF-receptor beta tipo III, uromodulina, glicoproteína GP2 así como los receptores de esperma ZP2 y ZP3 (Bork, P. & Sander, C. (1992) FEBS Lett. 300, 237-240) y está involucrado en la polimerización (Jovine, L., Janssen, W.G., Litscher, E.S. & Wassarman, P.M. (2006) BMC. Biochem. 7, 11). La localización subcelular de GT468 expresada constitutivamente se evaluó mediante microscopía de inmunofluorescencia de células de cáncer de mama MCF-7 y BT-549 teñidas con anti-GT468/C-term de conejo, que tiene su epítipo (aa 117 a 127) en la parte supuestamente extracelular de la proteína ambas líneas celulares mostraron una tinción distinta en la membrana celular (Fig. 2A). La pérdida de señal sobre la disminución inducida por siARN de la expresión de GT468 confirmó la especificidad de la tinción. Lo que es más importante, se observó tinción de membrana específica no solo en células nativas fijadas con metanol sino también no fijadas (Fig. 2B) lo que implica que el epítipo del anticuerpo es accesible sin permeabilización de la membrana celular y, por lo tanto, soporta la topología pronosticada con la localización extracelular del extremo carboxi.

Ejemplo 4: el silenciamiento génico inducido por siARN de GT468 inhibe la motilidad, la migración y la invasión y bloquea la proliferación de células cancerosas

Para determinar la importancia biológica de GT468 en células tumorales, se estudiaron los efectos de su silenciamiento génico inducido por siARN en funciones celulares esenciales.

En primer lugar, se investigó el rendimiento de las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y BT-549 en ensayos de migración transwell. La motilidad basal (quimioquinesis) de ambas líneas celulares evaluada mediante la adición de FCS al 5% como quimioatrayente tanto en la cámara superior como en la inferior del sistema se inhibió sustancialmente por los dúplex de siARN específicos de GT468 (Fig. 3A). En consecuencia, también observamos una marcada reducción de la capacidad migratoria quimiotáctica direccional de las células (Fig. 3B). Además, la actividad de quimioinvasión de las células se vio profundamente afectada por el tratamiento con siARN de GT468, ya que las células no pudieron migrar a lo largo de los gradientes quimioatrayentes al atravesar una barrera de Matrigel (Fig. 3C).

A continuación, se observó que la proliferación de células tumorales medida por la incorporación de BrdU en el ADN se redujo en un 80-90% en ambas líneas celulares mediante dúplex de siARN específicos de GT468 (Fig. 4A). El análisis del ciclo celular reveló una detención distintiva de G1/S en las células transfectadas con ARNsi GT468 como la causa subyacente del bloqueo de proliferación (Fig. 4B). La vitalidad de las células no se vio afectada y la tinción de Annexin V no dio indicaciones para la muerte celular apoptótica (Fig. 4C).

Ejemplo 5: El tratamiento de células cancerosas con anticuerpos anti-GT468 inhibe el crecimiento celular

Medimos la proliferación de células MCF-7 y BT-549 incubadas con conejo anti-GT468/C-terminal y un anticuerpo de control no reactivo. El direccionamiento de GT468 dio como resultado una inhibición eficaz de la proliferación de ambas líneas celulares de una manera dependiente de la concentración (Fig. 5).

Ejemplo 6: Efectos posteriores del silenciamiento inducido por siARN y antagonización funcional inducida por anticuerpo de GT468

La proliferación y la progresión del ciclo celular en células eucarióticas se rige por ciclinas y quinasas dependientes de ciclina (CDK). Las ciclinas individuales actúan en diferentes fases del ciclo celular al estimular las actividades de una serie de CDK. El control del punto de restricción está mediado por familias de cinasas dependientes de ciclina D y E (Morgan, D. O. (1997) Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 13, 261-291; Sherr, C. J. (2000) Cancer Res. 60, 3689-3695). Para investigar si el silenciamiento GT468 induce la desregulación observada del ciclo celular mediante la alteración de la expresión de ciclina, se determinó la expresión de ciclinas D1, D2, D3 y ciclina E en MCF-7 y BT-549 células de cáncer de mama tratadas con GT468 siARN.

De manera interesante, una reducción significativa de los transcritos de ciclina D1 medidos por PCR en tiempo real (figura 6A), así como los niveles de proteína de ciclina D1 en la transferencia de Western (Fig. 6B) se produjo como consecuencia de la atenuación de GT468. No se observó ningún cambio en los niveles de transcripción para las otras ciclinas analizadas.

Se sabe que ciclina D1 es un importante regulador de la progresión G1 a S del ciclo celular. Curiosamente, en la tumorigénesis del cáncer de mama esporádico, la sobreexpresión de ciclina D1 se considera como un evento temprano (Caldon, C.E., Daly, R.J., Sutherland, R.L. y Musgrove, E.A. (2006) J. Cell Biochem. 97, 261-274; Sutherland, R. L. y Musgrove, E. A. (2004) J. Mammary. Glándula. Biol. Neoplasia 9, 95-104). Las ciclinas de tipo D son inestables, y su inducción, síntesis y ensamblaje con sus socios catalíticos dependen de la señalización mitogénica persistente. Por lo tanto, las ciclinas de tipo D actúan como sensores del factor de crecimiento, formando quinasas activas en respuesta a factores extracelulares (Sutherland, R. L. y Musgrove, E. A. (2004) J. Mammary. Glándula. Biol. Neoplasia 9, 95-104; Sherr, C. J. (1993) Cell 73, 1059-1065). En el cáncer de mama se ha demostrado que la expresión de ciclina D1 se controla a través de una ruta dependiente de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)/AKT (Sutherland, R. L. y Musgrove, E. A. (2004) J. Mammary. Glándula. Biol. Neoplasia 9, 95-104; D'Amico, M., Hulit, J., Amanatullah, D.F., Zafonte, B.T., Albanese, C., Bouzahzah, B., Fu, M., Augenlicht, L.H., Donehower, L.A., Takemaru, K. et al. (2000) J. Biol. Chem. 275, 32649-32657; Muise-Helmericks, R. C., Grimes, H.L., Bellacosa, A., Malstrom, S.E., Tsichlis, P.N. & Rosen, N. (1998) J. Biol. Chem. 273,

29864-29872). AKT inactiva la glucógeno sintasa quinasa-3beta (GSK-3β), aumentando así la transcripción de ciclina D1, así como su recambio proteolítico y sus niveles de proteína en el núcleo (Sutherland, R. L. y Musgrove, E. A. (2004) *J. Mammary. Glándula. Biol. Neoplasia* 9, 95-104, Diehl, J. A., Cheng, M., Roussel, M. F. y Sherr, C. J. (1998) *Genes Dev.* 12, 3499-3511; Radu, A., Neubauer, V., Akagi, T., Hanafusa, H. y Georgescu, M. M. (2003) *Mol. Cell Biol.* 23, 6139-6149). Además, la vía AKT es un importante regulador de la motilidad y la migración de las células cancerosas (Sutherland, R. L. y Musgrove, E. A. (2004) *J. Mammary. Glándula. Biol. Neoplasia* 9, 95-104, Cantley, L. C. (2002) *Science* 296, 1655-1657; Luo, J., Manning, B. D. y Cantley, L. C. (2003) *Cancer Cell* 4, 257-262), otras dos funciones celulares en las que aparentemente está involucrada GT468. Esto nos llevó a analizar si GT468 tiene un impacto en la regulación de AKT quinasa en células MCF-7 y BT-549.

La fosforilación constitutiva y la hiperactivación de AKT consecutivas a la sobreactivación de PI3K se observan con frecuencia en las células tumorales. La cuantificación de los niveles de fosforilación de Ser473 de AKT (pAKT) posterior al silenciamiento de GT468 por tecnología de siARN y su antagonización funcional con anticuerpo anti-GT468/C-término resultaron en una marcada reducción de los niveles de pAKT en particular en células MCF-7 (Fig. 6C, D), sugiriendo que la activación de la AKT quinasa está involucrada en la ejecución de los efectos descendentes de GT468. Curiosamente, la regulación a la baja de pAKT fue menos prominente en las células BT-549, que carecen de PTEN y, por lo tanto, tienen un mayor nivel de sobreactivación de PI3K.

Ejemplo 7: anticuerpos monoclonales específicos de GT468

Se inmunizaron ratones Balb/c o C57/BL6 con péptidos acoplados a KLH. Se inyectaron 50 µg de péptidos con 50 µl de Montanide ISA 50V como adyuvante por vía intraperitoneal (i.p.) los días 1, 15, 45 y 86. La presencia de anticuerpos dirigidos contra GT468 en sueros de ratones se controló mediante ELISA específica de péptido los días 24, 57 y 92. Los ratones con respuestas inmunes detectables se reforzaron tres días antes de la esplenectomía para la generación de anticuerpos monoclonales.

Los péptidos que tienen secuencias de acuerdo con SEQ ID No: 3-10 se usaron para la generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales. Por ejemplo, la inmunización utilizando el péptido de SEQ ID No: 3 dio los hibridomas 4E9-1H9 y 9B6-2A9, la inmunización utilizando el péptido de SEQ ID No: 4 dio el hibridoma 59D6-2F2, y la inmunización utilizando el péptido de SEQ ID No: 6 dio hibridomas 61C11-2B5 y 78H11-1H6.

Se realizó un ELISA específico de péptido para asegurar la unión específica de los anticuerpos monoclonales. Los sobrenadantes de hibridoma se ensayaron en una dilución 1:5 o 1:10 contra el péptido respectivo usado para la inmunización con piel de ratones. Como control, se analizaron todos los sobrenadantes de hibridoma frente a dos péptidos irrelevantes. Todos los anticuerpos monoclonales reaccionaron específicamente solo con el péptido respectivo utilizado para la inmunización de ratones (Fig. 7).

La unión específica de los anticuerpos monoclonales a la proteína GT468 de longitud completa se analizó mediante microscopía de inmunofluorescencia (IF). 24 h después de la transfección de una construcción de fusión GT468-eGFP, las células CHO se tiñeron con sobrenadantes de hibridoma (dilución 1:5). La combinación de la señal de eGFP y la señal del anticuerpo secundario anti-ratón (Alexa555) mostró tinción solamente de las células transfectadas con GT468-eGFP mientras que las células no transfectadas fueron negativas (Fig. 8).

Para analizar el impacto de los anticuerpos monoclonales que se unen a GT468 en la proliferación de células cancerosas, se incubaron endógenamente líneas celulares de cáncer que expresan GT468 BT-549, Caov-3, EFO-21, MCF-7 y MDA-MB-231 con hibridoma sobrenadantes (dilución 1:2) durante 72 h. La proliferación de células se midió mediante la incorporación de BrdU en el ADN. Mientras que el anticuerpo monoclonal 4E9 1H9 no alteró la proliferación de las células a la concentración utilizada, los anticuerpos 9B6 2A9 y 59D6 2F2 redujeron claramente la proliferación de todas las líneas celulares cancerosas analizadas (Fig. 9).

Por lo tanto, se demostró que pueden producirse anticuerpos monoclonales que se dirigen selectivamente a GT468 expresado por las células. Además, se demostró que pueden producirse anticuerpos monoclonales para GT468 que inhiben la proliferación de células cancerosas que expresan GT468.

Ejemplo 8: anticuerpos monoclonales específicos de GT468 obtenidos a partir de la inmunización con plásmido GT468 pcADN3.1 seguido de inyección de péptido/proteína

Se inmunizaron ratones Balb/c o C57/BL6 con plásmido GT468 pcADN3.1 con PEI Manosa como adyuvante por vía intramuscular (i.m.) en los días 1 y 15. A continuación, se inyectaron 50 µg de péptidos con 50 µl de Montanide ISA 50V como adyuvante (intraperitonealmente) o 150 µg de proteína con adyuvante de Freund incompleto (IFA) (por vía subcutánea) los días 30 y 45. La presencia de anticuerpos dirigidos contra GT468 en sueros de ratones se controló mediante ELISA específica de péptido o cRELISA. Los ratones con respuestas inmunes detectables se reforzaron tres días antes de la esplenectomía para la generación de anticuerpos monoclonales.

La inmunización intramuscular doble utilizando ADN GT468 seguida de administración subcutánea doble de la proteína GT468 recombinante dio como resultado hibridomas 22-1A-1, 22-2A-1, 22- 9B-1, 23-33A-1 y 23-19A-1. La inmunización

intramuscular doble utilizando ADN de GT468 seguido de una administración intraperitoneal doble del péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 10 dio como resultado el hibridoma F11#33F7D12. La inmunización intramuscular doble utilizando ADN de GT468 seguido de una administración intraperitoneal doble del péptido de acuerdo con la SEQ ID No: 3 dio como resultado hibridomas 4A12 2D4 1A10 y 4E9 1D12 2D4.

5

La siguiente tabla enumera los anticuerpos obtenidos y sus isotipos.

Tabla 2. Anticuerpos monoclonales obtenidos por inmunización con ADN GT468 seguido de inyección de péptido/proteína

Hibridoma	Isotipo
22-1A-1	IgG2b
22-2A-1	IgG2b
22-9B-1	IgG2a
32-33A-1	IgG1
23-19A-1	IgG1
F11#33F7D12	IgG1
4A12 2D4 1A10	IgG1
AE9 1S12 2D4	IgG3

10

Se realizó un lisado en bruto (CrELISA) para asegurar la unión específica de los anticuerpos monoclonales de los hibridomas 22-1A-1, 22-2A-1, 22-9B-1, 23-33A-1 y 23-19A-1. Los sobrenadantes de hibridoma se ensayaron frente al lisado de *E. coli* transformado con el vector de expresión pQE GT468. Como control, se ensayaron sobrenadantes de hibridoma en lisado de *E. coli* transformado con plásmido pQE sin inserción (simulado). Todos los anticuerpos monoclonales reaccionaron específicamente solo con el lisado GT468 específico (Fig. 10A).

15

Se realizó un ELISA específico de péptido para asegurar la unión específica de los anticuerpos monoclonales de los hibridomas F11 # 33F7D12, 4A12 2D4 1A10 y 4E9 1D12 2D4. Los sobrenadantes de hibridoma se probaron contra el péptido respectivo usado para la inmunización de ratones. Como control, los sobrenadantes de hibridoma se probaron contra un péptido irrelevante. Los anticuerpos monoclonales reaccionaron específicamente solo con el péptido respectivo usado para la inmunización de ratones (Fig. 10B).

20

La unión específica de los anticuerpos monoclonales a la proteína GT468 de longitud completa se analizó mediante análisis de citometría de flujo como se describe en este documento. Para el análisis de citometría de flujo del anticuerpo monoclonal 4E9 1D12 2D4 se utilizaron células HEK transfectadas transitoriamente con una tasa de transferencia de aprox. 40%. Todos los sobrenadantes de hibridoma mostraron tinción específica de las células transfectadas con GT468, mientras que no se observó tinción en las células transfectadas simuladas (Fig. 11).

25

La unión específica de los anticuerpos monoclonales a la proteína GT468 de longitud completa se analizó mediante transferencia de Western. Todos los sobrenadantes de hibridoma mostraron reactividad específica con lisados de células HEK293 transfectadas con plásmido de expresión pcADN3.1 GT468, mientras que los lisados de células transfectadas simuladas no mostraron señal (Fig. 12; Se cree que la señal débil del sobrenadante de hibridoma 23-33A-1 en el lisado simulado es el resultado del derrame del lisado HEK GT468).

30

Se realizó un ELISA de péptidos para identificar epítomos en la proteína GT468 a la que se unen los anticuerpos monoclonales. La secuencia completa de la proteína GT468 se sintetizó como un conjunto de 51 péptidos de sobreposición (15meros) con un solapamiento de 11 aa. Todos los sobrenadantes de hibridoma se ensayaron en ELISA para la unión específica a estos péptidos. Como control, se usó un péptido irrelevante. Todos los sobrenadantes mostraron unión específica a los péptidos GT468. Los sobrenadantes de hibridoma 22-1A-1, 23-33A-1 y 23-19A-1 muestran cada uno unión a dos péptidos de sobreposición que implican reactividad a un epítomo lineal de GT468. Los patrones de unión de 22-2A-1 y 22-9B-1 fueron más complejos, lo que implica reactividad a los epítomos conformacionales de la proteína GT468.

35

40

Para analizar el impacto de los anticuerpos monoclonales que se unen a GT468 en la proliferación de células cancerosas, se incubaron líneas celulares de cáncer SK-BR-3 (4A12 2D4 1A10) o MCF-7 (4E9 1D12 2D4) endógenamente con hibridoma purificado sobrenadantes durante 72 horas o 120 h en las concentraciones indicadas en la Fig. 14. La proliferación de células se midió mediante la incorporación de BrdU en el ADN. Mientras que el anticuerpo monoclonal de control irrelevante no alteró la proliferación de las células, los anticuerpos monoclonales 4A12 2D4 1A10 y 4E9 1D12 2D4 redujeron claramente la proliferación de células de una manera dependiente de la concentración (Fig. 14).

45

50

Ejemplo 9: anticuerpos monoclonales específicos de GT468 obtenidos utilizando diferentes estrategias de inmunización

Se inmunizaron ratones Balb/c o C57/BL6 como se muestra en la Tabla 3. Péptidos: se inyectaron 50 µg de péptidos con 50 µl de Montanide ISA 50V como adyuvante por vía intraperitoneal (i.p.). ADN: se inyectaron 25 µg de ADN de plásmido GT468 con PEI-manosa como adyuvante por vía intramuscular (i.m.). Proteína recombinante: 150 µg de proteína GT468 con adyuvante de Freund incompleto (IFA) se inyectó por vía subcutánea (s.c). Células: 1-2 x 10⁷ células HEK293

55

transfectadas con ADN de plásmido GT468 fueron inyectadas intraperitonealmente (i.p.). En general, el inmunógeno se administró cada dos semanas. Los ratones con respuestas inmunes detectables se reforzaron tres días antes de la esplenectomía para la generación de anticuerpos monoclonales.

5 Tabla 3. Protocolos de inmunización

Clon	1. Inmunización	2. Inmunización	3. Inmunización	4. Inmunización	5. Inmunización	6. Inmunización	Refuerzo
42H1 1 1C11 2B2	Péptido acoplado a KLH (Seq_ID80)	Péptido acoplado a KLH (Seq_ID80)	Péptido acoplado a KLH (Seq_ID80)	Péptido acoplado a KLH (Seq_ID80)			Péptido (Seq_ID80)
51G6 2H3 2B4 1E3	Péptido acoplado a KLH (Seq_ID80)	Péptido acoplado a KLH (Seq_ID80)	Péptido acoplado a KLH (Seq_ID80)	Péptido acoplado a KLH (Seq_ID80)			Péptido (Seq_ID80)
78H1 1 1H6	Péptido acoplado a KLH (Seq_ID81)	Péptido acoplado a KLH (Seq_ID81)	Péptido acoplado a KLH (Seq_ID81)	Péptido acoplado a KLH (Seq_ID81)			Péptido (Seq_ID81)
16- 5B-1	ADN GT468 (Seq_ID84) + CpG (Seq_ID83)	ADN G468 (Seq_ID84) + CpG (Seq_ID83)	ADN GT468 (Seq_ID84) + CpG (Seq_ID83)	Proteína recomb. GT468 (Seq_ID87)			Proteína recomb. GT468 (Seq_ID87)
20- 11A-1	ADN GT468 (Seq_ID84) + PEI-manosa	ADN GT468 (Seq_ID84) + PEI-manosa	ADN GT468 (Seq_ID84) + PEI-manosa	Proteína recomb. GT468 (Seq_ID87)	Proteína recomb. GT468 (Seq_ID87)		Proteína recomb. GT468 (Seq_ID87)
22- 1A-1	ADN GT468 (Seq_ID84) + PEI-manosa	ADN GT468 (Seq_ID84) + PEI-manosa	Proteína recomb. GT468 (Seq_ID87)				Proteína recomb. GT468 (Seq_ID87)
29- 1A-2 29- 8B-1	ADN GT468 (Seq_ID84) + PEI-manosa	ADN GT468 (Seq_ID84) + PEI-manosa	ADN GT468 (Seq_ID84) + PEI-manosa	Proteína recomb. GT468 (Seq_ID87)	Proteína recomb. GT468 (Seq_ID87)		ADN transcrito de células HEK293 GT468 (Seq_ID84)
35- 48B-1 35- 50A- 2a	ADN GT468 (Seq_ID84) + PEI-manosa	ADN GT468 (Seq_ID84) + PEI-manosa	ADN GT468 (Seq_ID84) + PEI-manosa	Células HEK293 transfectadas con ADN GT468 (Seq_ID84)	Proteína recomb. GT468 (Seq_ID87)		Mezcla de péptidos (Seq_ID57-71)
38- 1A-1 38- 10B-1	ADN GT468 (Seq_ID84) + PEI-manosa	ADN GT468 (Seq_ID84) + PEI-manosa	ADN GT468 (Seq_ID84) + PEI-manosa	Células HEK293 transfectadas con ADN GT468 (Seq_ID86)			Células HEK293 transfectadas con ADN GT468 (Seq_ID85)
44- 3A-2	ADN GT468 (Seq_ID84) + PEI-manosa	ADN GT468 (Seq_ID84) + PEI-manosa	ADN GT468 (Seq_ID84) + PEI-manosa	Células HEK293 transfectadas con ADN GT468 (Seq_ID85)			Células HEK293 transfectadas con ADN GT468 (Seq_ID85)
45- 2A-1 45- 8A-2	ADN GT468 (Seq_ID84) + PEI-manosa	ADN GT468 (Seq_ID84) + PEI-manosa	ADN GT468 (Seq_ID84) + PEI-manosa	Células HEK293 transfectadas con ADN GT468 (Seq_ID85)			Células HEK293 transfectadas con ADN GT468 (Seq_ID85)
48- 3B-1	ADN GT468 (Seq_ID84)	ADN GT468 (Seq_ID84)	ADN GT468 (Seq_ID84)	Células HEK293 transfectada			Células HEK293 transfectada

48-4A-1	+ PEI-manosa	+ PEI-manosa	+ PEI-manosa	s con ADN GT468 (Seq_ID85)			s con ADN GT468 (Seq_ID85)
49-3A-1 49-8A-1	ADN GT468 (Seq_ID84) + PEI-manosa	ADN GT468 (Seq_ID84) + PEI-manosa	ADN GT468 (Seq_ID84) + PEI-manosa	ADN GT468 (Seq_ID85) + PEI-manosa	Células HEK293 transfectadas con ADN GT468 (Seq_ID85)		Células HEK293 transfectadas con ADN GT468 (Seq_ID85)
51-1A-1	Péptido acoplado a KLH (Seq_ID82)	Péptido acoplado a KLH (Seq_ID82)					Células HEK293 transfectadas con ADN GT468 (Seq_ID85)
53-13A-2 53-29A-1	ADN GT468 (Seq_ID84) + PEI-manosa	ADN GT468 (Seq_ID84) + PEI-manosa	ADN GT468 (Seq_ID84) + PEI-manosa	ADN GT468 (Seq_ID85) + CpG (Seq_ID83)	ADN GT468 (Seq_ID85) + CpG (Seq_ID83)	ADN GT468 (Seq_ID85) + CpG (Seq_ID83)	Células HEK293 transfectadas con ADN GT468 (Seq_ID85)
54-4B-2	ADN GT468 (Seq_ID85) + CpG (Seq_ID83)	ADN GT468 (Seq_ID85) + CpG (Seq_ID83)	ADN GT468 (Seq_ID85) + CpG (Seq_ID83)	Células HEK293 transfectadas con ADN GT468 (Seq_ID85)			Células HEK293 transfectadas con ADN GT468 (Seq_ID85)
56-4A-2	ADN GT468 (Seq_ID85) + CpG (Seq_ID83)	ADN GT468 (Seq_ID85) + CpG (Seq_ID83)	ADN GT468 (Seq_ID85) + CpG (Seq_ID83)	Células HEK293 transfectadas con ADN GT468 (Seq_ID85)			Células HEK293 transfectadas con ADN GT468 (Seq_ID85)

La siguiente tabla enumera los anticuerpos obtenidos y sus isotipos.

Tabla 4. Anticuerpos monoclonales obtenidos utilizando diferentes estrategias de inmunización

5

Hibridoma	Isotipo
42H11 1C11 2B2	IgG2b
51G6 2H3 2B4	IgG1
16-5B-1	IgG2a
20-11A-1	IgG2a
29-1A-2	IgG1
29-8B-1	IgG1
35-48B-1	IgG3
35-50A-2a	IgG2a
38-10B-1	IgG2b
38-1A-1	IgG2b
44-3A-2	IgG2a
45-2A-1	IgG2b
45-8A-2	IgG1
48-3B-1	IgG3
48-4A-1	IgG3
49-3A-1	IgG2a
49-8A-1	IgG1

ES 2 659 718 T3

51-1A-1	IgG2a
53-13A-2	IgG2a
53-29A1	IgG2b
54-4B-2	IgG2b
56-4A-2	IgG2a

Estos anticuerpos y dos anticuerpos adicionales 78H11 1H6 (isotipo: IgG1) y 22-1A-1 (isotipo: IgG2b) obtenidos en los ejemplos 7 y 8, respectivamente, se usaron para pruebas adicionales.

- 5 Se realizó un ELISA específico de péptido utilizando el conjunto de 51 péptidos de sobreposición (15meros) con un solapamiento de 11aa mostrado en la Fig. 13 y 25 para identificar los epítomos de la proteína GT468 a la que se unen los anticuerpos monoclonales. Los sobrenadantes de hibridoma purificados se probaron cada uno en el ELISA para la unión específica a todos los péptidos. Como control se usó un péptido irrelevante.
- 10 Como se indica en la Tabla 5, 15 sobrenadantes mostraron unión específica a los péptidos GT468. De estos 15 sobrenadantes, 13 sobrenadantes unidos a 1 péptido, o a 2 o 3 péptidos adyacentes que sugieren el reconocimiento de un epítipo lineal de GT468, y 2 sobrenadantes unidos a péptidos que, por lo menos parcialmente, no son adyacentes, lo que sugiere una relación lineal/definición conformacional del epítipo. 9 sobrenadantes no mostraron unión específica a péptidos GT468 en el ELISA específico de péptido, sin embargo, mostraron unión en el FACS o en el IF, lo que sugiere reactividad a epítomos conformacionales no lineales de GT468.
- 15

Tabla 5. Prueba de anticuerpos monoclonales en un ELISA específico de péptido

Hibridoma	Reactividad (péptido)
42H11 1C11 2B2	47, 48
51G6 2H3 2B4	47, 48
78H11 1H6	50, 51
16-5B-1	47, 48
20-11A-1	47, 48
22-1A-1	50, 51
29-1A-2	27, 29, 30
29-8B-1	49-51
35-48B-1	13
35-50A-2a	Negativo
38-10B-1	Negativo
38-1A-1	Negativo
44-3A-2	31, 32
45-2A-1	Negativo
45-8A-2	Negativo
48-3B-1	Negativo
48-4A-1	Negativo
49-3A-1	29-31
49-8A-1	37, 38
51-1A-1	36, 37
53-13A-2	33, 34
53-29A-1	Negativo
54-4B-2	34, 37
56-4A-2	Negativo

La unión específica de anticuerpos monoclonales de los hibridomas a la proteína GT468 se analizó mediante análisis de citometría de flujo. Células HEK293 nativas no fijadas transfectadas establemente con pDisplay-GT468aal 116-212 o células transfectadas simuladas se tiñeron con sobrenadantes de hibridoma purificados por FPLC (5 µg/ml). En el plásmido pDisplay-GT468aa 116-212, los aminoácidos 116-212 de GT468 se fusionan en el terminal C con un dominio transmembrana del receptor de PDGF. Esta construcción asegura la expresión estable de GT468 aal 116-212 en la membrana plasmática de las células. Las células se tiñeron con los sobrenadantes en un estado no fijado que detecta la unión a GT468 en su conformación nativa. Los sobrenadantes de hibridoma mostraron tinción específica de las células transfectadas con GT468, mientras que no se observó tinción en las células transfectadas simuladas (Fig. 15).

La unión específica de los anticuerpos monoclonales de los hibridomas a células tumorales no fijadas que expresan endógenamente GT468 se analizó mediante análisis de citometría de flujo. Se usaron células de cáncer de mama MCF-7, MDA-MB-468 y SK-BR-3 como células tumorales que expresan GT468 de forma endógena y se usaron células de cáncer gástrico NUG-C4 que no expresan GT468 como control negativo. Las células nativas no fijadas se tiñeron con sobrenadantes de hibridoma purificados por FPLC (5 µg/ml). Los sobrenadantes de hibridoma mostraron tinción específica de células cancerosas que expresan GT468 en diferentes grados. Mientras que para algunos de los sobrenadantes las poblaciones celulares están teñidas significativamente (42H11 1C11 2B2, 22-1A1, 35-50A-2a, 54-4B-2), solo las subpoblaciones (aproximadamente 5% de las células) son positivo para otros sobrenadantes (Fig. 16). Esto indica unión a subpoblaciones que expresan fuertemente. Los resultados demuestran que los anticuerpos son capaces de unirse a células tumorales que expresan GT468.

La unión específica de los anticuerpos monoclonales en sobrenadantes de hibridoma a la proteína GT468 de longitud completa se analizó mediante transferencia de Western. Los sobrenadantes de hibridoma purificados por FPLC (5 µg/ml) mostraron reactividad específica con lisados de células HEK293 transfectadas con un plásmido de expresión GT468, mientras que los lisados de células transfectadas simuladas no mostraron señal que demostrara que la unión a GT468 fuera específica (Fig. 17, 23).

La actividad inhibidora de la proliferación de anticuerpos monoclonales a partir de sobrenadantes de hibridoma se analizó en ensayos de proliferación (Fig. 18, 22). Las células de cáncer de mama que expresan GT468 (SK-BR-3, MDA-MB-468, MCF-7) y células de melanoma MelHo negativas GT468 o células de cáncer gástrico NUGC4 se sembraron en una placa de 96 pozos (5000 células/pozo) y se incubaron con sobrenadantes de hibridoma purificado con FPLC en las concentraciones indicadas. Después de 72 h, se midió la proliferación de células mediante la incorporación de BrdU en el ADN. Todos los valores están normalizados para controlar las células no incubadas con sobrenadante de hibridoma. No se observó inhibición de la proliferación en las células de control MelHo o NUGC4. Los sobrenadantes de hibridoma mostraron actividad inhibidora de la proliferación específica en células de cáncer de mama que expresan GT468 de una manera dependiente de la concentración en diferentes grados. Algunos de los anticuerpos (35-48B-1, 48-3B-1, 51-1A-1, 56-4A-2) mostraron efectos significativos en todas las líneas celulares positivas para GT468 probadas.

Se realizó un ensayo clonogénico para analizar la actividad inhibidora de anticuerpos monoclonales de hibridomas en la formación de colonias de células SK-BR-3 que expresan GT468 de manera endógena. Las células se sembraron en una placa de 48 pozos (3000 células/pozo) y se incubaron con sobrenadantes de hibridoma purificados por FPLC (45 µg/ml). Las colonias sembradas durante un período de tiempo de 14 días se fijaron con glutaraldehído y se tiñeron con violeta cristal para la evaluación visual. La incubación de las células con anticuerpo redujo o inhibió la formación de colonias (Fig. 19). La formación de colonias es importante con respecto a la formación de metástasis si las células tumorales individuales colonizan los órganos. La actividad inhibidora de los anticuerpos indica su potencial para suprimir la formación de metástasis.

Ejemplo 10: El tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-GT468 atenúa el crecimiento tumoral de xenogamas en ratones atímicos

Se inyectaron células de coriocarcinoma placentario BEWO positivas para GT468 s.c. en ratones atímicos y los animales tratados con anticuerpos monoclonales anti-GT468 purificados. La Fig. 24 demuestra que el tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-GT468 atenúa el crecimiento tumoral de xenogama del coriocarcinoma placentario BEWO en ratones atímicos.

Ejemplo 11: El tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-GT468 reduce la carga tumoral metastásica en los pulmones de ratones atímicos

Se inyectaron células MCF-7 i.v. en ratones atímicos pretratados con implantación s.c. de un comprimido de liberación prolongada de 17β-estradiol y los animales tratados con anticuerpos monoclonales anti-GT468 purificados. La PCR en tiempo real utilizada para la cuantificación de la carga tumoral en los pulmones de los ratones atímicos cinco semanas después de la inyección de las células demostró una reducción significativa de la carga tumoral metastásica en los pulmones de los ratones tratados con anticuerpos monoclonales anti-GT468 (Fig. 26).

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Ganymed Pharmaceuticals AG

5 <120> ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

<130> 342-46PCT

<150> EP 08016277.9

10

<151> 2008-09-16

<150> US 61/097,453

15

<151> 2008-09-16

<160> 89

<170> PatentIn version 3.3

20

<210> 1

<211> 1126

25

<212> ADN

<213> Homo sapiens

30

<400> 1

ES 2 659 718 T3

atatatacaga ccatcagaag gatttgtata aagagtgact ctctatgaa ggtaaaggcc 60
 acccctcttc agttccagtg actgagatac atttttccaa tcctgggggc aaatacagac 120
 acagcaagtt ctttcttccc tttggaaatt tggcagctgc cttcaccagt gagcaciaag 180
 ccacatttca aaggaaactg acaaattatc cccagctgcc agaagaagaa atcctcactg 240
 gacggcttcc tgtttcctgt ggttcattat ctgattggct gcagggatga aagtttttaa 300
 gttcatagga ctgatgatcc tcctcacctc tgcgttttca gccggttcag gacaaagtcc 360
 aatgactgtg ctgtgctcca tagactgggt catggtcaca gtgcaccctc tcatgctaaa 420
 caacgatgtg tgtgtacact ttcatagaact acacttgggc ctggggtgcc ccccaaacca 480
 tgttcagcca cagcctacc agttcaccta ccgtgttact gaatgtggca tcagggccaa 540
 agctgtctct caggacatgg ttatctacag cactgagata cactactctt ctaagggcac 600
 gccatctaag tttgtgatcc cagtgtcatg tgctgcccc caaaagtccc catggctcac 660
 caagccctgc tccatgagag tagccagcaa gagcagggcc acagcccaga aggatgagaa 720
 atgctacgag gtgttcagct tgtcacagtc cagtcaaagg cccaactgcg attgtccacc 780
 ttgtgtcttc agtgaagaag agcataccca ggtcccttgt caccaagcag gggctcagga 840
 ggctcaacct ctgcagccat ctcactttct tgatatttct gaggattggg ctcttcacac 900
 agatgatatg attgggtcca tgtgatcctc aggtttgggg tctcctgaag atgctatttc 960
 tagaattagt atatagtgta caaatgtctg acaataaagt gctcttgtga ccctcatgtg 1020
 agcacttttg agaaagagaa acctatagca acttcatgaa ttaagccttt ttctatattt 1080
 ttatattcat gtgtaaacaa aaaataaaat aaaattctga tcgcat 1126

<210> 2

5 <211> 212

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <400> 2

ES 2 659 718 T3

Met Lys Val Phe Lys Phe Ile Gly Leu Met Ile Leu Leu Thr Ser Ala
 1 5 10 15

Phe Ser Ala Gly Ser Gly Gln Ser Pro Met Thr Val Leu Cys Ser Ile
 20 25 30

Asp Trp Phe Met Val Thr Val His Pro Phe Met Leu Asn Asn Asp Val
 35 40 45

Cys Val His Phe His Glu Leu His Leu Gly Leu Gly Cys Pro Pro Asn
 50 55 60

His Val Gln Pro His Ala Tyr Gln Phe Thr Tyr Arg Val Thr Glu Cys
 65 70 75 80

Gly Ile Arg Ala Lys Ala Val Ser Gln Asp Met Val Ile Tyr Ser Thr
 85 90 95

Glu Ile His Tyr Ser Ser Lys Gly Thr Pro Ser Lys Phe Val Ile Pro
 100 105 110

Val Ser Cys Ala Ala Pro Gln Lys Ser Pro Trp Leu Thr Lys Pro Cys
 115 120 125

Ser Met Arg Val Ala Ser Lys Ser Arg Ala Thr Ala Gln Lys Asp Glu
 130 135 140

Lys Cys Tyr Glu Val Phe Ser Leu Ser Gln Ser Ser Gln Arg Pro Asn
 145 150 155 160

Cys Asp Cys Pro Pro Cys Val Phe Ser Glu Glu Glu His Thr Gln Val
 165 170 175

Pro Cys His Gln Ala Gly Ala Gln Glu Ala Gln Pro Leu Gln Pro Ser
 180 185 190

His Phe Leu Asp Ile Ser Glu Asp Trp Ser Leu His Thr Asp Asp Met
 195 200 205

Ile Gly Ser Met
 210

<210> 3

<211> 12
<212> PRT
5 <213> Artificial
<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para Inmunización
10 <400> 3
Ala Pro Gln Lys Ser Pro Trp Leu Thr Lys Pro Cys
1 5 10
15 <210> 4
<211> 13
<212> PRT
20 <213> Artificial
<220>
25 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para Inmunización
<400> 4
Pro Leu Gln Pro Ser His Phe Leu Asp Ile Ser Glu Asp
1 5 10
30 <210> 5
<211> 11
35 <212> PRT
<213> Artificial
<220>
40 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para Inmunización
<400> 5
Ile Tyr Ser Thr Glu Ile His Tyr Ser Ser Lys
45 1 5 10
<210> 6
<211> 12
50 <212> PRT
<213> Artificial
55 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para Inmunización
60 <400> 6

ES 2 659 718 T3

Trp Ser Leu His Thr Asp Asp Met Ile Gly Ser Met
1 5 10

<210> 7

5 <211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para Inmunización

15 <400> 7

Cys Ser Ile Asp Trp Phe Met Val Thr Val His Pro Phe Met Leu
1 5 10 15

<210> 8

20

<211> 12

<212> PRT

25 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para Inmunización

30

<400> 8

Cys Val His Phe His Glu Leu His Leu Gly Leu Gly
1 5 10

35 <210> 9

<211> 15

<212> PRT

40

<213> Artificial

<220>

45 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para Inmunización

<400> 9

Ser Ser Lys Gly Thr Pro Ser Lys Phe Val Ile Pro Val Ser Cys
1 5 10 15

50

<210> 10

<211> 13

55 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

ES 2 659 718 T3

<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para Inmunización

<400> 10

5

Val Phe Ser Leu Ser Gln Ser Ser Gln Arg Pro Asn Cys
1 5 10

<210> 11

10

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

15

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: siARN

20

<400> 11

ccaugagagu agccagcaat t 21

<210> 12

25

<211> 21

<212> ADN

30

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: siARN

35

<400> 12

uugcuggcua cucucaugga g 21

<210> 13

40

<211> 21

<212> ADN

45

<213> Artificial

<220>

50

<223> Descripción de secuencia artificial: siARN

<400> 13

gguucaggac aaaguccaat t 21

55

<210> 14

<211> 21

60

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: siARN
<400> 14
5 uuggacuuug uccugaaccg g 21
<210> 15
10 <211> 21
<212> ADN
<213> Artificial
15 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido
20 <400> 15
aaatttgca gctgccttca c 21
<210> 16
25 <211> 21
<212> ADN
30 <213> Artificial
<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido
35 <400> 16
tgatgccaca ttcagtaaca c 21
40 <210> 17
<211> 326
<212> PRT
45 <213> Artificial
<220>
50 <223> Descripción de secuencia artificial: Traducción de producto PCR
<400> 17

ES 2 659 718 T3

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
1 5 10 15

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
20 25 30

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
35 40 45

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

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
65 70 75 80

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
85 90 95

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
100 105 110

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
165 170 175

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
245 250 255

ES 2 659 718 T3

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
260 265 270

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 18

5 <211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Traducción de producto PCR

15

<400> 18

ES 2 659 718 T3

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

<210> 19

5 <211> 324

<212> ADN

<213> Artificial

10

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: PCR product

15

<400> 19

cgtagcgggtgg ctgcaccatc tgtcttcac cttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60
 ggaactgcct ctggttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagagggc caaagtacag 120
 tggaagggtgg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
 agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
 aaacacaaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaaag 300
 agcttcaaca ggggagagtg ttag 324

<210> 20

20

<211> 981

<212> ADN

ES 2 659 718 T3

<213> Artificial

<220>

5 <223> Descripción de secuencia artificial: PCR product

<400> 20

```
ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc      60
ctgggctgcc tgggtcaagga ctacttcccc gaaccgggtga cgggtgcctg gaactcaggc      120
gccctgacca gcggcgtgca caccttcccc gctgtcctac agtcctcagg actctactcc      180
ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagacctc catctgcaac      240
gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggtg gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac      300
aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc      360
ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc      420
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc      480
gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt      540
gtggtcagcg tcctcacctg cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc      600
aaggctctca acaaagccct cccagcccc atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg      660
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac      720
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg      780
gagagcaatg ggagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac      840
ggctccttct tcctctatag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac      900
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc      960
tccctgtctc cgggtaaagt a                                     981
```

10

<210> 21

<211> 324

15

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

20

<223> Descripción de secuencia artificial: codón de ácido nucleico optimizado

<400> 21

ES 2 659 718 T3

cgtagcgggtgg ccgctcccag cgtgttcatc ttcccccca gcgacgagca gctgaagtcc 60
 ggcaccgcca gcgtggtgtg cctgctgaac aacttctacc cccgggaggg caaggtgcag 120
 tggaaggtgg acaacgccct gcagagcggc aacagccagg agagcgtcac cgagcaggac 180
 agcaaggact ccacctacag cctgagcagc accctgaccc tgagcaaggc cgactacgag 240
 aagcacaagg tgtacgcctg cgaggtgacc caccagggcc tgtccagccc cgtgaccaag 300
 agcttcaaca ggggcgagtg ctag 324

<210> 22

5 <211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: codón de proteína optimizada

15

<400> 22

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 23

20

<211> 981

<212> ADN

ES 2 659 718 T3

<213> Artificial

<220>

5 <223> Descripción de secuencia artificial: codón de ácido nucleico optimizado

<400> 23

```
ggcccaagcg tgttccccct ggccccagc agcaagagca ccagcggcgg cacagccgcc      60
ctgggctgcc tggatgaagga ctacttcccc gagcccgtga ccgtgagctg gaacagcggga    120
gccctgacct ccggcgtgca caccttcccc gccgtgctgc agagcagcgg cctgtacagc      180
ctgagcagcg tggatgaccgt gcccagcagc agcctgggca cccagacctc catctgcaac    240
gtgaaccaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagagag tggagcccaa gagctgcgac      300
aagaccaca cctgcccccc ctgccagcc ccagagctgc tgggcggacc cagcgtgttc     360
ctgttcccc ccaagcccaa ggacaccctg atgatcagca ggacccccga ggtgacctgc     420
gtggtggtgg acgtgagcca cgaggacca gaggtgaagt tcaactggta cgtggacggc      480
gtggaggtgc acaacgcaa gaccaagccc agagaggagc agtacaacag cacctacagg      540
gtggtgtccg tgctgaccgt gctgcaccag gactggctga acggcaagga atacaagtgc     600
aaggtctcca acaaggccct gccagcccc atcgaaaaga ccatcagcaa ggccaagggc     660
cagccacggg agccccaggt gtacaccctg cccccagcc gggaggagat gaccaagaac     720
caggtgtccc tgacctgtct ggtgaagggc ttctaccca gcgacatcgc cgtggagtgg      780
gagagcaacg gccagcccga gaacaactac aagaccacc ccccagtgct ggacagcgac     840
ggcagcttct tcctgtacag caagctgacc gtggacaagt ccaggtggca gcagggcaac     900
gtgttcagct gcagcgtgat gcacgaggcc ctgcacaacc actacacca gaagtccctg     960
agcctgagcc ccggcaagta g                                           981
```

10

<210> 24

<211> 326

15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20

<223> Descripción de secuencia artificial: codón de proteína optimizada

<400> 24

ES 2 659 718 T3

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
1 5 10 15

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
20 25 30

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
35 40 45

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

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
65 70 75 80

ES 2 659 718 T3

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
85 90 95

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
100 105 110

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
165 170 175

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
260 265 270

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 25

<211> 21
<212> ADN
5 <213> Artificial
<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido
10 <400> 25
tgactggc aaaacaatgc a 21
15 <210> 26
<211> 21
<212> ADN
20 <213> Artificial
<220>
25 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido
<400> 26
ggccttttc accagcaagc t 21
30 <210> 27
<211> 21
35 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
40 <223> Descripción de secuencia artificial: siARN
<400> 27
45 uaacuguaua aucgacuagt t 21
<210> 28
<211> 21
50 <212> ADN
<213> Artificial
55 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: siARN
<400> 28
60 cuagucgauu auacaguuag a 21
<210> 29
65 <211> 15

ES 2 659 718 T3

<212> PRT
<213> Artificial
5 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado
<400> 29
10 Met Lys Val Phe Lys Phe Ile Gly Leu Met Ile Leu Leu Thr Ser
1 5 10 15
<210> 30
15 <211> 15
<212> PRT
<213> Artificial
20 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado
25 <400> 30
Lys Phe Ile Gly Leu Met Ile Leu Leu Thr Ser Ala Phe Ser Ala
1 5 10 15
<210> 31
30 <211> 15
<212> PRT
35 <213> Artificial
<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado
40 <400> 31
Leu Met Ile Leu Leu Thr Ser Ala Phe Ser Ala Gly Ser Gly Gln
1 5 10 15
45 <210> 32
<211> 15
<212> PRT
50 <213> Artificial
<220>
55 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado
<400> 32
Leu Thr Ser Ala Phe Ser Ala Gly Ser Gly Gln Ser Pro Met Thr
1 5 10 15

ES 2 659 718 T3

<210> 33
<211> 15
5 <212> PRT
<213> Artificial
10 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado
<400> 33
15 Phe Ser Ala Gly Ser Gly Gln Ser Pro Met Thr Val Leu Cys Ser
1 5 10 15
<210> 34
20 <211> 15
<212> PRT
<213> Artificial
25 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado
30 <400> 34
Ser Gly Gln Ser Pro Met Thr Val Leu Cys Ser Ile Asp Trp Phe
1 5 10 15
<210> 35
35 <211> 15
<212> PRT
40 <213> Artificial
<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado
45 <400> 35
Pro Met Thr Val Leu Cys Ser Ile Asp Trp Phe Met Val Thr Val
1 5 10 15
50 <210> 36
<211> 15
<212> PRT
55 <213> Artificial
<220>
60 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado

ES 2 659 718 T3

<400> 36
Leu Cys Ser Ile Asp Trp Phe Met Val Thr Val His Pro Phe Met
1 5 10 15
5 <210> 37
<211> 15
<212> PRT
10 <213> Artificial
<220>
15 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado
<400> 37
Asp Trp Phe Met Val Thr Val His Pro Phe Met Leu Asn Asn Asp
1 5 10 15
20 <210> 38
<211> 15
<212> PRT
25 <213> Artificial
<220>
30 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado
<400> 38
Val Thr Val His Pro Phe Met Leu Asn Asn Asp Val Cys Val His
1 5 10 15
35 <210> 39
<211> 15
40 <212> PRT
<213> Artificial
45 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado
<400> 39
50 Pro Phe Met Leu Asn Asn Asp Val Cys Val His Phe His Glu Leu
1 5 10 15
<210> 40
55 <211> 15
<212> PRT
<213> Artificial
60

ES 2 659 718 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado

5 <400> 40

Asn	Asn	Asp	Val	Cys	Val	His	Phe	His	Glu	Leu	His	Leu	Gly	Leu
1				5					10					15

<210> 41

<211> 15

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado

20 <400> 41

Cys	Val	His	Phe	His	Glu	Leu	His	Leu	Gly	Leu	Gly	Cys	Pro	Pro
1				5					10					15

<210> 42

<211> 15

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado

35 <400> 42

His	Glu	Leu	His	Leu	Gly	Leu	Gly	Cys	Pro	Pro	Asn	His	Val	Gln
1				5					10					15

<210> 43

<211> 15

<212> PRT

45 <213> Artificial

<220>

50 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado

<400> 43

Leu	Gly	Leu	Gly	Cys	Pro	Pro	Asn	His	Val	Gln	Pro	His	Ala	Tyr
1				5					10					15

<210> 44

<211> 15

60

ES 2 659 718 T3

<212> PRT
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado
 <400> 44
 10 Cys Pro Pro Asn His Val Gln Pro His Ala Tyr Gln Phe Thr Tyr
 1 5 10 15
 <210> 45
 15 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado
 25 <400> 45
 His Val Gln Pro His Ala Tyr Gln Phe Thr Tyr Arg Val Thr Glu
 1 5 10 15
 <210> 46
 30 <211> 15
 <212> PRT
 35 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado
 40 <400> 46
 His Ala Tyr Gln Phe Thr Tyr Arg Val Thr Glu Cys Gly Ile Arg
 1 5 10 15
 45 <210> 47
 <211> 15
 <212> PRT
 50 <213> Artificial
 <220>
 55 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado
 <400> 47
 Phe Thr Tyr Arg Val Thr Glu Cys Gly Ile Arg Ala Lys Ala Val
 1 5 10 15
 60

ES 2 659 718 T3

<210> 48
<211> 15
5 <212> PRT
<213> Artificial
<220>
10 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado
<400> 48
Val Thr Glu Cys Gly Ile Arg Ala Lys Ala Val Ser Gln Asp Met
15 1 5 10 15
<210> 49
<211> 15
20 <212> PRT
<213> Artificial
<220>
25 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado
<400> 49
30 Gly Ile Arg Ala Lys Ala Val Ser Gln Asp Met Val Ile Tyr Ser
1 5 10 15
<210> 50
35 <211> 15
<212> PRT
<213> Artificial
40 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado
45 <400> 50
Lys Ala Val Ser Gln Asp Met Val Ile Tyr Ser Thr Glu Ile His
1 5 10 15
<210> 51
50 <211> 15
<212> PRT
55 <213> Artificial
<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado
60 <400> 51

ES 2 659 718 T3

Gln Asp Met Val Ile Tyr Ser Thr Glu Ile His Tyr Ser Ser Lys
1 5 10 15

5 <210> 52
<211> 15
<212> PRT
10 <213> Artificial
<220>
15 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado

Ile Tyr Ser Thr Glu Ile His Tyr Ser Ser Lys Gly Thr Pro Ser
1 5 10 15

20 <210> 53
<211> 15
<212> PRT
25 <213> Artificial
<220>
30 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado

Glu Ile His Tyr Ser Ser Lys Gly Thr Pro Ser Lys Phe Val Ile
1 5 10 15

35 <210> 54
<211> 15
<212> PRT
40 <213> Artificial
<220>
45 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado

Ser Ser Lys Gly Thr Pro Ser Lys Phe Val Ile Pro Val Ser Cys
1 5 10 15

<210> 55
<211> 15
55 <212> PRT
<213> Artificial

ES 2 659 718 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado

5 <400> 55

Thr	Pro	Ser	Lys	Phe	Val	Ile	Pro	Val	Ser	Cys	Ala	Ala	Pro	Gln
1				5					10					15

<210> 56

10

<211> 15

<212> PRT

15

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado

20

<400> 56

Phe	Val	Ile	Pro	Val	Ser	Cys	Ala	Ala	Pro	Gln	Lys	Ser	Pro	Trp
1				5					10					15

<210> 57

25

<211> 15

<212> PRT

30

<213> Artificial

<220>

35

<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado

<400> 57

Val	Ser	Cys	Ala	Ala	Pro	Gln	Lys	Ser	Pro	Trp	Leu	Thr	Lys	Pro
1				5					10					15

40

<210> 58

<211> 15

45

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

50

<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado

<400> 58

Ala	Pro	Gln	Lys	Ser	Pro	Trp	Leu	Thr	Lys	Pro	Cys	Ser	Met	Arg
1				5					10					15

55

<210> 59

<211> 15

60

ES 2 659 718 T3

<212> PRT
<213> Artificial
5 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado
<400> 59
10 Ser Pro Trp Leu Thr Lys Pro Cys Ser Met Arg Val Ala Ser Lys
1 5 10 15
<210> 60
15 <211> 15
<212> PRT
<213> Artificial
20 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado
25 <400> 60
Thr Lys Pro Cys Ser Met Arg Val Ala Ser Lys Ser Arg Ala Thr
1 5 10 15
<210> 61
30 <211> 15
<212> PRT
35 <213> Artificial
<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado
40 <400> 61
Ser Met Arg Val Ala Ser Lys Ser Arg Ala Thr Ala Gln Lys Asp
1 5 10 15
45 <210> 62
<211> 15
<212> PRT
50 <213> Artificial
<220>
55 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado
<400> 62
Ala Ser Lys Ser Arg Ala Thr Ala Gln Lys Asp Glu Lys Cys Tyr
1 5 10 15
60

ES 2 659 718 T3

<210> 63
<211> 15
5 <212> PRT
<213> Artificial
<220>
10 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado
<400> 63
Arg Ala Thr Ala Gln Lys Asp Glu Lys Cys Tyr Glu Val Phe Ser
1 5 10 15
<210> 64
<211> 15
20 <212> PRT
<213> Artificial
<220>
25 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado
<400> 64
30 Gln Lys Asp Glu Lys Cys Tyr Glu Val Phe Ser Leu Ser Gln Ser
1 5 10 15
<210> 65
35 <211> 15
<212> PRT
<213> Artificial
40 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado
45 <400> 65
Lys Cys Tyr Glu Val Phe Ser Leu Ser Gln Ser Ser Gln Arg Pro
1 5 10 15
<210> 66
50 <211> 15
<212> PRT
55 <213> Artificial
<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado
60 <400> 66

ES 2 659 718 T3

Val Phe Ser Leu Ser Gln Ser Ser Gln Arg Pro Asn Cys Asp Cys
 1 5 10 15
 <210> 67
 5 <211> 15
 <212> PRT
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado
 15 <400> 67
 Ser Gln Ser Ser Gln Arg Pro Asn Cys Asp Cys Pro Pro Cys Val
 1 5 10 15
 20 <210> 68
 <211> 15
 <212> PRT
 25 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado
 <400> 68
 Gln Arg Pro Asn Cys Asp Cys Pro Pro Cys Val Phe Ser Glu Glu
 1 5 10 15
 35 <210> 69
 <211> 15
 40 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 45 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado
 <400> 69
 Cys Asp Cys Pro Pro Cys Val Phe Ser Glu Glu Glu His Thr Gln
 50 1 5 10 15
 <210> 70
 <211> 15
 55 <212> PRT
 <213> Artificial
 60 <220>

ES 2 659 718 T3

<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado
<400> 70
5 Pro Cys Val Phe Ser Glu Glu Glu His Thr Gln Val Pro Cys His
1 5 10 15
<210> 71
10 <211> 15
<212> PRT
<213> Artificial
15 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado
20 <400> 71
Ser Glu Glu Glu His Thr Gln Val Pro Cys His Gln Ala Gly Ala
1 5 10 15
<210> 72
25 <211> 15
<212> PRT
<213> Artificial
30 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado
35 <400> 72
His Thr Gln Val Pro Cys His Gln Ala Gly Ala Gln Glu Ala Gln
1 5 10 15
40 <210> 73
<211> 15
<212> PRT
45 <213> Artificial
<220>
50 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado
<400> 73
Pro Cys His Gln Ala Gly Ala Gln Glu Ala Gln Pro Leu Gln Pro
1 5 10 15
55 <210> 74
<211> 15

ES 2 659 718 T3

<212> PRT
<213> Artificial
5 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado
<400> 74
10 Ala Gly Ala Gln Glu Ala Gln Pro Leu Gln Pro Ser His Phe Leu
1 5 10 15
<210> 75
15 <211> 15
<212> PRT
<213> Artificial
20 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado
25 <400> 75
Glu Ala Gln Pro Leu Gln Pro Ser His Phe Leu Asp Ile Ser Glu
1 5 10 15
<210> 76
30 <211> 15
<212> PRT
35 <213> Artificial
<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado
40 <400> 76
Leu Gln Pro Ser His Phe Leu Asp Ile Ser Glu Asp Trp Ser Leu
1 5 10 15
45 <210> 77
<211> 15
<212> PRT
50 <213> Artificial
<220>
55 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado
<400> 77
His Phe Leu Asp Ile Ser Glu Asp Trp Ser Leu His Thr Asp Asp
1 5 10 15
60

ES 2 659 718 T3

<210> 78
<211> 15
5 <212> PRT
<213> Artificial
<220>
10 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado
<400> 78
Ile Ser Glu Asp Trp Ser Leu His Thr Asp Asp Met Ile Gly Ser
15 1 5 10 15
<210> 79
<211> 15
20 <212> PRT
<213> Artificial
<220>
25 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para cribado
<400> 79
30 Ser Glu Asp Trp Ser Leu His Thr Asp Asp Met Ile Gly Ser Met
1 5 10 15
<210> 80
35 <211> 14
<212> PRT
<213> Artificial
40 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para Inmunización
45 <400> 80
Cys Pro Leu Gln Pro Ser His Phe Leu Asp Ile Ser Glu Asp
1 5 10
<210> 81
50 <211> 13
<212> PRT
55 <213> Artificial
<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para Inmunización
60 <400> 81

ES 2 659 718 T3

Cys Trp Ser Leu His Thr Asp Asp Met Ile Gly Ser Met
1 5 10

<210> 82

5

<211> 25

<212> PRT

10

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para Inmunización

15

<400> 82

Cys Tyr Glu Val Phe Ser Leu Ser Gln Ser Ser Gln Arg Pro Asn Cys
1 5 10 15

Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Cys
20 25

20

<210> 83

<211> 20

<212> ADN

25

<213> Artificial

<220>

30

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido para Inmunización

<400> 83

tccatgacgt tctgacgtt 20

35

<210> 84

<211> 639

40

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

45

<223> Descripción de secuencia artificial: Inserto de Plásmido optimizado

<400> 84

ES 2 659 718 T3

atgaaggtgt tcaagttcat cggcctgatg atcctgctga ccagcgcctt cagcgccggc 60
 agcggccaga gccccatgac cgtgctgtgc agcatcgact ggttcatggt gaccgtgcac 120
 cccttcatgc tgaacaacga cgtgtgcgtg cacttccacg agctgcacct gggcctgggc 180
 tgccctcca accacgtgca gccccacgcc taccagttca cctaccgggt gaccgagtgc 240
 ggcatccggg ccaaggccgt gagccaggac atggtgatct acagcaccga gatccactac 300
 agcagcaagg gcaccccag caagttcgtg atccccgtga gctgtgccgc ccctcagaag 360
 agcccctggc tgaccaagcc ctgcagcatg cgggtggcca gcaagagccg ggccaccgcc 420
 cagaaagacg agaagtgcta cgaggtgttc agcctgagcc agagcagcca gcggcccaac 480
 tgcgactgcc ccccctgcgt gttcagcgag gaagagcaca cccaggtgcc ctgccaccag 540
 gccggagccc aggaagccca gcccctgcag cccagccact tcctggacat cagcgaggac 600
 tggtcctgc acaccgacga catgatcggc agcatgtga 639

<210> 85

5 <211> 495

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Inserto de Plásmido optimizado

15 <400> 85

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60
 gactatccat atgatgttcc agattatgct ggggcccagc cggccagatc tgccgcccct 120
 cagaagagcc cctggctgac caagccctgc agcatgcggg tggccagcaa gagccgggcc 180
 accgcccaga aagacgagaa gtgctacgag gtgttcagcc tgagccagag cagccagcgg 240
 cccaactgcg actgcccccc ctgcgtgttc agcgaggaag agcacacca ggtgccctgc 300
 caccaggtcg acgaacaaaa actcatctca gaagaggatc tgaatgctgt gggccaggac 360
 acgcaggagg tcatcgtggt gccacactcc ttgcccttta aggtggtggt gatctcagcc 420
 atcctggccc tgggtggtgct caccatcatc tccttatca tcctcatcat gctttggcag 480
 aagaagccac gttag 495

<210> 86

20 <211> 588

<212> ADN

25 <213> Artificial

<220>

ES 2 659 718 T3

<223> Descripción de secuencia artificial: Inserto de Plásmido optimizado

<400> 86

5 atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60
gactatccat atgatgttcc agattatgct ggggccccagc cggccagatc tgccgccct 120
--
cagaagagcc cctggctgac caagccctgc agcatgcggg tggccagcaa gagccgggcc 180
accgcccaga aagacgagaa gtgctacgag gtgttcagcc tgagccagag cagccagcgg 240
cccaactgcg actgcccccc ctgctgtgttc agcgaggaag agcacacca ggtgccctgc 300
caccaggccg gagcccagga agcccagccc ctgcagccca gccacttctt ggacatcagc 360
gaggactggt ccctgcacac cgacgacatg atcggcagca tggtcgacga acaaaaactc 420
atctcagaag aggatctgaa tgctgtgggc caggacacgc aggaggatcat cgtgggtgcca 480
cactccttgc cctttaaggt ggtggtgatc tcagccatcc tggccctggt ggtgctcacc 540
atcatctccc ttatcatcct catcatgctt tggcagaaga agccacgtta g 591

10 <210> 87

<211> 579

<212> PRT

15

<213> Artificial

<220>

20 <223> Descripción de secuencia artificial: proteína recombinante para inmunización

<400> 87

ES 2 659 718 T3

Met Ser Gly Ser His His His His His His Ser Ser Gly Met His Lys
 1 5 10 15

Ile Glu Glu Gly Lys Leu Val Ile Trp Ile Asn Gly Asp Lys Gly Tyr
 20 25 30

Asn Gly Leu Ala Glu Val Gly Lys Lys Phe Glu Lys Asp Thr Gly Ile
 35 40 45

Lys Val Thr Val Glu His Pro Asp Lys Leu Glu Glu Lys Phe Pro Gln
 50 55 60

Val Ala Ala Thr Gly Asp Gly Pro Asp Ile Ile Phe Trp Ala His Gly
 65 70 75 80

Arg Phe Gly Gly Tyr Ala Gln Ser Gly Leu Leu Ala Glu Ile Thr Pro
 85 90 95

Asp Lys Ala Phe Gln Asp Lys Leu Tyr Pro Phe Thr Trp Asp Ala Val
 100 105 110

Arg Tyr Asn Gly Lys Leu Ile Ala Tyr Pro Ile Ala Val Glu Ala Leu
 115 120 125

Ser Leu Ile Tyr Asn Lys Asp Leu Leu Pro Asn Pro Pro Lys Thr Trp
 130 135 140

ES 2 659 718 T3

Glu Glu Ile Pro Ala Leu Asp Lys Glu Leu Lys Ala Lys Gly Lys Ser
 145 150 155 160

Ala Leu Met Phe Asn Leu Gln Glu Pro Tyr Phe Thr Trp Pro Leu Ile
 165 170 175

Ala Ala Asp Gly Gly Tyr Ala Phe Lys Tyr Glu Asn Gly Lys Tyr Asp
 180 185 190

Ile Lys Asp Val Gly Val Asp Asn Ala Gly Ala Lys Ala Gly Leu Thr
 195 200 205

Phe Leu Val Asp Leu Ile Lys Asn Lys His Met Asn Ala Asp Thr Asp
 210 215 220

Tyr Ser Ile Ala Glu Ala Ala Phe Asn Lys Gly Glu Thr Ala Met Thr
 225 230 235 240

Ile Asn Gly Pro Trp Ala Trp Ser Asn Ile Asp Thr Ser Lys Val Asn
 245 250 255

Tyr Gly Val Thr Val Leu Pro Thr Phe Lys Gly Gln Pro Ser Lys Pro
 260 265 270

Phe Val Gly Val Leu Ser Ala Gly Ile Asn Ala Ala Ser Pro Asn Lys
 275 280 285

Glu Leu Ala Lys Glu Phe Leu Glu Asn Tyr Leu Leu Thr Asp Glu Gly
 290 295 300

Leu Glu Ala Val Asn Lys Asp Lys Pro Leu Gly Ala Val Ala Leu Lys
 305 310 315 320

Ser Tyr Glu Glu Glu Leu Ala Lys Asp Pro Arg Ile Ala Ala Thr Met
 325 330 335

Glu Asn Ala Gln Lys Gly Glu Ile Met Pro Asn Ile Pro Gln Met Ser
 340 345 350

Ala Phe Trp Tyr Ala Val Arg Thr Ala Val Ile Asn Ala Ala Ser Gly
 355 360 365

Arg Gln Thr Val Asp Glu Ala Leu Lys Asp Ala Gln Thr Asn Ala Ala
 370 375 380

Ala Met His Ser Ser Ser Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn
 385 390 395 400

ES 2 659 718 T3

Leu Gly Ile Glu Gly Arg Pro Gly Arg Gly Arg Asn Asn Asp Val Cys
 405 410 415

Val His Phe His Glu Leu His Leu Gly Leu Gly Cys Pro Pro Asn His
 420 425 430

Val Gln Pro His Ala Tyr Gln Phe Thr Tyr Arg Val Thr Glu Cys Gly
 435 440 445

Ile Arg Ala Lys Ala Val Ser Gln Asp Met Val Ile Tyr Ser Thr Glu
 450 455 460

Ile His Tyr Ser Ser Lys Gly Thr Pro Ser Lys Phe Val Ile Pro Val
 465 470 475 480

Ser Cys Ala Ala Pro Gln Lys Ser Pro Trp Leu Thr Lys Pro Cys Ser
 485 490 495

Met Arg Val Ala Ser Lys Ser Arg Ala Thr Ala Gln Lys Asp Glu Lys
 500 505 510

Cys Tyr Glu Val Phe Ser Leu Ser Gln Ser Ser Gln Arg Pro Asn Cys
 515 520 525

Asp Cys Pro Pro Cys Val Phe Ser Glu Glu Glu His Thr Gln Val Pro
 530 535 540

Cys His Gln Ala Gly Ala Gln Glu Ala Gln Pro Leu Gln Pro Ser His
 545 550 555 560

Phe Leu Asp Ile Ser Glu Asp Trp Ser Leu His Thr Asp Asp Met Ile
 565 570 575

Gly Ser Met

<210> 88

5

<211> 21

<212> ADN

10

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido

ES 2 659 718 T3

<400> 88
cagctgacta aacagaagca g 21
5
<210> 89
<211> 22
10 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
15 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido
<400> 89
20 gagttgaatg cagtcacac ag 22

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste de:
- 5 (i) un anticuerpo producido u obtenido de un clon depositado bajo el número de acceso. DSM ACC2944 (51-1A-1),
(ii) un anticuerpo que es una forma quimerizada o humanizada del anticuerpo en (i), y
10 (iii) un anticuerpo que comprende la porción de unión a antígeno o sitio de unión a antígeno del anticuerpo en (i),
en el que dicho anticuerpo se une a un polipéptido que consiste de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 de
la secuencia e inhibe la proliferación de células que expresan dicho polipéptido.
2. Un hibridoma seleccionado del grupo que consiste de:
- 15 (i) un hibridoma que produce el anticuerpo de la reivindicación 1,
(ii) un hibridoma depositado bajo el número de acceso DSM ACC2944 (51-1A-1).
- 20 3. Un conjugado que comprende un anticuerpo de la reivindicación 1 acoplado a un agente terapéutico, preferiblemente
una toxina, un radioisótopo, un fármaco o agente citotóxico.
4. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la reivindicación 1 y/o un conjugado de la reivindicación
3, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 25 5. Un anticuerpo de la reivindicación 1 y/o un conjugado de la reivindicación 3, para uso en un método de tratamiento de
un trastorno o enfermedad relacionado con tumores, caracterizado por células que expresan un polipéptido que consiste
de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 2 de la lista de secuencias y/o que se caracteriza por la
asociación de dicho polipéptido con su superficie celular en un sujeto.
- 30 6. El anticuerpo o conjugado para uso como se reivindica en la reivindicación 5, en el que dicho método de tratamiento es
(i) un método para inhibir el crecimiento de dicha célula, o (ii) un método para matar dicha célula, (iii) un método para
inhibir la diseminación metastásica de dicha célula.
- 35 7. El anticuerpo o conjugado para uso de la reivindicación 5 o 6, en el que la enfermedad o trastorno es cáncer.
8. El anticuerpo o conjugado para uso de la reivindicación 7, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste de
cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de ovario, cáncer hepatocelular, cáncer de colon, cáncer de
páncreas, cáncer esofágico, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, en particular carcinoma de células renales, cáncer
de próstata, cáncer de hígado, melanoma, sarcoma, mieloma, neuroblastoma, coriocarcinoma placentario, cáncer de
40 cuello uterino y cáncer de tiroides, y las formas metastásicas de los mismos, y cáncer metastásico en el pulmón.

Fig. 1

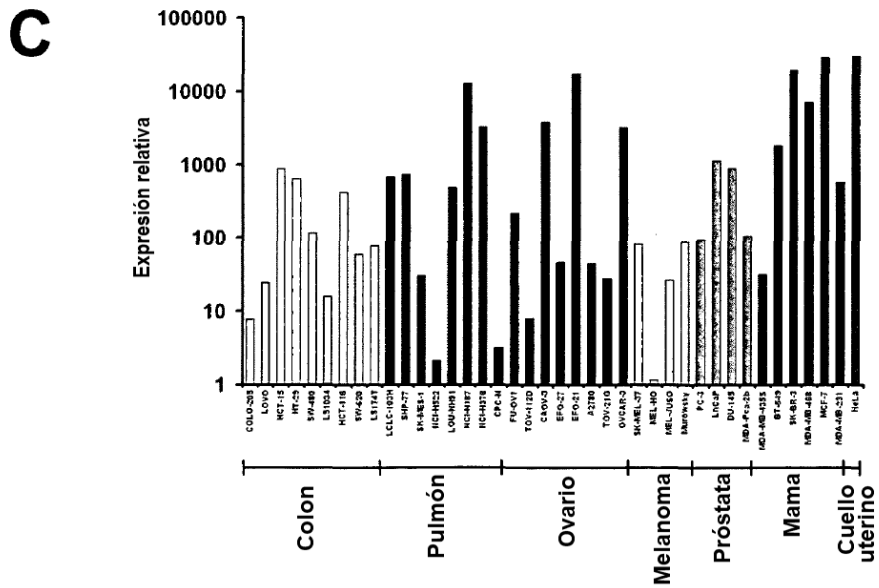
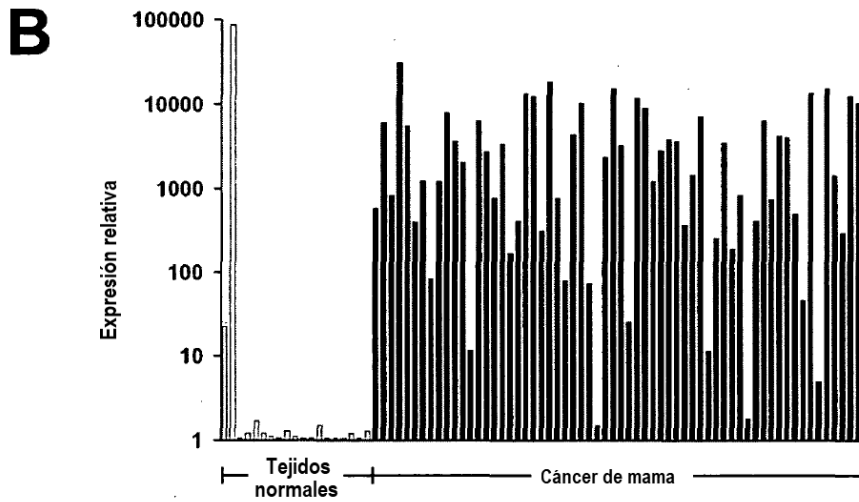
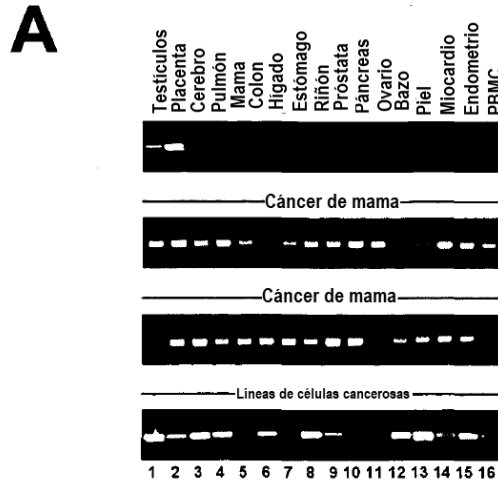


Fig. 1

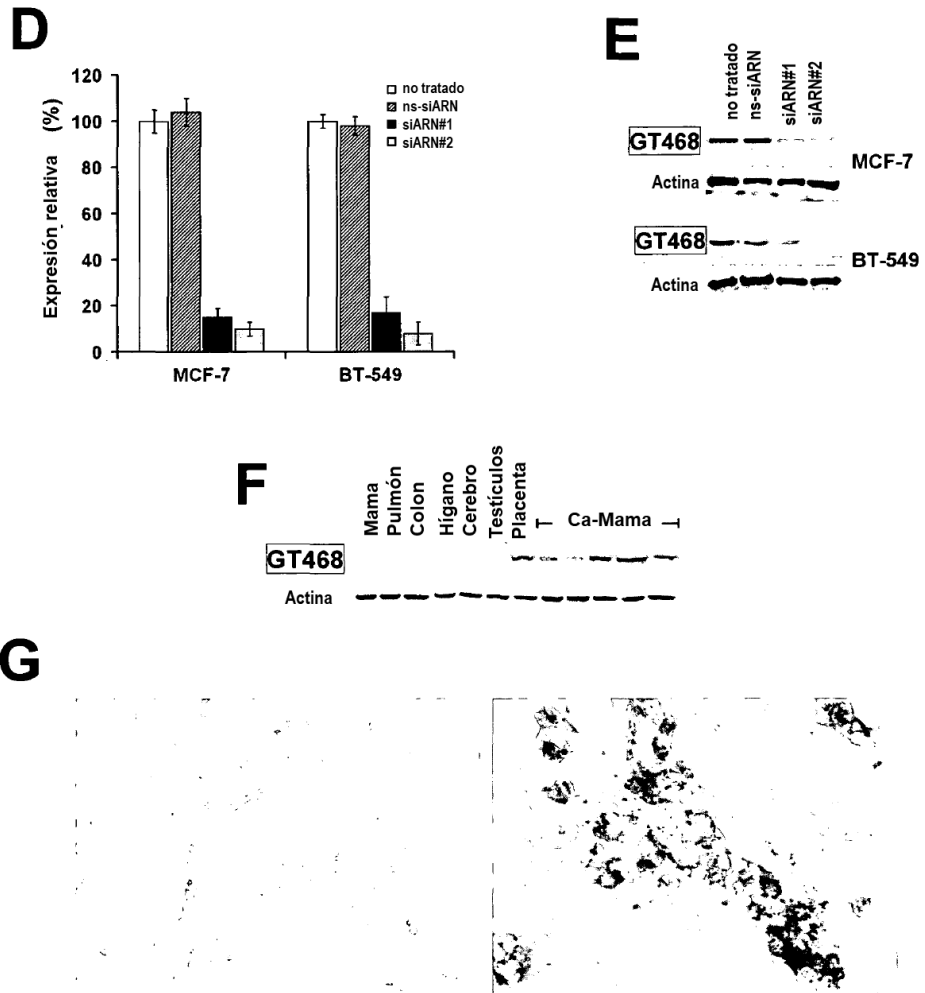


Fig. 2

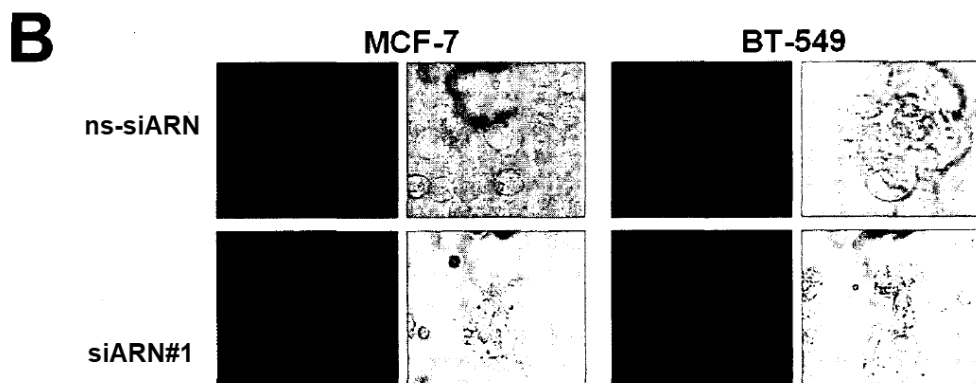
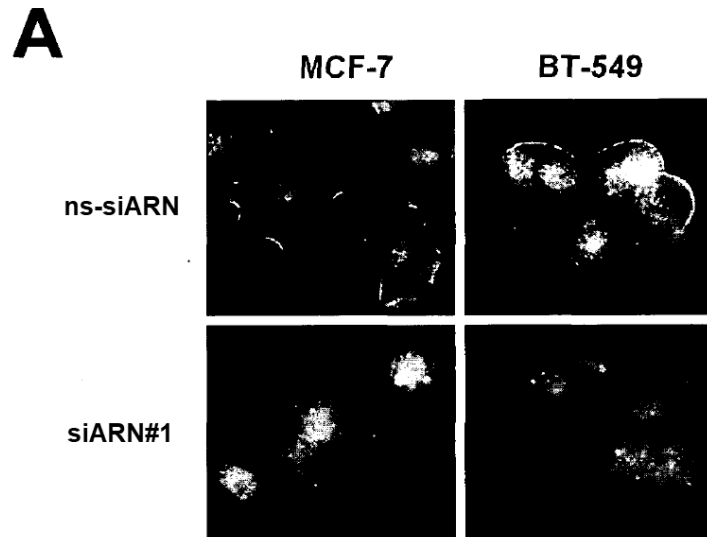


Fig. 3

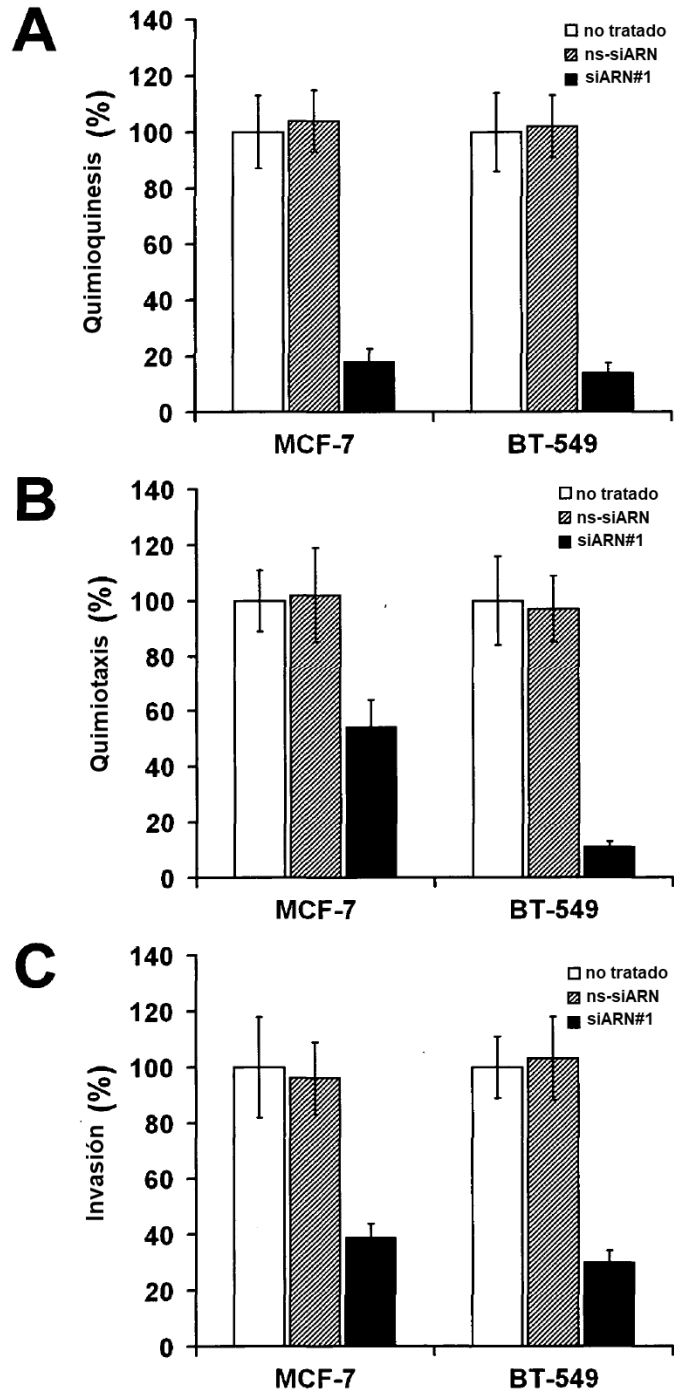


Fig. 4

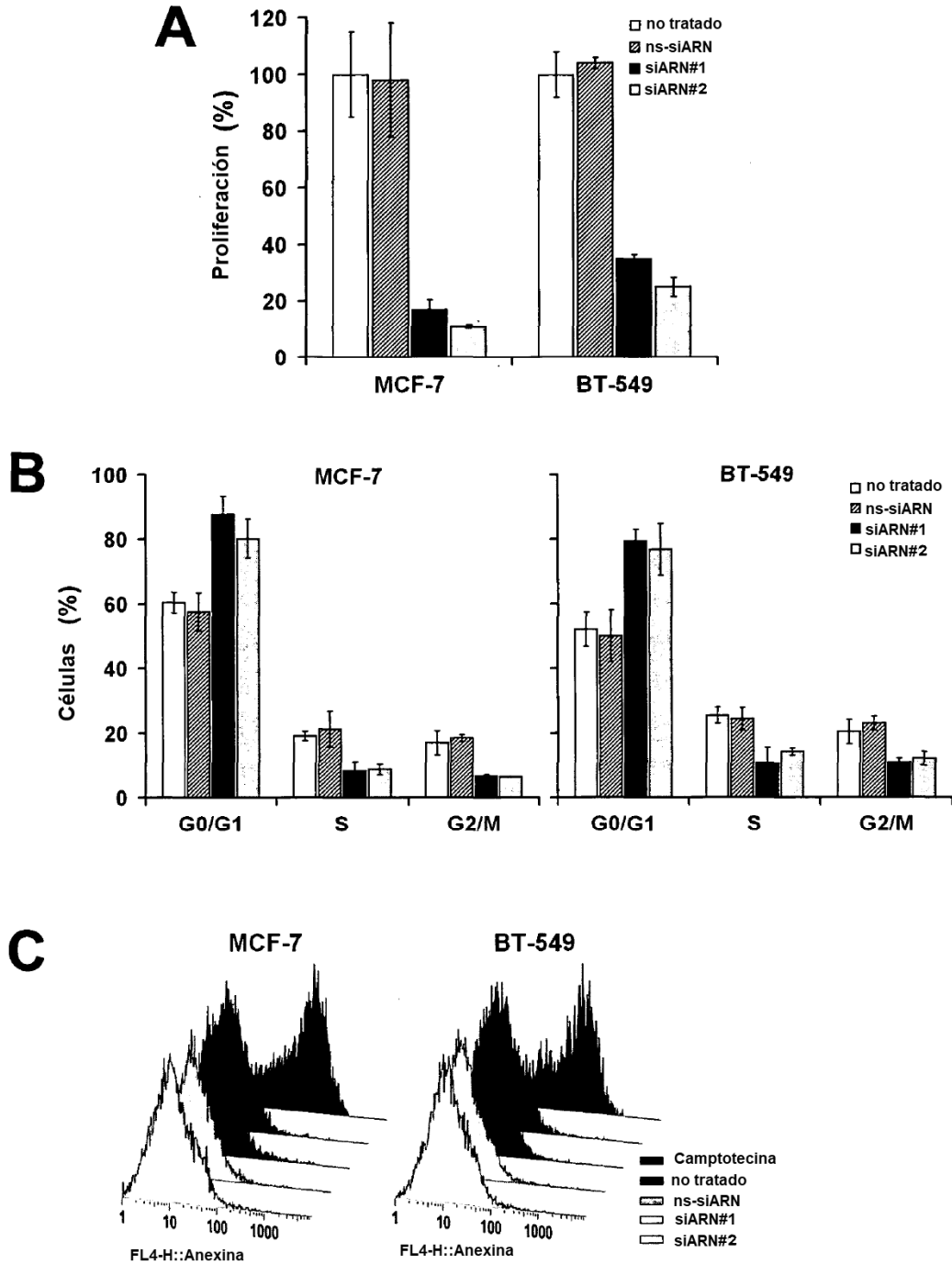


Fig. 5

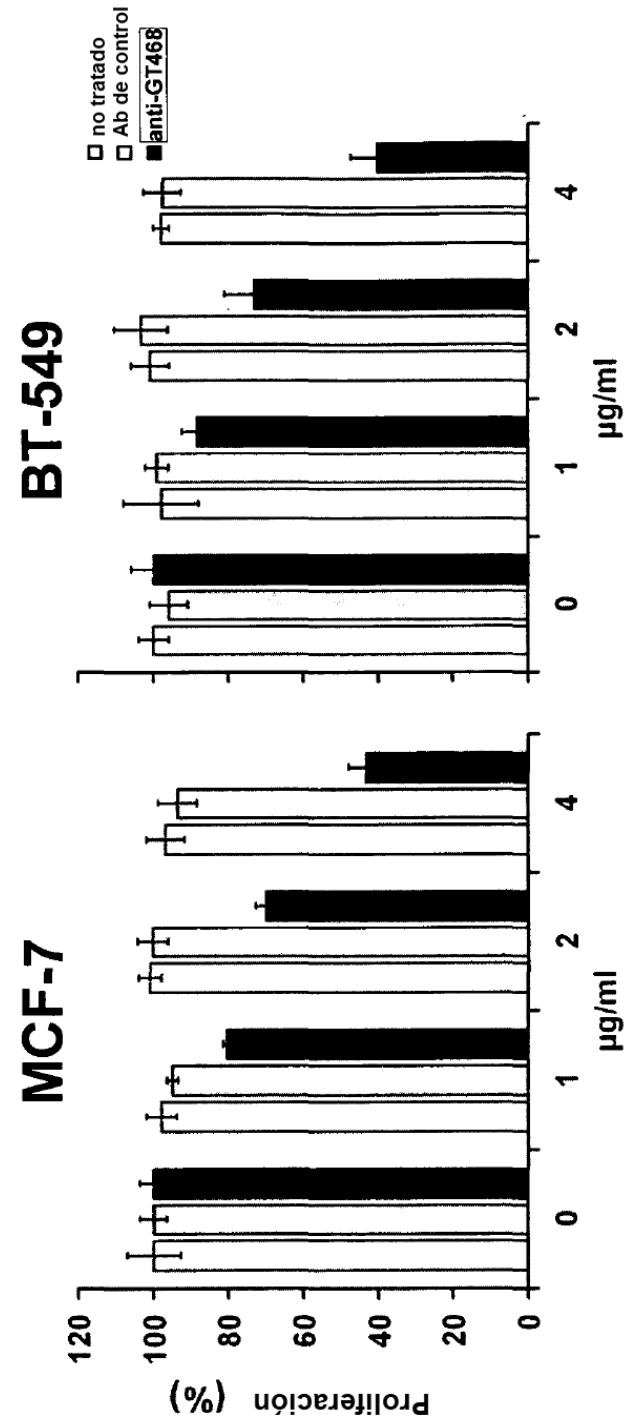


Fig. 6

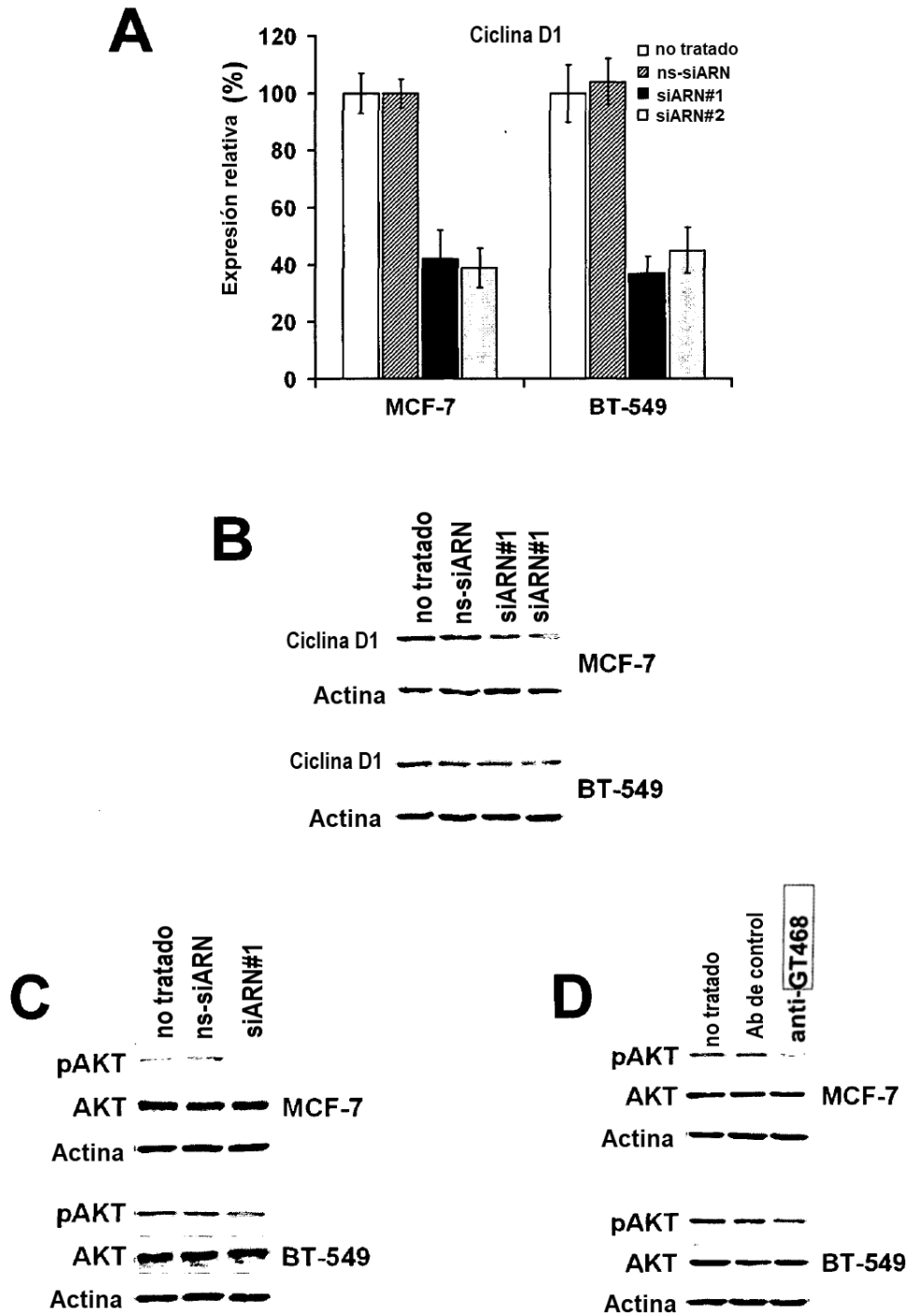


Fig. 7

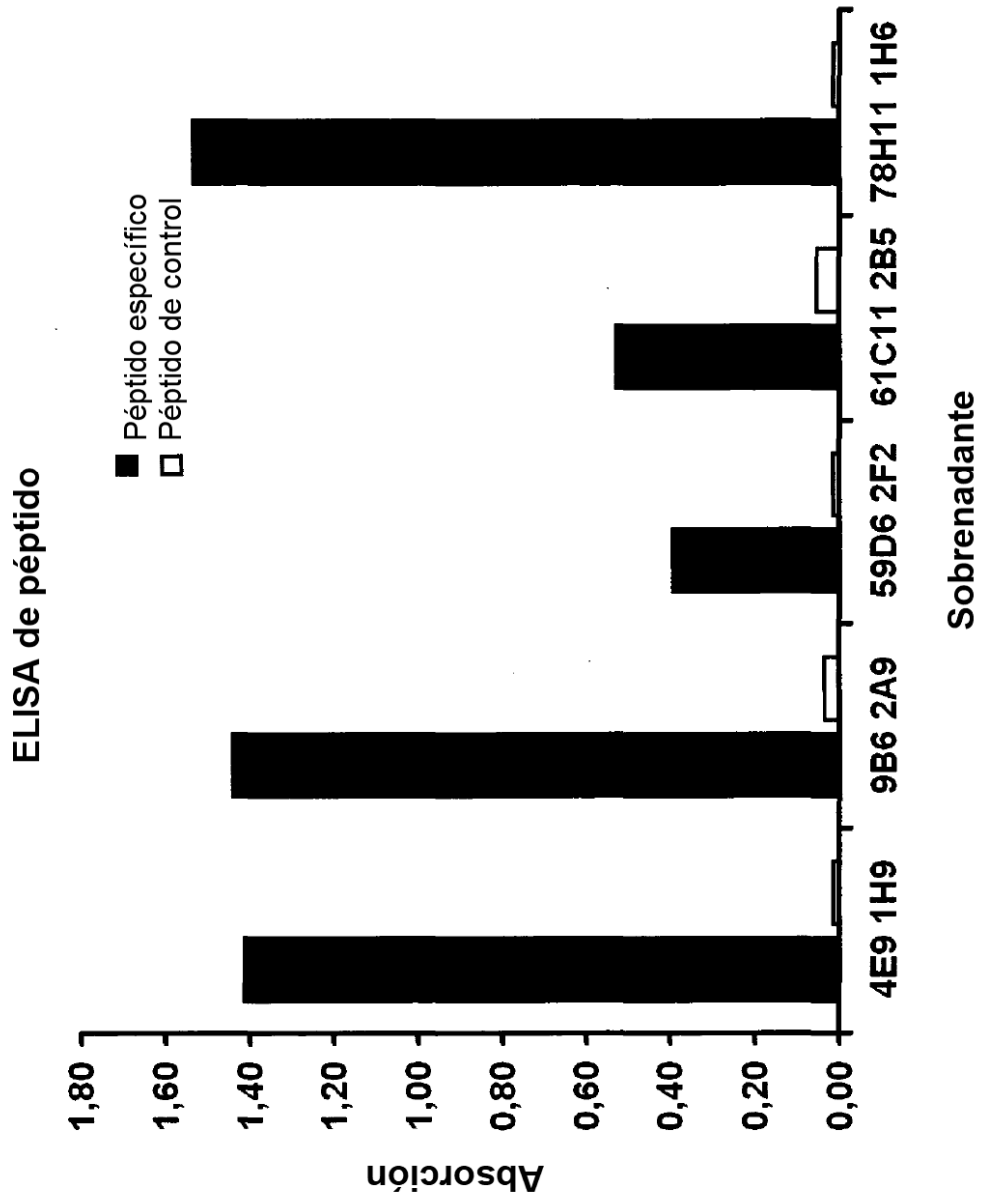


Fig. 8

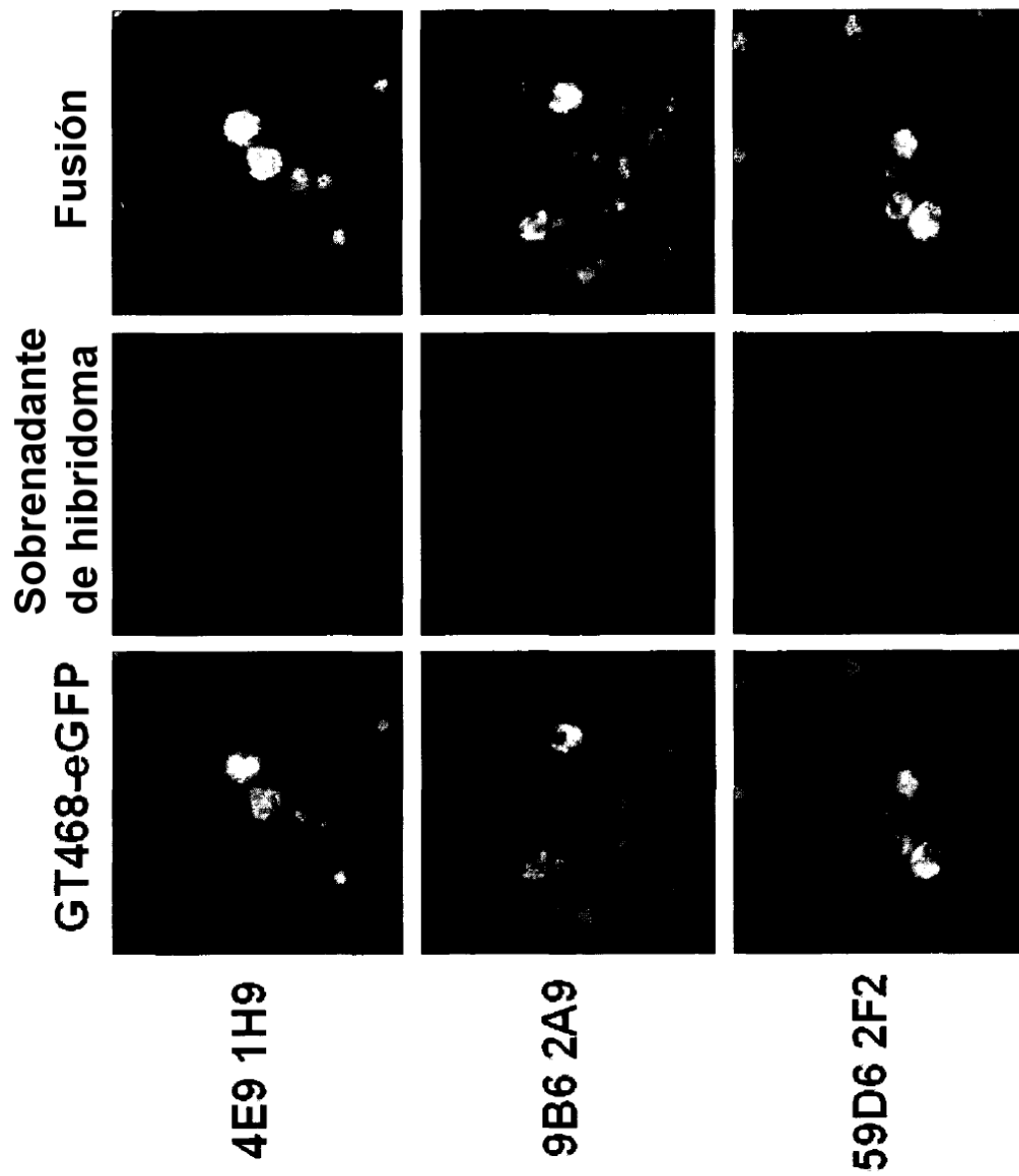


Fig. 9

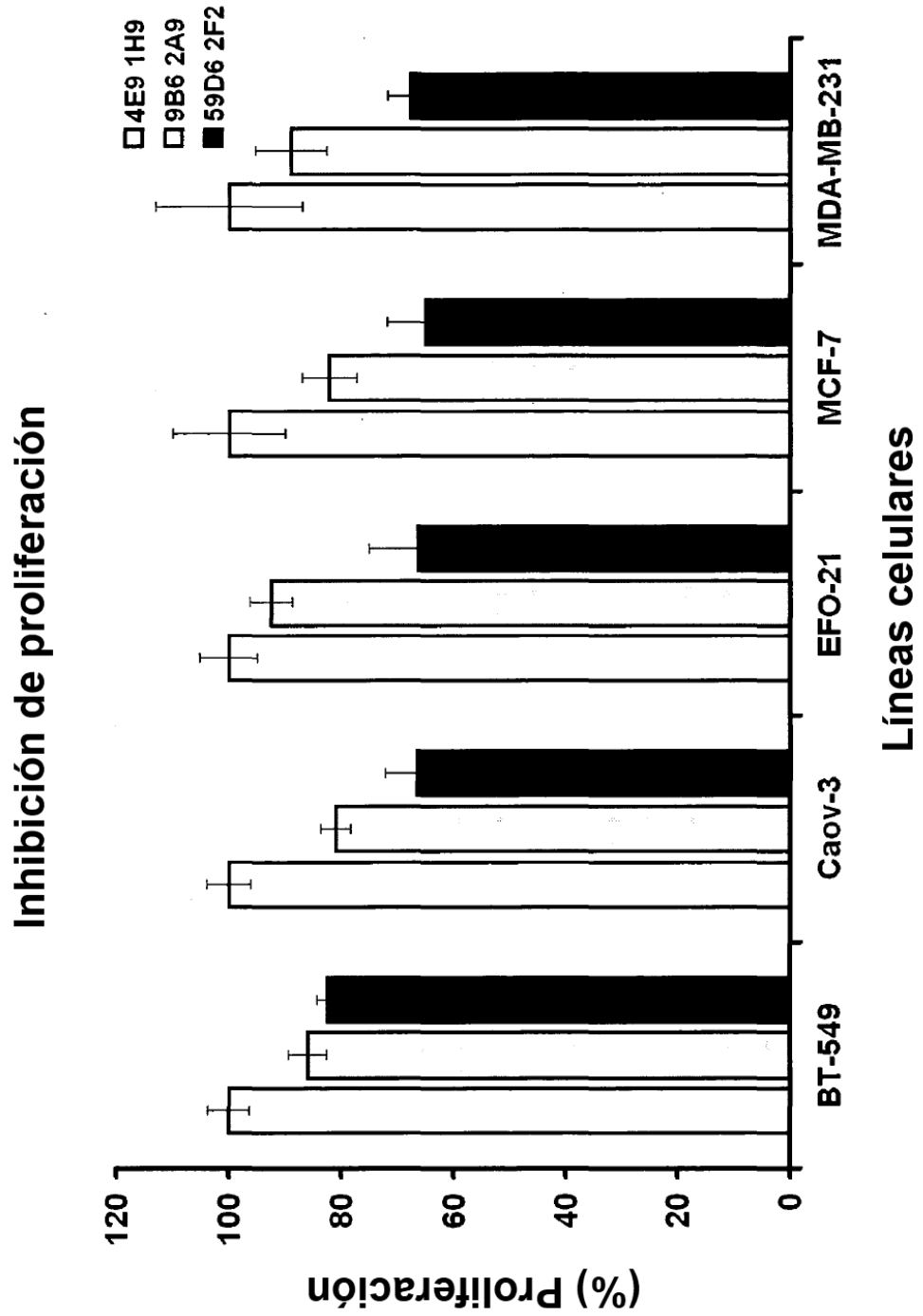


Fig. 10

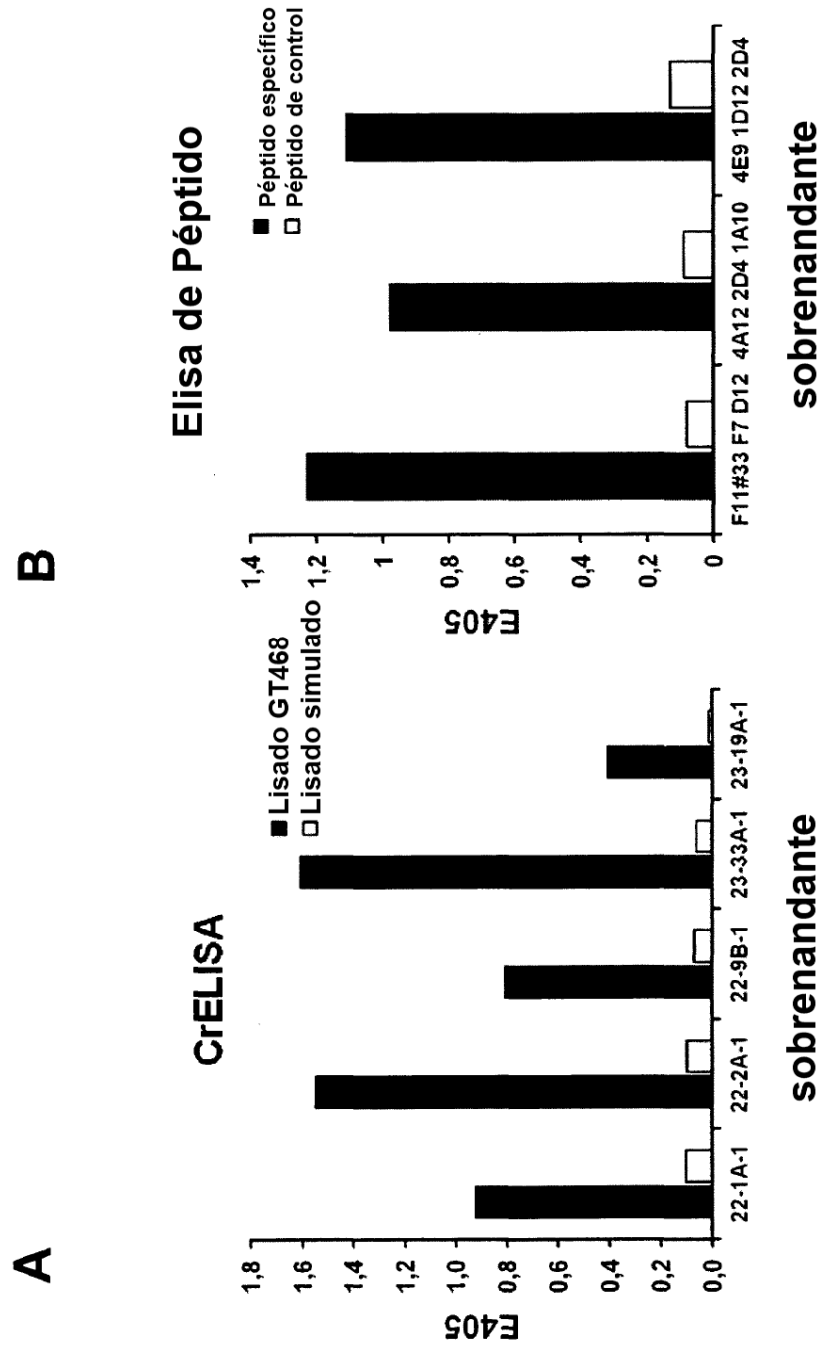


Fig. 11

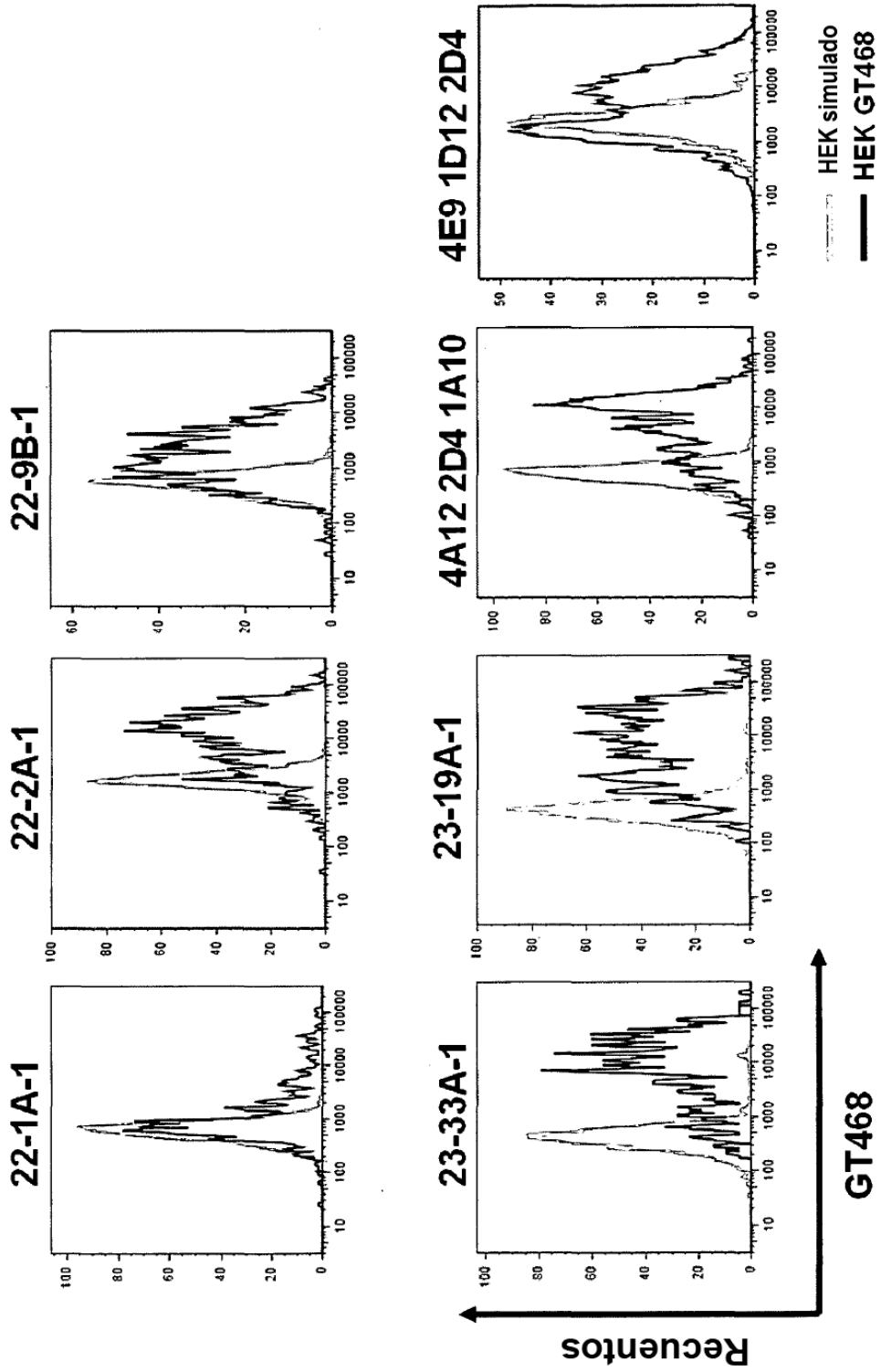


Fig. 12

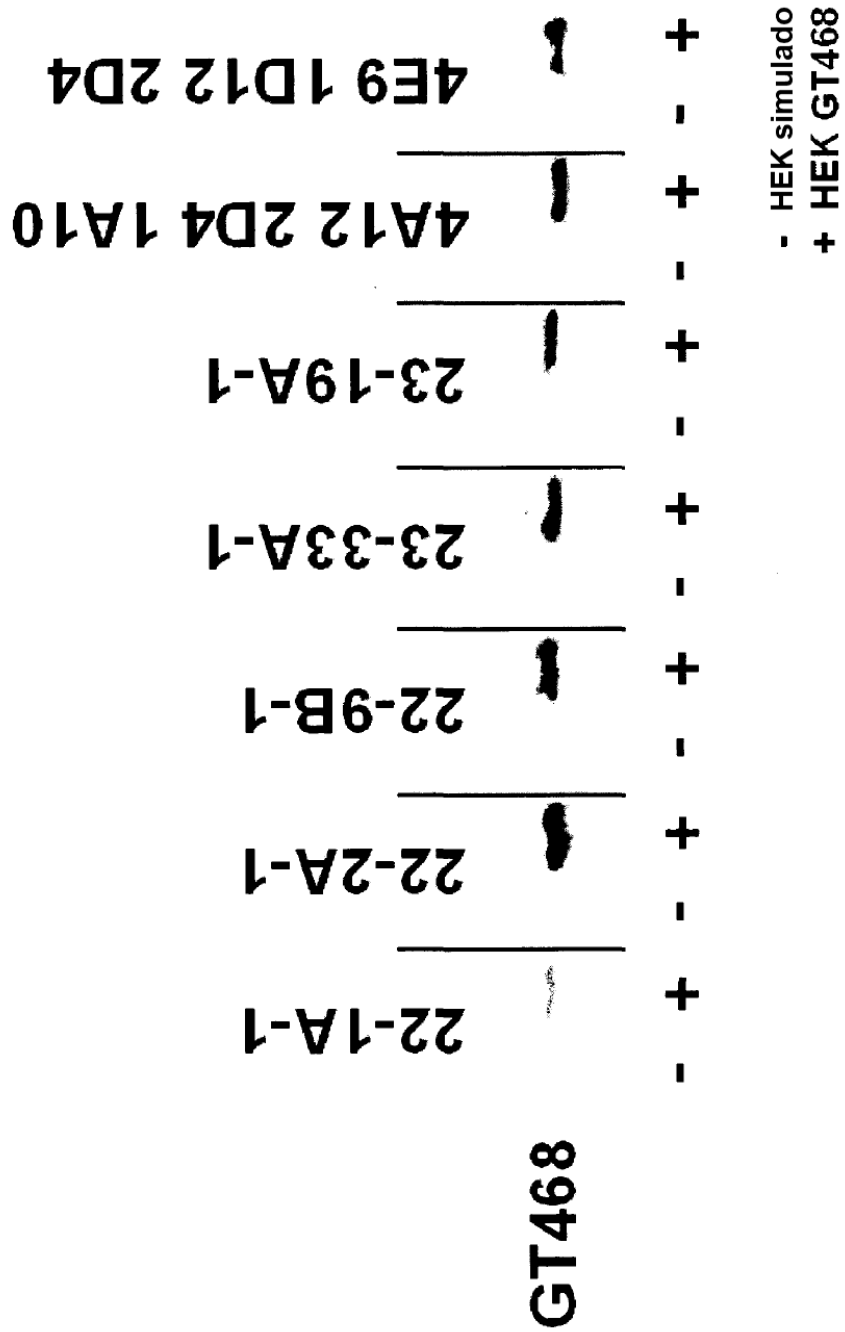


Fig. 13

Péptido	Secuencia	Péptido	Secuencia
1	MKVFKFIGLMILLTS	26	SSKGTPSKFVIPVSC
2	KFIGLMILLTSAFSA	27	TPSKFVIPVSCAAPQ
3	LMILLTSAFSAGSGQ	28	FVIPVSCAAPQKSPW
4	LTSAFSAGSGQSPMT	29	VSCAAPQKSPWLTKP
5	FSAGSGQSPMTV LCS	30	APQKSPWLTKPCSMR
6	SGQSPMTV LCSIDWF	31	SPWLTKPCSMRVASK
7	PMTV LCSIDWFMVTV	32	TKPCSMRVASKSRAT
8	LCSIDWFMVTVHPFM	33	SMRVASKSRATAQKD
9	DWFMVTVHPFMLNND	34	ASKSRATAQKDEKCY
10	VTVHPFMLNNDVCVH	35	RATAQKDEKCYEVFS
11	PFMLNNDVCVHFHEL	36	QKDEKCYEVFSLSQS
12	NNDVCVHFHELHLGL	37	KCYEVFSLSQSSQRP
13	CVHFHELHLGLGCPP	38	VFSLSQSSQRPNCDC
14	HELHLGLGCPPNHVQ	39	SQSSQRPNCDCPPCV
15	LGLGCPPNHVQPHAY	40	QRPNCDCPPCVFSEE
16	CPPNHVQPHAYQFTY	41	CDCPPCVFSEEEHTQ
17	HVQPHAYQFTYRVTE	42	PCVFSEEEHTQVPCH
18	HAYQFTYRVTECGIR	43	SEEEHTQVPCHQAGA
19	FTYRVTECGIRAKAV	44	HTQVPCHQAGAQEAQ
20	VTECGIRAKAVSQDM	45	PCHQAGAQEAQPLQP
21	GIRAKAVSQDMVIYS	46	AGAQEAQPLQPSHFL
22	KAVSQDMVIYSTEIH	47	EAQPLQPSHFLDISE
23	QDMVIYSTEIHYSSK	48	LQPSHFLDISEDWSL
24	IYSTEIHYSSKGTPS	49	HFLDISEDWSLHTDD
25	EIHYSSKGTPSKFVI	50	ISEDWSLHTDDMIGS
		51	SEDWSLHTDDMIGSM

Hibridoma	Reactividad (péptido)
22-1A-1	50+51
22-2A-1	18, 26-31, 42
22-9B-1	27, 29-31
23-33A-1	47+48
23-19A-1	48+49

Hibridoma	Reactividad (Secuencia)
F11#33 F7 D12	VFSLSQSSQRPNC
4A12 2D4 1A10	APQKSPWLTKPC
4A9 1D12 2D4	APQKSPWLTKPC

Fig. 14

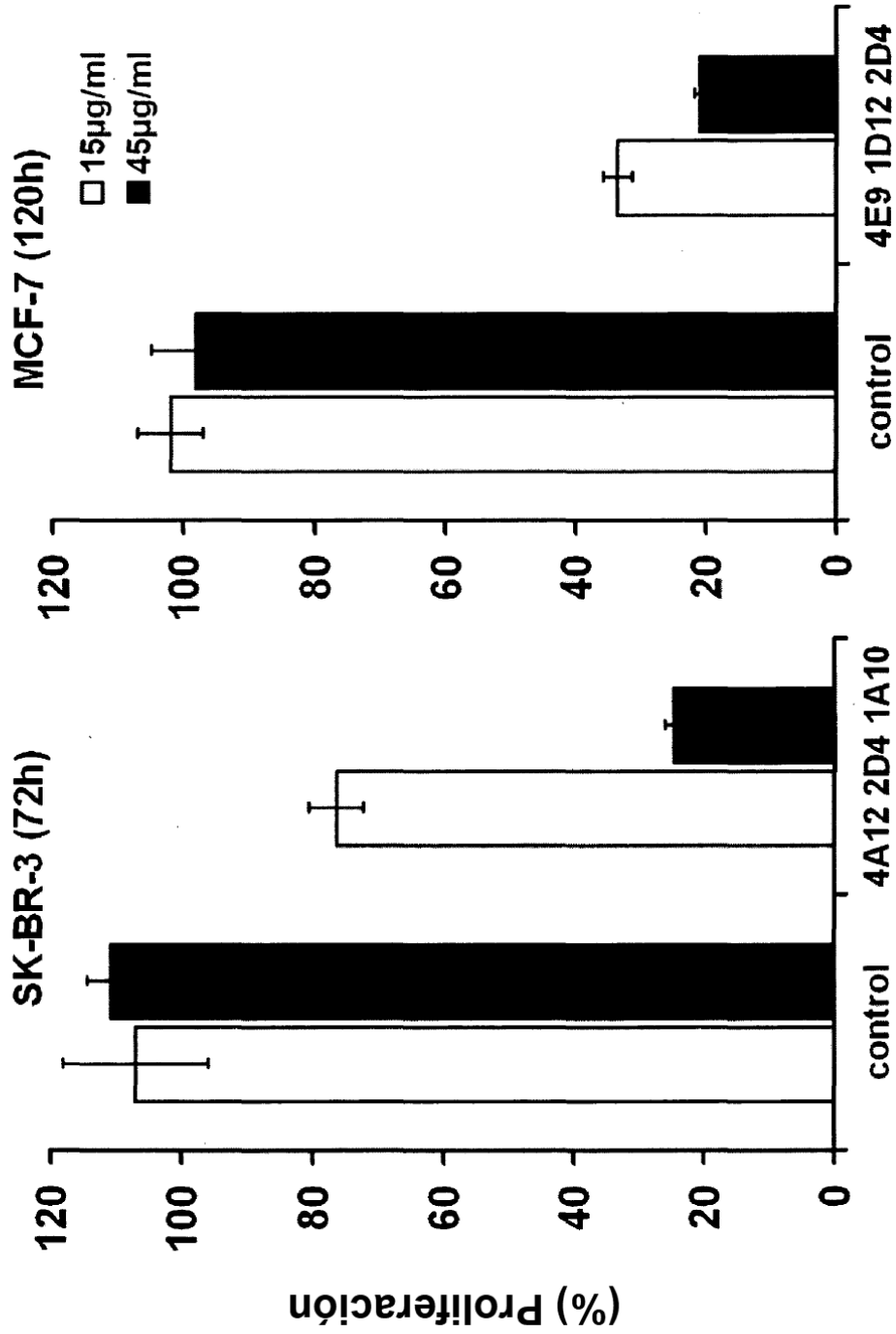


Fig. 15

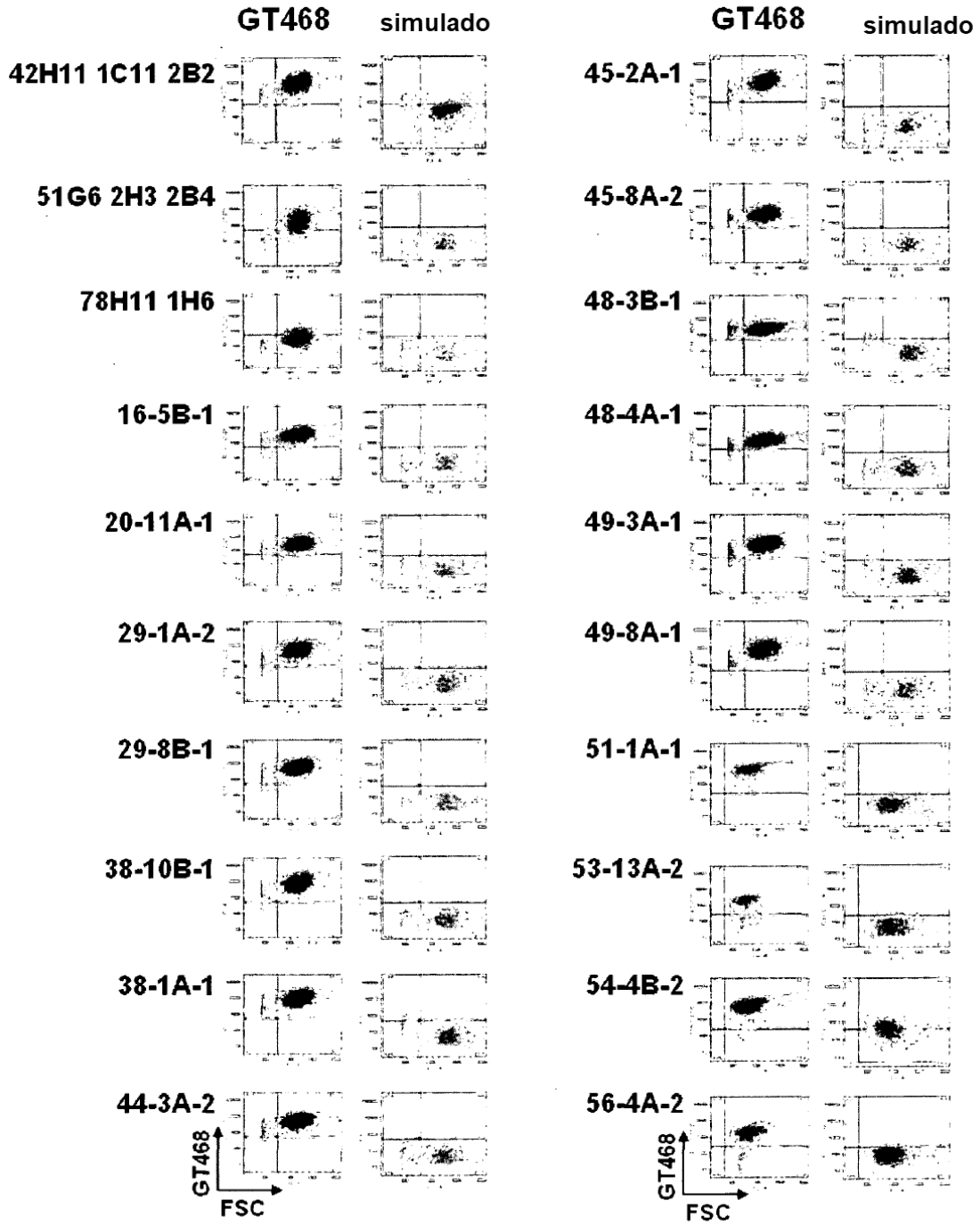


Fig. 16A

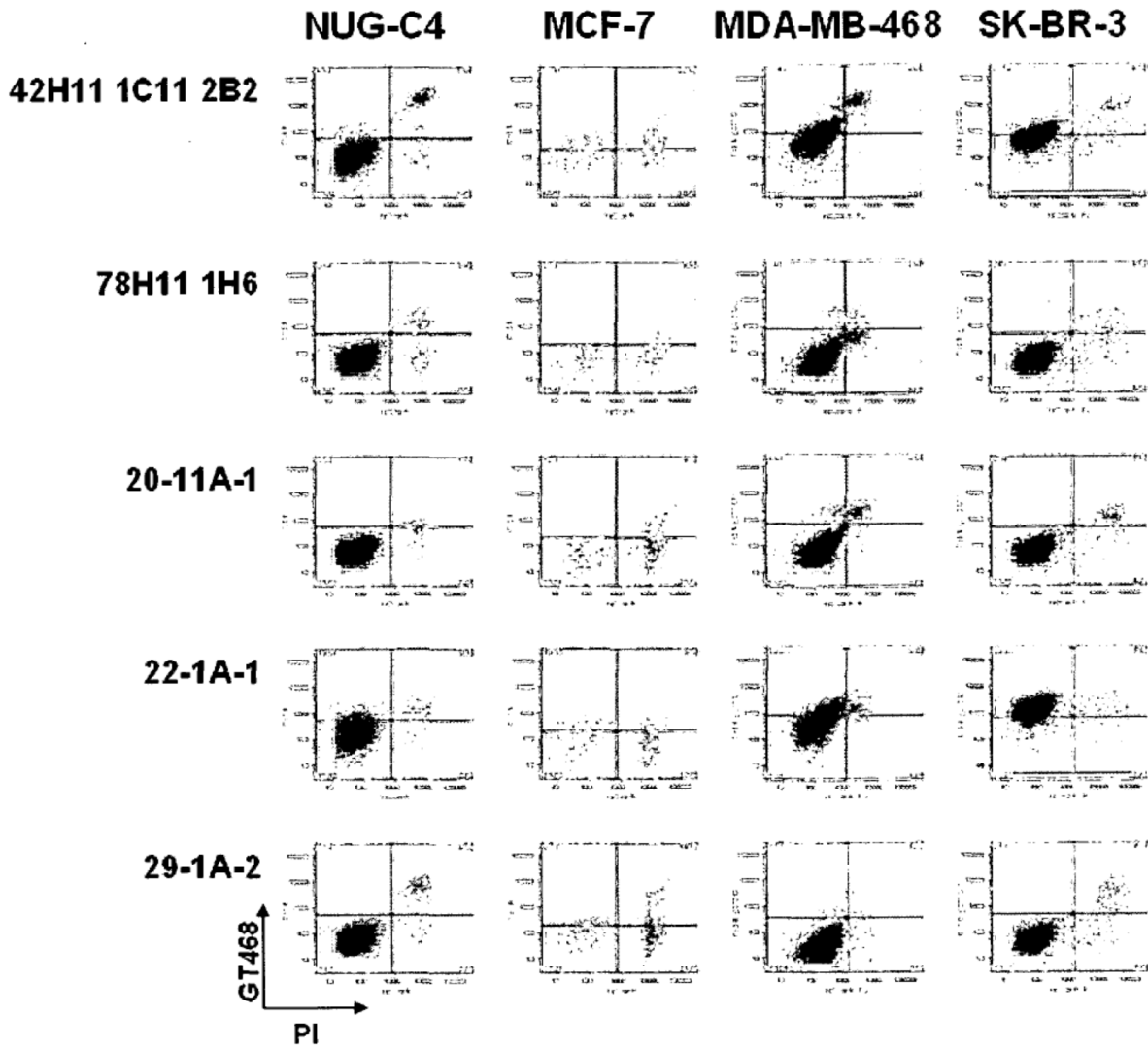


Fig. 16B

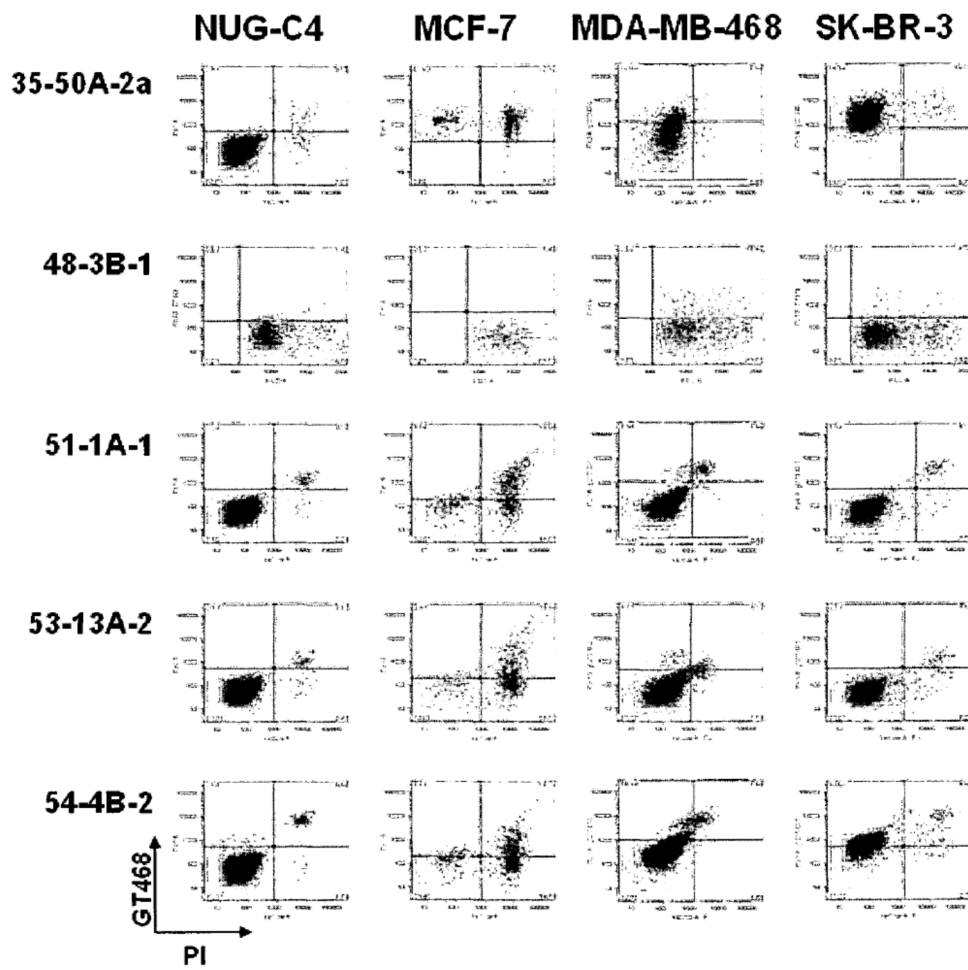


Fig. 17

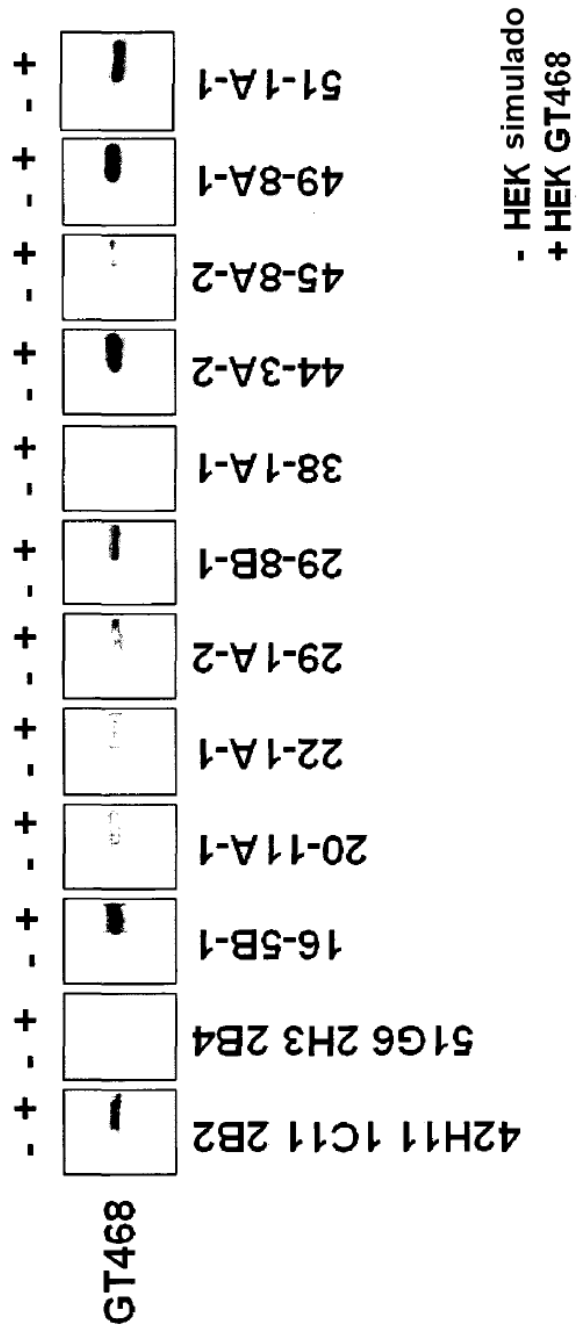


Fig. 18

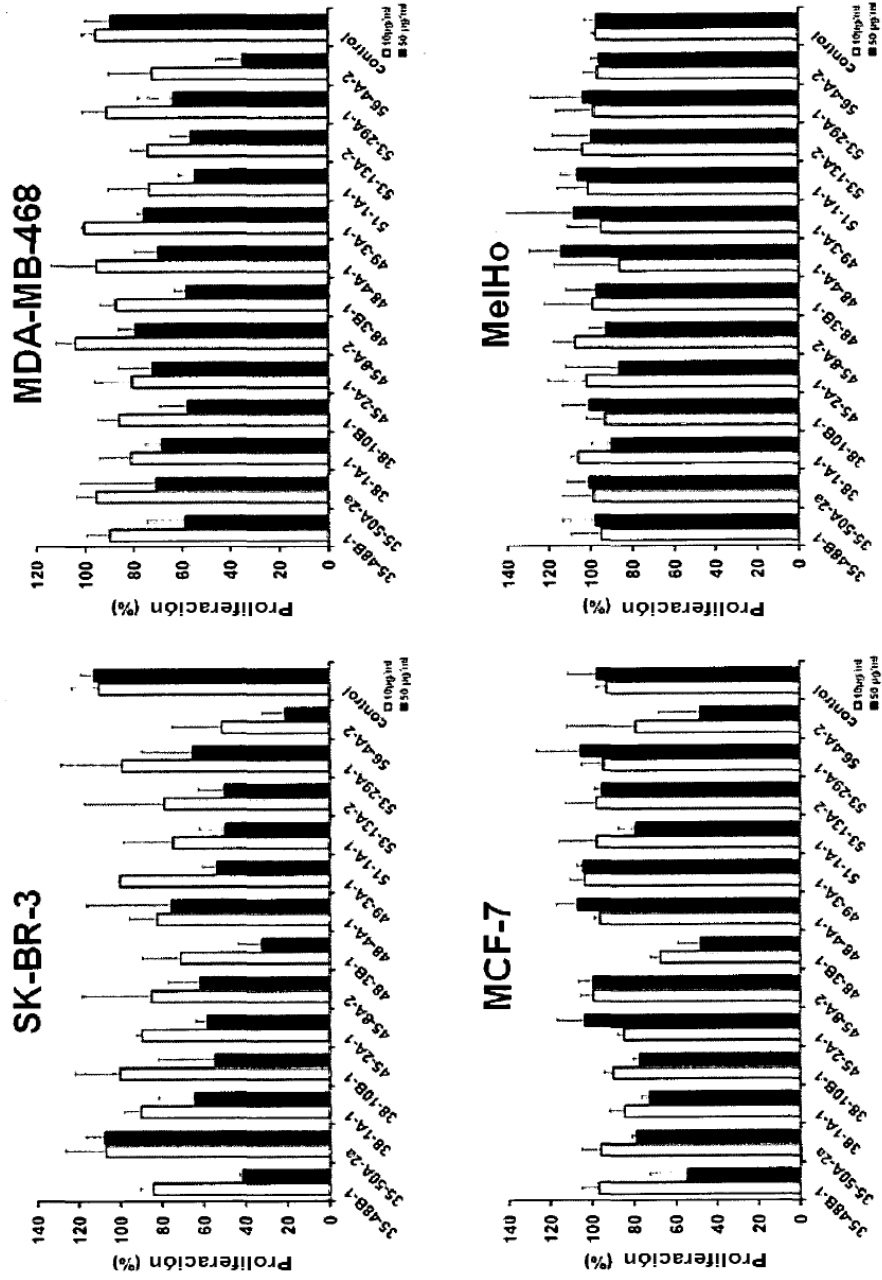


Fig. 19

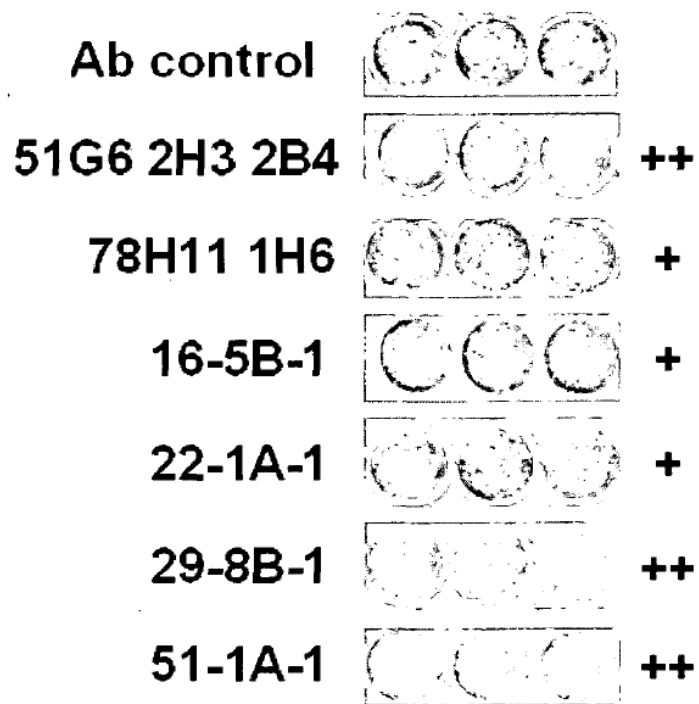


Fig. 20A

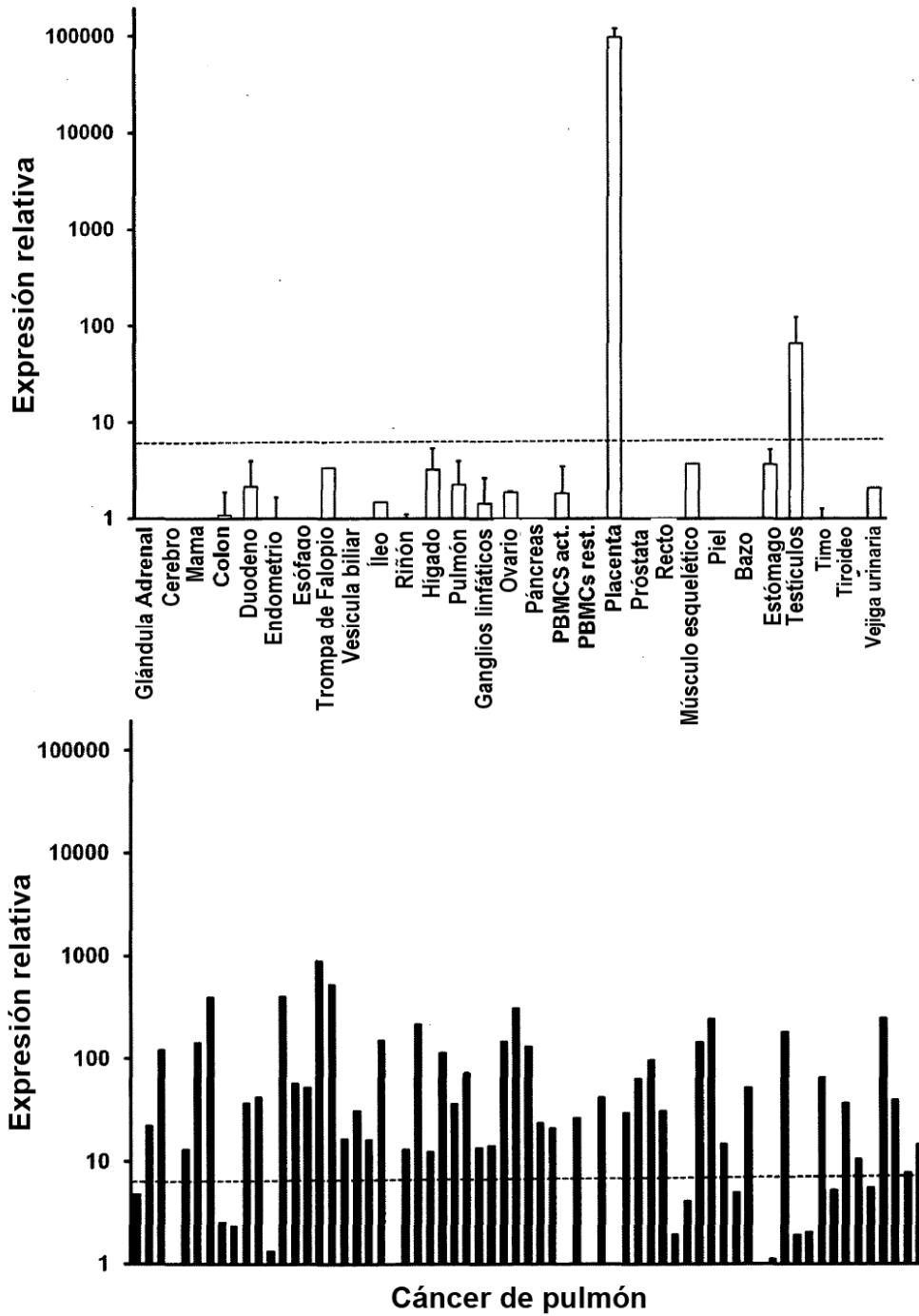


Fig. 20B

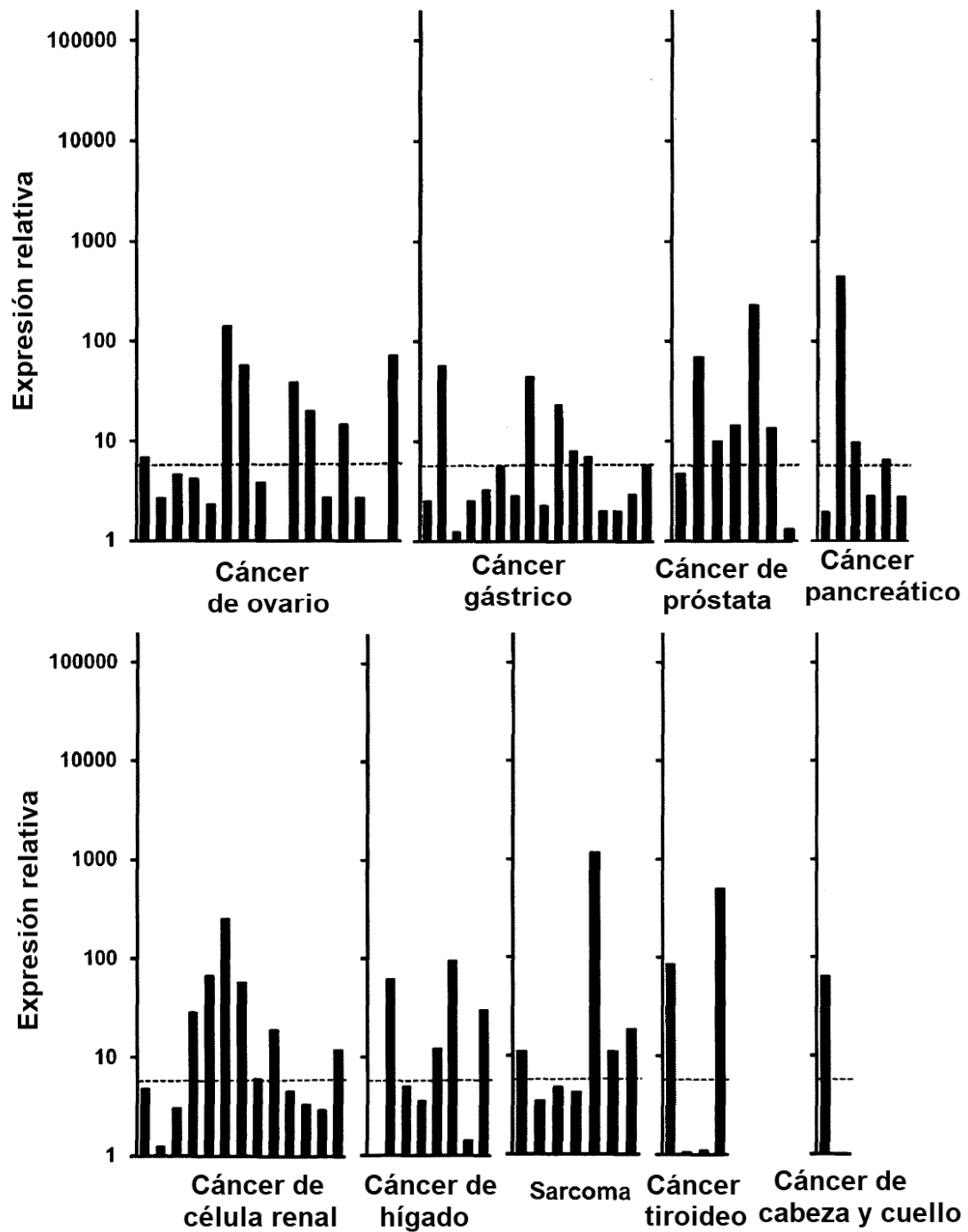


Fig. 21

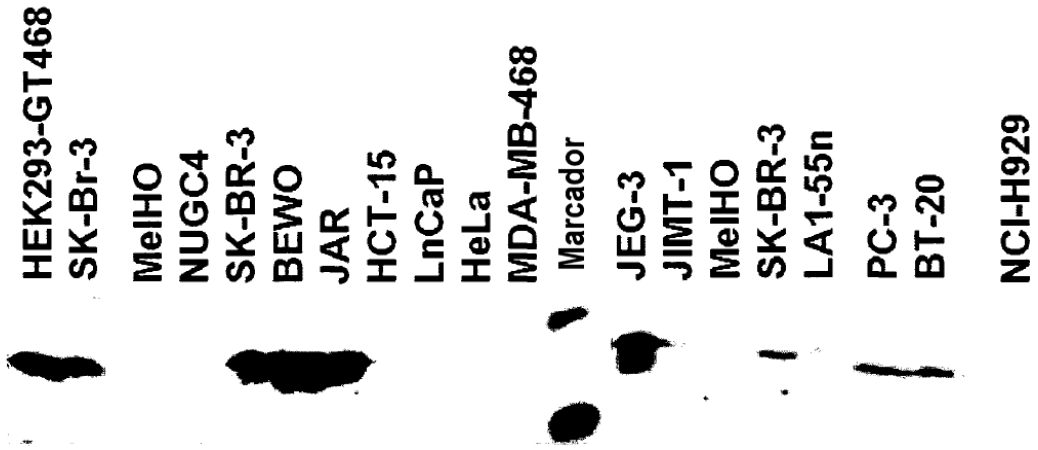


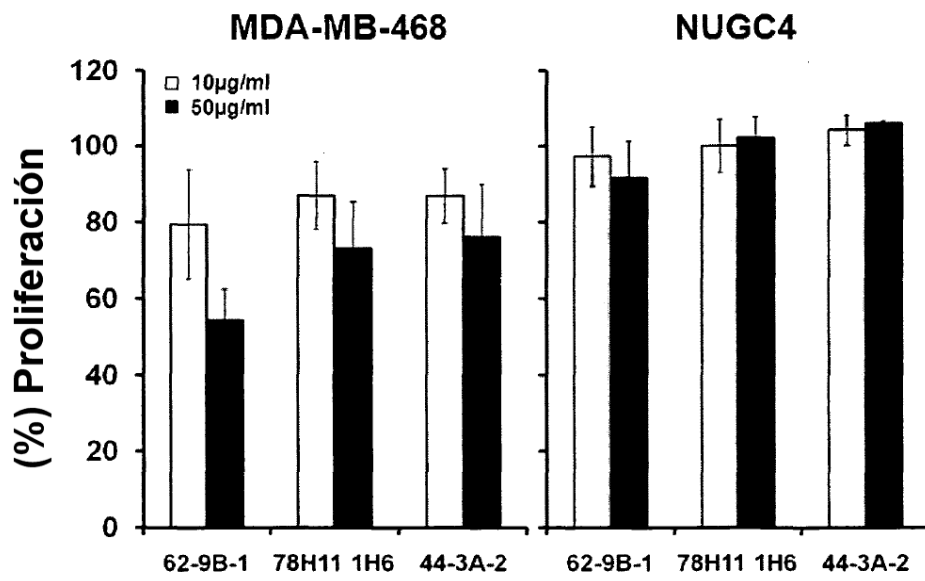
Fig. 22

Fig. 23

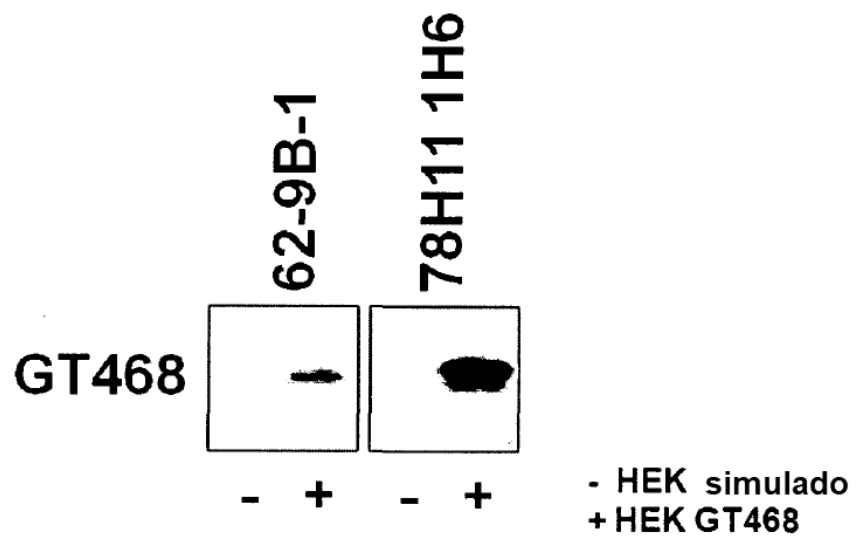


Fig. 24

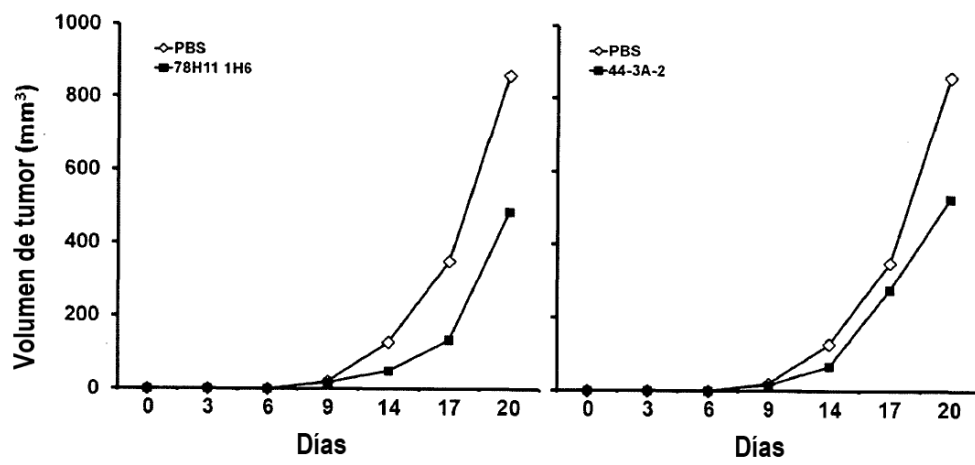


Fig. 25

Péptido	Secuencia	Péptido	Secuencia
1	MKVFKFIGLMILLTS	26	SSKGTPSKFVIPVSC
2	KFIGLMILLTSAFSA	27	TPSKFVIPVSCAAPQ
3	LMILLTSAFSAGSGQ	28	FVIPVSCAAPQKSPW
4	LTSAFSAGSGQSPMT	29	VSCAAPQKSPWLTKP
5	FSAGSGQSPMTV LCS	30	APQKSPWLTKPCSMR
6	SGQSPMTV LCSIDWF	31	SPWLTKPCSMRVASK
7	PMTV LCSIDWFMVTV	32	TKPCSMRVASKSRAT
8	LCSIDWFMVTVHPFM	33	SMRVASKSRATAQKD
9	DWFMVTVHPFMLNND	34	ASKSRATAQKDEKCY
10	VTVHPFMLNNDVCVH	35	RATAQKDEKCYEVFS
11	PFMLNNDVCVHFHEL	36	QKDEKCYEVFSLSQS
12	NNDVCVHFHELHLGL	37	KCYEVFSLSQSSQRP
13	CVHFHELHLGLGCPP	38	VFSLSQSSQRPNCDC
14	HELHLGLGCPPNHVQ	39	SQSSQRPNCDCPPCV
15	LGLGCPPNHVQPHAY	40	QRPNCDCPPCVFSEE
16	CPPNHVQPHAYQFTY	41	CDCPPCVFSEEEHTQ
17	HVQPHAYQFTYRVTE	42	PCVFSEEEHTQVPCH
18	HAYQFTYRVTECGIR	43	SEEEHTQVPCHQAGA
19	FTYRVTECGIRAKAV	44	HTQVPCHQAGAQAQ
20	VTECGIRAKAVSQDM	45	PCHQAGAQAQPLQP
21	GIRAKAVSQDMVIYS	46	AGAQAQPLQPSHFL
22	KAVSQDMVIYSTEIH	47	EAQPLQPSHFLDI SE
23	QDMVIYSTEIHYSSK	48	LQPSHFLDI SEDWSL
24	IYSTEIHYSSKGTSP	49	HFLDI SEDWSLHTDD
25	EIHYSSKGTSPKFVI	50	I SEDWSLHTDDMIGS
		51	SEDWSLHTDDMIGSM

Hibridoma	Reactividad (péptido)
29-1A-2	27, 29, 30
29-8B-1	49-51
35-48B-1	13
44-3A-2	31, 32
49-3A-1	29-31
49-8A-1	37, 38
51-1A-1	36-37
53-13A-2	33, 34
54-4B-2	34, 37
62-9B-1	36, 37

Hibridoma	Reactividad (Secuencia)
78H11 1H6	WSLHTDDMIGSM

Fig. 26

