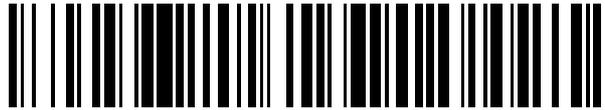


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 571**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/30** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2008 PCT/EP2008/002063**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2008 WO08110379**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2008 E 08734614 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.01.2018 EP 2125897**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales contra GT468 para el tratamiento de cáncer**

30 Prioridad:

**14.03.2007 EP 07005258**  
**14.03.2007 US 894860 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.04.2018**

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;**  
**KOSLOWSKI, MICHAEL y**  
**TÜRECI, ÖZLEM**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 664 571 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 monoclonales contra GT468 para el tratamiento de cáncer

5 Las terapias contra el cáncer basadas en anticuerpos se han introducido con éxito en la clínica y se han convertido en las terapias más prometedoras 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 fármacos 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, tales como la activación del complemento y el reclutamiento de células inmunes citotóxicas.

15 Los objetivos para las terapias basadas en anticuerpos necesitan tener cualidades particulares, que forman la base para una 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 para 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 (Herceptin).

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-1, un epítipo de repetición de péptido en la cadena principal del objetivo está subglicosilado en células tumorales y, por lo tanto, alterado con respecto 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 que forman imágenes marcadas 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 Se han aprobado ocho anticuerpos para el tratamiento de enfermedades neoplásicas, la mayoría de ellos, sin embargo, en linfoma y leucemia (Adams, G. P. & Weiner, L. M. (2005) Nat. Biotechnol., 23, 1147-1157). Solo tres mAbs, a saber, Herceptin, Avastin y Erbitux, abordan los tipos de cáncer sólido, que representan más del 90% de la mortalidad provocada por el cáncer. La necesidad médica sustancial restante, los mAb de beneficio clínico significativo aprobados ya han sido proporcionados 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, OH y Sandlie, I. (2003) Nat. Rev. Drug Discov. 2, 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 agentes terapéuticos mejorados contra el cáncer basados en anticuerpos es la selección de moléculas objetivo apropiadas, que es la clave para un perfil de toxicidad /eficacia favorable.

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 incrustados en las moléculas de anticuerpo. Her2/neu, por ejemplo, el objetivo de Herceptin, se expresa en muchos tejidos humanos normales, incluido el músculo cardíaco (Crone, SA, Zhao, YY, Fan, L., Gu, Y., Minamisawa, S., Liu, Y., Peterson, KL, Chen, J., Kahn, R., Condorelli, G. et al. (2002) Nat. Med. 8, 459 - 465). En consecuencia, Herceptin 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 "embotamiento de un cuchillo potencialmente afilado" limita la eficacia terapéutica de Herceptin.

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

65

Usando un enfoque integrado de minería de datos y validación experimental para el descubrimiento de nuevos objetivos para la terapia de anticuerpos contra el cáncer, se identificó GT468, una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 2. GT468 es un gen específico de la placenta designado PLAC1, sin expresión detectable en ningún otro tejido humano normal. Sin embargo, con frecuencia se activa en forma aberrante y se expresa altamente 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 suspensión casi completa de la proliferación. La desactivación de GT468 se asocia con disminución de la expresión de la 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.

GT468 tiene varias 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 Herceptin, 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, DJ, Godolphin, W., Jones, LA, Holt, JA, Wong, SG, Keith, DE, Levin, WJ, Stuart, SG, 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 con mAb aprobado debido a la falta de objetivos apropiados en estos tipos de cáncer.

GT468 es susceptible de ser modificado por fármacos de anticuerpos en células vivas y tales anticuerpos pueden precipitar efectos antitumorales tales como 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 anticuerpos mAb contra GT468, que intervienen con todas estas funciones a la vez, además de su potencial para mediar funciones efectoras inmunes tales como ADCC y CDC.

El documento US2002/065394 menciona una molécula de ácido nucleico que codifica PLAC1 y sugiere la generación de anticuerpos neutralizantes contra esta proteína. Chen et al. 2006 describe la expresión de PLAC1 en tejido de cáncer gástrico. El documento EP1762575 describe en general el uso de PLAC1 como objetivo para diagnosticar y tratar tumores. Koslowski et al. 2007 describe PLAC1 como candidato atractivo para enfoques inmunoterapéuticos dirigidos. Dong et al. 2008 describe PLAC1 como un antígeno específico de tumor capaz de provocar respuestas espontáneas de anticuerpos en pacientes con cáncer humano. Ninguno de estos documentos, sin embargo, enseña o menciona un anticuerpo, que se une a PLAC1 y media en la inhibición de células en proliferación.

#### Sumario de la invención

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 que se caracterizan por asociación de GT468 con su superficie celular, incluyendo enfermedades relacionadas con tumores tales como cáncer, en particular 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, cáncer de próstata y cáncer de hígado.

En un aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a GT468. Este anticuerpo se define y limita adicionalmente por las reivindicaciones de la presente invención. Preferiblemente, el anticuerpo tiene la capacidad de unirse a GT468 localizado en la superficie celular y preferiblemente se une a uno o más epítomos 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 epítomo localizado dentro de una de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOS: 3-10 y 35-79. En una realización preferida, el anticuerpo es específico para una o más de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID Nos: 3-10 y 35-79. 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. Preferiblemente, el anticuerpo se une a células cancerosas, en particular células de los tipos de cáncer mencionados anteriormente y, preferiblemente, no se une sustancialmente a células no cancerosas. 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 y proliferación. Preferiblemente, el anticuerpo media la muerte de dichas células y/o inhibe la proliferación de dichas células.

La muerte de células y/o la inhibición de una o más actividades de las células, en particular la proliferación celular, por el anticuerpo de la invención se inducen preferiblemente mediante la unión del anticuerpo a GT468 expresada

por dichas células y/o que está asociada con la superficie celular de dichas células. Tal muerte de células y/o inhibición de una o más actividades de las 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 se pueden utilizar para tratar o prevenir el cáncer. La inhibición de la motilidad, migración, invasión y/o proliferación de células puede utilizarse para tratar o prevenir el cáncer, en particular metástasis de cáncer y la diseminación metastásica de células cancerosas.

Las células que expresan GT468 y/o se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular son preferiblemente células cancerosas y, en particular, se seleccionan del grupo que consiste en células cancerosas tumorigénicas de mama, pulmón, estómago, ovario, hígado, colon, pancreáticas, de esófago, cabeza-cuello, renales y de próstata.

Preferentemente, el anticuerpo descrito en la presente memoria media la destrucción de células induciendo lisis mediada por citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), lisis mediada por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), apoptosis, adhesión homotípica y/o fagocitosis, preferentemente induciendo lisis mediada por CDC y/o lisis mediada por ADCC.

En una realización, el anticuerpo descrito aquí 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.

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 un anticuerpo IgG1, un IgG2, preferiblemente IgG2a e IgG2b, un IgG3, un IgG4, un IgM, un IgA1, un IgA2, un IgA secretor, un IgD y un IgE.

De acuerdo con todos los aspectos de la invención, GT468 es preferiblemente GT468 humana, 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 la SEQ ID NO: 2.

En realizaciones preferidas particulares, el anticuerpo de la invención se une a epítomos nativos de GT468 presentes en la superficie de células vivas tales como las de las SEQ ID NOs: 3-10 y 35-79. En realizaciones preferidas adicionales, el anticuerpo de la invención es específico para células cancerosas, preferiblemente células de cáncer de mama.

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

Los anticuerpos de la invención 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 NOs: 2-10 y 35-79, o un fragmento inmunogénico o derivado del mismo, o un ácido nucleico o célula huésped que expresa dicha proteína o péptido, o fragmento inmunogénico o derivado del mismo. Preferiblemente, un anticuerpo de la invención es específico para las proteínas, péptidos o fragmentos inmunogénicos o derivados anteriormente mencionados de los mismos. En el contexto de una proteína o péptido usado 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, el derivado de una proteína o péptido cuando se usa 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 usa 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 terminal N o el terminal 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 ACC2826 (9B6-2A9), DSM ACC2824 (59D6-2F2), DSM ACC2825 (61C11-2B5) o DSM ACC2823 (78H11-1H6). También se describe un anticuerpo producido por un clon que tiene el número de acceso DSM ACC2822 (4E9-1H9), 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), o DSM ACC2898 (4E9 1D12 2D4).

En una realización, el anticuerpo de la presente enseñanza se acopla a un agente terapéutico tal como una toxina, un radioisótopo, un fármaco o un agente citotóxico.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un hibridoma capaz de producir el anticuerpo de la invención. Los hibridomas preferidos son aquellos que tienen el número de acceso DSM ACC2826 (9B6-2A9), DSM ACC2824 (59D6-2F2), DSM ACC2825 (61C11-2B5), DSM ACC2823 (78H11-1H6). También se describen aquí hibridomas

seleccionados del grupo que consiste en DSM ACC2822 (4E9-1H9), 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) y DSM ACC2898 (4E9 1D12 2D4).

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

La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la invención y/o un conjugado del mismo con un agente terapéutico y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para inhibir una o más actividades seleccionadas de motilidad, migración, invasión y crecimiento, preferiblemente crecimiento y/o muerte 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 de la invención y/o un conjugado del mismo con un agente terapéutico. GT468 se expresa preferiblemente en la superficie de dicha célula.

15 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno que implica células que expresan GT468 y/o se caracteriza por la asociación de GT468 con su superficie celular que comprende administrar a un sujeto un anticuerpo de la invención, conjugado de los mismos con un agente terapéutico, o una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la invención o el conjugado del mismo con un agente terapéutico. 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, cáncer de próstata y cáncer de hígado. GT468 se expresa preferentemente en la superficie de dichas células.

20 Los anticuerpos descritos en este documento pueden tener la capacidad de discriminar las variantes de GT468 expresadas por diferentes tipos de células que incluyen células cancerosas y células no malignas.

30 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 fuertemente a un objetivo tal como un epítipo para el que es específico en comparación con la unión a otro objetivo. Un agente se une más fuertemente 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 1.000 veces menor que la constante de disociación ( $K_D$ ) para el objetivo al que el agente no se une específicamente.

40 Los anticuerpos de la invención preferiblemente median en la destrucción 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 pueden inducir citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), por ejemplo, al 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 pueden inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por asociación de GT468 con su superficie celular en presencia de células efectoras (por ejemplo, monocitos, células mononucleares, células NK y PMN). Los anticuerpos de la invención pueden tener la capacidad de inducir apoptosis de células que expresan GT468 y/o caracterizarse por asociación de GT468 con su superficie celular, inducir la adhesión homotípica de células que expresan GT468 y/o caracterizarse 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. Los ejemplos de células objetivo para anticuerpos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, células cancerosas que expresan GT468 y/o se caracterizan por asociación de GT468 con su superficie celular tales como células de cáncer de mama, pulmón, gástrico, ovárico y hepatocelular tumorigénicas. En una realización preferida particular, la muerte de células mediada por anticuerpos de la invención es específica de GT468, es decir, los anticuerpos de la invención median la muerte, preferiblemente la 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 median 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 pueden usarse para mediar la muerte de células tumorales en el tratamiento o prevención de cáncer tal 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, cáncer de próstata y cáncer de hígado.

Los anticuerpos se pueden derivar de diferentes especies, que incluyen, pero no se limitan a, ratón, rata, conejo, cobaya y ser humano. Los anticuerpos 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 incluyen moléculas humanizadas en las que los sitios de unión a antígeno de un anticuerpo derivado de una especie no humana, se combinan con regiones constantes y estructurales de origen humano.

Los anticuerpos incluyen anticuerpos policlonales y monoclonales e incluyen anticuerpos IgG2a (por ejemplo, IgG2a,  $\kappa$ ,  $\lambda$ ), IgG2b (por ejemplo, IgG2b,  $\kappa$ ,  $\lambda$ ), IgG3 (por ejemplo, IgG3,  $\kappa$ ,  $\lambda$ ) e IgM. Sin embargo, también se incluyen otros isotipos de anticuerpos, incluidos los anticuerpos IgG1, IgA1, IgA2, IgA secretora, IgD e IgE. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos completos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que incluyen, por ejemplo, fragmentos Fab,  $F(ab')_2$ , Fv, Fv de cadena sencilla o anticuerpos biespecíficos. Además, 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 preferiblemente se disocian de GT468 con una constante de equilibrio de disociación ( $K_D$ ) de aproximadamente 1-100 nM o menos. Preferiblemente, los anticuerpos no reaccionan de forma cruzada con antígenos relacionados de superficie celular y, por lo tanto, no inhiben su función.

En realizaciones preferidas, los anticuerpos descritos en este documento se pueden caracterizar por una o más de las siguientes propiedades:

- a) especificidad por 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 células negativas para CD55/59 o positivas para CD55/59;
- 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 bajos niveles 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 en este documento pueden formar derivados, unirse o coexpresarse a otras especificidades de unión. En una realización particular, la enseñanza abarca una molécula biespecífica o multiespecífica que comprende al menos una primera especificidad de unión por GT468 (por ejemplo, un anticuerpo anti-GT468 o mimético del mismo) y una segunda especificidad de unión por una célula efectora, tal como una especificidad de unión por 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 esto, la enseñanza incluye 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 (FcyR), tal como FcyRI (CD64), FcyRII (CD32) y FcyRIII (CD16). Otros receptores de Fc, como los receptores de IgA (por ejemplo, Fc $\alpha$ RI), 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, la presente enseñanza abarca anticuerpos anti-GT468 que forman derivados, se unen o expresan conjuntamente con otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, un fragmento Fab'). Por ejemplo, un anticuerpo puede estar funcionalmente unido (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro tipo) a una o más entidades moleculares, tales como otro anticuerpo (por ejemplo, para producir un anticuerpo biespecífico o multiespecífico), una citotoxina, ligando celular o antígeno (por ejemplo, para producir un inmunocombinado, tal como una inmunotoxina). Un anticuerpo de la presente invención se puede unir a otros restos terapéuticos, por ejemplo, un radioisótopo, un fármaco anticancerígeno de molécula pequeña, una citoquina recombinante o quimioquina. Por consiguiente, la presente invención abarca 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 pueden usarse para dirigir otras moléculas a tales células.

En un aspecto adicional, la enseñanza también prevé proteínas de unión a GT468 derivadas de dominios no inmunoglobulínicos, en particular proteínas de cadena sencilla. 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 la enseñanza dada en la presente memoria con respecto a las moléculas de unión derivadas de inmunoglobulina o moléculas de unión derivadas de inmunoglobulina correspondientemente también aplica a moléculas de unión derivadas de dominios que no son inmunoglobulinas. En particular, usando tales moléculas de unión derivadas de dominios no inmunoglobulínicos es posible bloquear GT468 de células que expresan dicho objetivo y/o se caracterizan por la asociación de dicho objetivo con su superficie celular y por lo tanto, producir efectos terapéuticos como se describe aquí para anticuerpos de la invención, 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 de unión que no son inmunoglobulinas, por ejemplo, fusión a la región Fc de anticuerpos.

En otro aspecto más, la enseñanza proporciona composiciones, por ejemplo, composiciones /kits farmacéuticos y de diagnóstico, que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable formulado junto con uno o una combinación de anticuerpos de la invención. 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 pueden usarse 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 media la destrucción 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 GT468 con su superficie celular.

La presente enseñanza también abarca la administración simultánea o secuencial de dos o más anticuerpos anti-GT468 descritos en la presente memoria, en donde preferiblemente al menos uno de dichos anticuerpos es un anticuerpo anti-GT468 quimérico y al menos otro anticuerpo es un anticuerpo anti-GT468 humano, los anticuerpos que se unen a los mismos o diferentes epítopos de GT468. Preferiblemente, se administra primero un anticuerpo GT468 quimérico seguido de la administración de un anticuerpo anti-GT468 humano, en el que el anticuerpo anti-GT468 humano se administra preferiblemente durante un período de tiempo prolongado, es decir, como terapia de mantenimiento.

Los anticuerpos, inmunocombinados, moléculas y composiciones biespecíficas y multiespecíficas descritas en la presente invención pueden usarse en una variedad de métodos para inhibir el crecimiento de células que expresan GT468 y/o caracterizarse 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 efectiva del anticuerpo, inmunocombinado, molécula o composición biespecífica /multiespecífica, de modo que el crecimiento de la célula se inhibe y/o muere la célula. En una realización, el método incluye la muerte de 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 puede inhibirse o eliminarse usando los anticuerpos descritos en este documento incluyen células cancerosas tales como células de mama, pulmón, estómago, ovario, hígado, colon, páncreas, esófago, cabeza y cuello, riñón, próstata y hepáticas.

Por consiguiente, los anticuerpos de la presente invención se pueden usar para tratar y/o prevenir una variedad 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 padecen dichas 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 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, cáncer de próstata y cáncer de hígado.

5 En una realización particular, el sujeto al que se le administra el anticuerpo se trata adicionalmente con un agente quimioterapéutico, radiación o un agente que modula, por ejemplo, mejora o inhibe, la expresión o actividad de un receptor de Fc, por ejemplo, un receptor de Fc-gamma, tal como una citoquina. Las citoquinas típicas para la administración durante el tratamiento incluyen al factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), al factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 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.

15 En otro aspecto más, la invención se refiere a una estrategia de inmunización para inmunizar animales no humanos tales como ratones con GT468 humana o un fragmento de péptido de la misma para obtener anticuerpos. Los péptidos preferidos para la inmunización son aquellos seleccionados del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 2-10 y 35-79, o sus derivados. Por consiguiente, en realizaciones preferidas, los anticuerpos de la invención son los obtenidos por inmunización usando péptidos seleccionados del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 2-10 y 35-79, 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) sometiendo a recombinación V-D-J y cambio de isotipo. El cambio de isotipo puede producirse, por ejemplo, mediante el cambio de isotipo clásico o no clásico.

30 De acuerdo con esto, en otro aspecto más, la enseñanza abarca células B aisladas de un animal no humano como se describió anteriormente. Las células B aisladas se pueden inmortalizar por fusión a una célula inmortalizada para proporcionar una fuente (por ejemplo, un hibridoma) de anticuerpos. Tales hibridomas (es decir, que producen anticuerpos descritos en este documento) también están abarcados por la presente enseñanza.

35 Como se ejemplifica aquí, los anticuerpos de la invención se pueden obtener directamente de hibridomas que expresan el anticuerpo, o se pueden clonar y expresar en forma recombinante en una célula huésped (por ejemplo, una célula CHO o una célula linfocítica). Otros ejemplos de células huésped son microorganismos, tales como E. coli, y hongos, tales como levadura. Alternativamente, pueden producirse de forma recombinante en un animal no humano o planta transgénicos.

40 Las células de hibridoma preferidas para producir los anticuerpos descritos en este documento son las depositadas en DSMZ (Inhoffenstr. 7B, 38124 Braunschweig, Alemania) que tienen las siguientes designaciones y números de acceso:

- 45 a. 4E9-1H9, número de acceso DSM ACC2822, depositada el 13 de marzo de 2007
- b. 9B6-2A9, número de acceso DSM ACC2826, depositada el 13 de marzo de 2007
- c. 59D6-2F2, número de acceso DSM ACC2824, depositada el 13 de marzo de 2007
- d. 61C11-2B5, número de acceso DSM ACC2825, depositada el 13 de marzo de 2007
- e. 78H11-1H6, número de acceso DSM ACC2823, depositada el 13 de marzo de 2007
- 50 f. 22-1A-1, número de acceso DSM ACC2895, depositada el 11 de marzo de 2008
- g. 22-2A-1, número de acceso DSM ACC2893, depositada el 11 de marzo de 2008
- h. 22-9B-1, número de acceso DSM ACC2896, depositada el 11 de marzo de 2008
- i. 23-33A-1, número de acceso DSM ACC2897, depositada el 11 de marzo de 2008
- j. 23-19A-1, número de acceso DSM ACC2891, depositada el 11 de marzo de 2008
- k. F11 # 33F7D12, número de acceso DSM ACC2894, depositada el 11 de marzo de 2008
- 55 l. 4A12 2D4 1A10, número de acceso DSM ACC2892, depositada el 11 de marzo de 2008
- m. 4E9 1D12 2D4, número de acceso DSM ACC2898, depositada el 11 de marzo de 2008

60 Los anticuerpos preferidos 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 son aquellos que tienen la especificidad de los anticuerpos producidos por los hibridomas descritos anteriormente y, en particular, los que comprenden la porción de unión a antígeno o el sitio de unión a antígeno, en particular la región variable, de los anticuerpos producidos por y que pueden obtenerse de los hibridomas descritos anteriormente.

65 En las realizaciones preferidas, los anticuerpos, en particular las formas quimerizadas de anticuerpos 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 la SEQ ID NO: 17 o 24 o un fragmento de la misma. En otras realizaciones preferidas, los anticuerpos, en particular las formas quimerizadas de anticuerpos de acuerdo con la presente enseñanza 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 la SEQ ID NO: 18 o 22 o un fragmento de la misma. En una realización preferida particular, los anticuerpos, en particular las formas quimerizadas de anticuerpos incluyen por lo tanto anticuerpos que comprenden una CH que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de una CH humana tal como la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 17 o 24 o un fragmento de la misma y que comprende una 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.

Una CH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 17 puede estar codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por la SEQ ID NO: 20. Una CH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 24 puede estar codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por la 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 la 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 la SEQ ID NO: 21.

"Fragmento" o "fragmento de una secuencia de aminoácidos" como se usó anteriormente se refiere a una parte de una secuencia de anticuerpo, es decir, una secuencia que representa la secuencia de anticuerpo acortada en el terminal N y/o C, que cuando reemplaza dicha secuencia de anticuerpo en un anticuerpo conserva la unión de dicho anticuerpo a GT468 y preferiblemente las 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 al menos 80%, preferiblemente al 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.

La presente enseñanza también se refiere a ácidos nucleicos que comprenden genes o secuencias de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o partes de los mismos, 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 huésped 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 huéspedes 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 se une operativamente a las secuencias de control de expresión anteriores permitiendo la expresión en células eucariotas o procariontas. Los elementos de control que aseguran la expresión en células eucarióticas o procariontas son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Los métodos para la construcción de moléculas de ácido nucleico, para la construcción de vectores que comprenden las moléculas de ácido nucleico anteriores, para la introducción de los vectores en células huésped elegidas apropiadamente, para causar o lograr la expresión son bien conocidos en la técnica.

Un aspecto adicional de la presente enseñanza también se refiere a una célula huésped que comprende un ácido nucleico o vector como se describe en el presente documento.

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

#### 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 de cáncer de mama primario 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; 10, TOV-21G; 11, TOV-112D; 12, CAO-3; 13, EFO-21; 14, FU-OV-1; 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, Mama; 6, Colon; 7, Hígado; 8, Estómago; 9, Riñón; 10, Próstata; 11, Páncreas; 12, Ovario; 13, Bazo; 14, Piel; 15, Miocardio; 16, Endometrio; 17, PBMC en reposo; 18, PBMC en proliferación; 19, Glándula suprarrenal), muestras de cáncer de mama primario y (C) líneas celulares de cáncer. (D) Análisis de RT-PCR cuantitativo en tiempo real del silenciamiento de GT468 mediado por ARNpi en células de cáncer de mama MCF-7 y BT-549. (E) Análisis de transferencia Western de disminución mediada por ARNpi de la expresión de la proteína

GT468. Las células de control no se trataron o transfectaron con un dúplex no silenciador codificado (ARNpi-ns). (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 de cáncer de mama (derecha) usando un anticuerpo específico de GT468.

5 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/terminal C después de la transfección con ARNpi específico de GT468 (ARNpi # 1) o ARNpi no silenciador (ARNpi-ns).

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

15 Figura 4. La expresión de GT468 promueve la proliferación de células de cáncer de mama. (A) Análisis de proliferación en células MCF-7 y BT-549 72 h después de haber iniciado la desactivación por dúplex de ARNpi específicos de GT468. (B) Análisis del ciclo celular de células 72 h después del inicio del silenciamiento de GT468 mostrado como un gráfico de barras de fracciones celulares en diferentes estados de ciclo celular. (C) Apoptosis de las células según lo determinado por la tinción con Anexina-V 72 h después de la transfección con ARNpi. Como control positivo para la tinción con Anexina-V se trataron las células con Camptotecina 6  $\mu$ M durante 12 h.

20 Figura 5. GT468 es susceptible de ser modulado por fármacos de 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.

25 Figura 6. La ciclina D1 y la AKT quinasa están involucradas en la función de GT468. (A) Análisis por RT-PCR cuantitativo en tiempo real y (B) análisis de transferencia Western de ciclina D1 después de que las células se trataron durante 72 h con dúplex de ARNpi específicos de GT468. Análisis de transferencia Western de la fosforilación de AKT Ser473 después de (C) 72 h de desactivación de GT468 y después de (D) 1 h de tratamiento con anticuerpo anti-GT468/terminal C.

30 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.

35 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.

40 Figura 9. GT468 es susceptible de ser modulado por fármacos de 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.

45 Figura 10. Lisado crudo (CrELISA) (A) o ELISA específico de péptidos (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 de GT468 (A) o el péptido respectivo usado para la inmunización (B).

50 Figura 11. Análisis de citometría de flujo para determinar la especificidad de los anticuerpos producidos 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 en forma simulada.

55 Figura 12. Transferencia Western 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 pcDNA3.1 de GT468, mientras que los lisados de células transfectadas en forma simulada no mostraron señal. La señal tenue del sobrenadante de hibridoma 23-33A-1 en el lisado simulado se debe al desbordamiento del lisado de GT468 de HEK.

60 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 solapantes que implican reactividad con un epítomo lineal de GT468. Los patrones de unión de 22-2A-1 y 22-9B-1 implican reactividad a un epítomo conformacional (epítomo discontinuo) de la proteína GT468.

Figura 14. GT468 es susceptible de ser modulado por fármacos de anticuerpos monoclonales que antagonizan la función. Análisis de proliferación de diferentes líneas celulares de cáncer después de la incubación con sobrenadantes de hibridoma purificados durante 72 h o 120 h.

5 Descripción detallada de la invención

10 Los anticuerpos descritos en este documento pueden ser anticuerpos monoclonales aislados que se unen específicamente a un epítipo presente en GT468, preferiblemente un epítipo localizado con el dominio extracelular de GT468, más preferiblemente las SEQ ID NOs: 3-10 y 35-79. Los anticuerpos monoclonales aislados 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 IgG3 kappa o IgG3 lambda. En otra realización más, el anticuerpo es un anticuerpo IgG4, más particularmente un isotipo IgG4 kappa o IgG4 lambda. En otra realización más, el anticuerpo es un anticuerpo IgA1 o IgA2. En otra realización más, el anticuerpo es un anticuerpo IgM.

15 En una realización, la enseñanza se refiere 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 la asociación de GT468 con su superficie celular. Los anticuerpos de la presente enseñanza preferentemente (i) median en la muerte y/o inhiben la proliferación de células que expresan GT468 y/o se caracterizan por 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.

20 En otra realización, la presente enseñanza se refiere a anticuerpos que (i) se unen a células tumorales que expresan GT468 y/o se caracterizan por asociación de GT468 con su superficie celular, y (ii) no se unen a GT468 de células placentarias no cancerosas.

25 La presente enseñanza también incluye anticuerpos que (i) median en la destrucción de células tumorales que expresan GT468 y/o se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular, y (ii) no median la muerte de células que expresan GT468 de la placenta normal.

30 Los anticuerpos descritos en este documento también 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.

35 La unión de un anticuerpo de la invención al antígeno GT468 puede mediar en la destrucción de células que expresan GT468 y/o 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 se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular (por ejemplo, una célula tumoral). Alternativamente o además de mediar en la destrucción de células que expresan GT468 y/o caracterizarse por la asociación de GT468 con su superficie celular y/o inhibir la proliferación de células que expresan GT468 y/o caracterizarse por asociación de GT468 con su superficie celular, la unión de un anticuerpo de la invención al antígeno GT468 puede inhibir la motilidad, migración y/o invasión de células que expresan GT468 y/o caracterizarse por asociación de GT468 con su superficie celular (por ejemplo, una célula tumoral) y, por lo tanto, puede inhibir la diseminación metastásica de células tumorales. La muerte de células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la 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 que se caracteriza por la 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.

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

60 Definición de términos

El término "GT468" se refiere preferiblemente a GT468 humana, y en particular a (i) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia amino de la SEQ ID NO: 2 tal como un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1 o (ii) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, e incluye cualquier variante, conformaciones, isoformas y homólogos de especies de las mismas que son expresadas naturalmente por células o expresadas por células transfectadas con el gen de GT468. En una realización, el término "GT468" se refiere a la porción de GT468 correspondiente al

dominio extracelular y preferiblemente se refiere a la secuencia de aminoácidos de GT468 que no incluye el dominio hidrófobo del terminal N. 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.

5 "Variantes de GT468" también incluye una forma de GT468 que consiste esencialmente en el dominio extracelular o ectodominio de GT468. 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 células que expresan GT468. Preferiblemente, dicho "dominio extracelular" o "ectodominio" está presente en el compartimento extracelular. El "dominio extracelular" o "ectodominio" de GT468 se refiere preferiblemente a la porción de GT468 de longitud completa que carece del dominio hidrófobo del terminal N. De acuerdo con la invención, el término "dominio hidrofóbico" 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 terminal N de GT468. El "dominio hidrofóbico" de GT468 puede incluir una secuencia que precede a la secuencia hidrófoba y que se localiza en el extremo terminal N de GT468. Con respecto a la SEQ ID NO: 2, el dominio hidrofóbico del terminal N comprende preferiblemente los aminoácidos 1 a 22. Se entenderá que cualquier dominio o secuencia hidrófoba identificada para los polipéptidos GT468 de la presente invención se identifica de acuerdo con los criterios rutinariamente empleados en la técnica para identificar dominios o secuencias hidrófobas. Los límites exactos de un dominio hidrofóbico 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.

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

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

GT468 está asociada con la superficie de las células si está localizada en la superficie de dichas células y es accesible a la unión por anticuerpos específicos de GT468 añadidos 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 expresada por células, la GT468 asociada con la superficie de dichas células puede ser solo una porción de la GT468 expresada, en particular el dominio extracelular de la misma como se definió anteriormente.

35 El término "variante de GT468" incluirá (i) variantes de empalme de GT468, (ii) variantes modificadas postraduccionalmente de GT468, que incluyen particularmente variantes con diferente glicosilación tal como estado de glicosilación de N, (iii) variantes de conformación de GT468, (iv) GT468 relacionada con el cáncer y variantes de GT468 no relacionadas con el cáncer.

40 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 en tales estructuras, después de unirse a los anticuerpos de la presente invención, crea una alta densidad de complejos de antígeno-anticuerpo de GT468 en las membranas plasmáticas. Una densidad tan alta de complejos antígeno-anticuerpo de GT468 puede permitir la activación eficiente del sistema del complemento durante la CDC.

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

Por "tumor" se entiende un grupo anormal de células o tejido que crece mediante 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 o maligna.

60 Por "metástasis" se entiende la propagación de 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 eliminación 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 regional de ganglios linfáticos.

El término "tratamiento de una enfermedad" incluye curar, acortar la duración, mejorar, prevenir, ralentizar o inhibir la progresión o el empeoramiento, o prevenir o retrasar el inicio de una enfermedad o los síntomas de la misma.

5 Una muestra puede ser cualquier muestra útil de acuerdo con la presente invención, en particular una muestra biológica tal como una muestra de tejido, que incluye fluidos corporales, y/o una muestra celular y puede obtenerse de la manera convencional tal como mediante biopsia de tejido, incluida la biopsia por punción, 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.

10 El término "anticuerpo" se refiere a una glucoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o una porción de unión a antígeno de las mismas. El término "anticuerpo" también incluye todas las formas recombinantes de anticuerpos, en particular de los anticuerpos descritos en la presente memoria, por ejemplo, anticuerpos expresados en procariotas, anticuerpos no glicosilados y cualquier fragmento y derivado de anticuerpo que se une a un antígeno como se describe a continuación. Cada cadena  
15 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 compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el terminal amino al terminal carboxilo 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 inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de  
20 complemento clásico.  
25

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, en donde la estructura restante de inmunoglobulina de la molécula se basa en la estructura y/o secuencia de una inmunoglobulina humana. El sitio de  
30 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, modificados 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.  
35

El término "anticuerpo quimérico" se refiere a aquellos anticuerpos en los que una porción de cada una de las secuencias de aminoácidos de cadenas pesada y ligera es homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase particular, mientras que el resto del segmento de la cadena es homólogo a las secuencias correspondientes en otra. 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 derivados de otra. Una clara ventaja de tales formas quiméricas es que la región variable puede derivarse convenientemente de fuentes actualmente conocidas que usan células B fácilmente disponibles o hibridomas de organismos hospedadores no humanos en combinación con regiones constantes derivadas, por ejemplo, de preparaciones de células humanas. Si bien la región variable tiene la ventaja de facilidad de preparación y la especificidad no se ve afectada por la fuente, la región constante que es humana, es menos probable que provoque una respuesta inmune de un sujeto humano cuando se inyectan los anticuerpos que serían la región constante de una fuente no humana. Sin embargo, la definición no está limitada a este ejemplo particular.  
40  
45  
50

El término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de unión"), como se usa en la presente memoria, 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')<sub>2</sub>, 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 aisladas determinantes de complementariedad (CDR), y (vii) combinaciones de dos o más CDR aisladas que pueden unirse opcionalmente mediante un enlazador sintético. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, se pueden unir, usando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite formarse como una sola cadena de proteína en la que las regiones VL y VH se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (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).  
55  
60  
65

Dichos anticuerpos de una sola cadena también pretenden incluirse dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. Un ejemplo adicional es proteínas de fusión de inmunoglobulina del 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 CH2 de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada a la región de bisagra y (iii) una región constante CH3 de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada a la región constante CH2. El polipéptido del dominio de unión 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 describen adicionalmente en los documentos US 2003/0118592 y US 2003/0133939. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se criban para determinar su utilidad de la misma forma 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 la presente memoria 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 epítipos conformacionales y no conformacionales se distinguen porque la unión al primero, pero no al último se pierde en presencia de disolventes desnaturalizantes.

El término "epítipo discontinuo" como se usa en el presente documento, significa un epítipo conformacional en un antígeno de proteína que se forma a partir de al menos dos regiones separadas en la secuencia primaria de la proteína.

El término "molécula biespecífica" pretende incluir cualquier agente, por ejemplo, una proteína, péptido o un complejo de 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, una proteína, péptido o un complejo de proteína o péptido, que tiene más de dos especificidades de unión diferentes. Por ejemplo, la molécula se puede unirse a, o interactuar con, (a) un antígeno de superficie celular, (b) un receptor de Fc en la superficie de una célula efectora, y (c) al menos otro componente. Por consiguiente, 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 complementarios 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) Structure 2: 1121-1123).

La enseñanza también incluye derivados de los anticuerpos descritos en este documento. 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 usa en la presente memoria, un anticuerpo se "deriva de" una secuencia de línea germinal particular si el anticuerpo se obtiene de un sistema inmunizando un animal o cribando una biblioteca de genes de inmunoglobulina, y en el que el anticuerpo seleccionado es al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico 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.

Como se usa en el presente documento, el término "heteroanticuerpos" se refiere a dos o más anticuerpos, derivados de los mismos, o regiones de unión a antígeno unidas entre sí, al 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 epítipo en una célula objetivo, por ejemplo, una célula tumoral.

Los anticuerpos descritos en este documento pueden ser anticuerpos humanos. El término "anticuerpo humano", como se usa 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 pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica del sitio in vitro o por mutación somática in vivo).

El término "anticuerpo monoclonal" como se usa 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 epítipo 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.

5 El término "anticuerpo recombinante", como se usa en el presente 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 los mismos, (b) anticuerpos aislados de una célula hospedadora transformada para expresar el anticuerpo, por ejemplo, de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos combinatoria, recombinante y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el empalme de secuencias del gen de inmunoglobulina a otras secuencias de ADN.

10 El término "transfectoma", como se usa en el presente documento, incluye células hospedadoras 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.

15 Como se usa 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 se deriva de una especie distinta del organismo transgénico.

20 Como se usa en el presente documento, un "anticuerpo heterohíbrido" se refiere a un anticuerpo que tiene cadenas ligera y pesada 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.

25 Los anticuerpos descritos en este documento preferiblemente se aíslan. Un "anticuerpo aislado" como se usa 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 humana 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.

35 De acuerdo con la invención, el término "unión" se refiere preferiblemente a "unión específica". Como se usa en el presente documento, "unión específica" se refiere a la unión del anticuerpo a un antígeno predeterminado. Típicamente, el anticuerpo se une con una afinidad correspondiente a una KD de aproximadamente  $1 \times 10^{-7}$  M o menos, y se une al antígeno predeterminado con una afinidad correspondiente a una KD que es al 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.

40 El término "KD" (M), como se usa en este documento, pretende referirse a la constante de equilibrio de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular.

45 Como se usa en el presente documento, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1) que está codificada por genes de región constante de cadena pesada.

Como se usa en el presente documento, "cambio 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.

50 El término "de origen natural", como se usa en la presente memoria, tal como se aplica 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 (incluidos virus) que puede aislarse de una fuente en la naturaleza y que no ha sido modificada intencionalmente por el hombre en el laboratorio es de origen natural.

55 El término "reordenado" como se usa en el presente documento se refiere a una configuración de un locus de inmunoglobulina de cadena pesada o cadena ligera en la que un segmento V está situado inmediatamente adyacente a un segmento DJ o J en una conformación que codifica esencialmente un dominio VH o VL completo, respectivamente. Un locus del gen de inmunoglobulina (anticuerpo) reordenado se puede identificar por comparación con el ADN de la línea germinal; un locus reordenado tendrá al menos un elemento de homología heptámero /nonámero recombinado.

60 El término "configuración no reordenada" o "de línea germinal" como se usa en el presente documento en referencia a un segmento V se refiere a la configuración en la que el segmento V no se recombina de modo que sea inmediatamente adyacente a un segmento D o J.

El término "molécula de ácido nucleico", como se usa en la presente memoria, pretende incluir moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser de cadena sencilla o de cadena doble, pero preferiblemente es ADN de doble cadena.

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

Los ácidos nucleicos pueden, de acuerdo con la presente enseñanza, 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. El término "homólogo" significa que un ácido nucleico también está unido funcionalmente a la secuencia de control de la expresión de forma natural y el término "heterólogo" significa que un ácido nucleico no está funcionalmente unido a la secuencia de control de la expresión de forma natural.

Un ácido nucleico, tal como un ácido nucleico que expresa ARN y/o proteína o péptido, y una secuencia de control de la expresión están "funcionalmente" unidos entre sí, si están unidos covalentemente entre sí de tal manera que la expresión o la transcripción de dicho 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 dicha secuencia de codificación no puede traducirse en la proteína o péptido deseado.

El término "secuencia de control de la expresión" comprende promotores, sitios de unión a ribosomas, potenciadores y otros elementos de control que regulan la transcripción de un gen o la traducción de un ARNm. En realizaciones particulares, las secuencias de control de la expresión se pueden regular. La estructura exacta de las secuencias de control de la expresión puede variar en función de la especie o tipo de célula, pero generalmente comprende secuencias 5' no transcritas y 5' y 3' no traducidas que están involucradas en el inicio de la transcripción y traducción, respectivamente, tales como la caja TATA, secuencia de protección, 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 de control de expresión también pueden comprender secuencias potenciadoras o secuencias activadoras en dirección 5'.

De acuerdo con la invención, el término "promotor" o "región promotora" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que está situada secuencia 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 la ARN polimerasa. La "región promotora" puede incluir sitios de 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 procarionota o eucariota. Además, 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, el gen se enciende o 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 presente enseñanza incluyen promotores para SP6, polimerasa T3 y T7, promotor de ARN U6 humano, promotor del 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 ejemplo, GAPDH humana (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) e incluyendo o no un o unos intrones adicionales.

De acuerdo con la presente enseñanza, el término "expresión" se usa 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. Además, la expresión puede llevarse a cabo de forma transitoria o estable.

En una realización preferida, una molécula de ácido nucleico está de acuerdo con la enseñanza presente en un vector, cuando sea apropiado con un promotor, que controla la expresión del ácido nucleico. El término "vector" se usa aquí en su significado más general y comprende cualquier vehículo intermediario para un ácido nucleico que permite que dicho ácido nucleico, por ejemplo, se introduzca en células procarionotas y/o eucariotas 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 usa en la presente memoria, se refiere en general a una construcción de material genético

extracromosómico, habitualmente un dúplex de ADN circular, que puede replicarse independientemente del ADN cromosómico.

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

10 La enseñanza dada en este documento con respecto a secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos específicas, por ejemplo, las 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 secuencias de aminoácidos que exhiben propiedades idénticas o similares a las de las secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias de ácido nucleico específicas. 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 la presente memoria, por ejemplo, la lisis mediada por CDC o la lisis mediada por ADCC.

20 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 descritos específicamente en este documento.

30 Se debe entender que los ácidos nucleicos específicos descritos en este 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 marco de los anticuerpos se van a usar 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, tal como ratón o hámster. Por ejemplo, las secuencias de ácidos nucleicos que codifican regiones constantes de cadena ligera y pesada humanas tales como las de las SEQ ID NOs: 19 y 20, respectivamente, pueden modificarse para incluir una o más, preferiblemente, al 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. Tales reemplazos de nucleótidos preferiblemente se refieren a reemplazos de nucleótidos en las SEQ ID Nos: 19 y 20, respectivamente, seleccionados de los reemplazos mostrados en la siguiente alineación de las SEQ ID Nos: 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 cadena ligera y pesada humanas, respectivamente. Preferiblemente, todas las sustituciones mostradas en las siguientes alineaciones de las SEQ ID NOs: 19 y 20, respectivamente, con sus contrapartes modificadas 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 cadenas ligera y pesada humanas, respectivamente.

Alineación de la SEQ ID NO: 19 y la SEQ ID NO: 21:

ES 2 664 571 T3

```
CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT 60
|||
CGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGTCC 60
|||
GGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAG 120
|||
GGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAG 120
|||
TGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGAC 180
|||
TGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGAC 180
|||
AGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAG 240
|||
AGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGAG 240
|||
AAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG 300
|||
AAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAG 300
|||
AGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG 324
|||
AGCTTCAACAGGGGCGAGTGCTAG 324
```

5 Alineación de la SEQ ID NO: 20 y la SEQ ID NO: 23:



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 cadena pesada humana: K93R, D235E y L237M. Preferiblemente, todas estas modificaciones están incluidas en las secuencias de aminoácidos de las regiones constantes de cadena pesada humana.

De acuerdo con la presente enseñanza, el término "posiciones correspondientes" se refiere a nucleótidos o restos de aminoácidos que en una alineación de secuencia de dos secuencias de ácido nucleico o proteína se alinean entre sí.

Preferiblemente, el grado de identidad entre una secuencia específica de ácido nucleico descrita aquí y una secuencia de ácido nucleico que está modificada con respecto a, o que es una variante de dicha secuencia específica de ácido nucleico será al menos del 70%, preferiblemente al menos del 75%, más preferiblemente al menos del 80%, incluso más preferiblemente al menos del 90% o más preferiblemente al menos del 95%, 96%, 97%, 98% o 99%. Con respecto a las variantes de ácido nucleico de GT468, el grado de identidad se da preferiblemente para una región de al menos aproximadamente 300, al menos aproximadamente 400, al menos aproximadamente 450, al menos aproximadamente 500, al menos aproximadamente 550, al menos aproximadamente 600 o al 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 et al., Editores, 2ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989 o *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel et al., Editores, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York y se refieren, por ejemplo, a la hibridación a 65°C en regulador de hibridación (3,5 x SSC, 0,02% de Ficoll, 0,02% de polivinilpirrolidona, 0,02% de albúmina de suero bovino, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,5 mM (pH 7), 0,5% de SDS, EDTA 2 mM). El SSC es cloruro de sodio 0,15 M /citratato de sodio 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 SDS a temperaturas de hasta 68°C.

Preferiblemente, el grado de similitud, preferiblemente de identidad entre una secuencia de aminoácidos específica descrita aquí 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 al menos del 70%, preferiblemente al menos del 80%, incluso más preferiblemente al menos del 90% o más preferiblemente al menos del 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 al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 120, al menos aproximadamente 140, al menos aproximadamente 160, al menos aproximadamente 180, al menos aproximadamente 200, al 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 el listado de secuencias.

Todas las secuencias modificadas o variantes de secuencias descritas anteriormente están dentro del alcance de la presente enseñanza.

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.

El "porcentaje de identidad" se obtiene después de la mejor alineación, siendo este porcentaje 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, *Adv. 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. USA* 85, 2444, o por medio de programas informáticos que usan estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, WI).

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.

Las "sustituciones conservadoras" pueden realizarse, 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) los 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 romper hélices  $\alpha$ . 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.

La presente enseñanza comprende 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 FcyR 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, consultar los documentos US 5.624.821 y US 5.648.260.

La vida útil *in vivo* de los anticuerpos puede mejorarse modificando el epítipo del receptor de rescate del dominio constante de Ig o un dominio constante de tipo Ig de modo que la molécula no comprenda un dominio de CH2 intacto o una región Fc de Ig intacta, consultar los documentos US 6.121.022 y US 6.194.551. La vida útil *in vivo* puede incrementarse adicionalmente haciendo 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, consultar el documento US 6.277.375.

Además, el patrón de glicosilación de anticuerpos se puede modificar 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 de Fc que, a su vez, dará como resultado una mayor ADCC de los anticuerpos en presencia de células NK, consultar Shield et al. (2002) JBC, 277: 26733. Además, se puede realizar una modificación de la galactosilación para modificar CDC.

Alternativamente, en otra realización, se pueden introducir mutaciones aleatoriamente a lo largo de toda o parte de una secuencia de codificación del anticuerpo anti-GT468, tal como por mutagénesis de saturación, y los anticuerpos anti-GT468 modificados resultantes pueden cribarse para la actividad de unión.

El término "célula hospedadora recombinante" (o simplemente "célula hospedadora"), como se usa 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, dicha progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero todavía está incluida dentro del alcance del término "célula hospedadora" como se usa en el presente documento. Las células hospedadoras recombinantes incluyen, por ejemplo, transfectomas, tales como células CHO, células NS/0 y células linfocíticas.

Como se usa 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 cadena pesada humana puede integrarse en el ADN cromosómico del ratón, como es el caso de los ratones transgénicos, por ejemplo, los ratones HuMAb, tal como los ratones HC07 o HC02, o el transgén de la cadena pesada humana puede mantenerse extracromosómicamente, como es el 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) sometiéndose a recombinación V-D-J y cambio de isotipo.

"Reducir" o "inhibir" como se usa en este documento significa la capacidad de causar una disminución global, preferiblemente del 5% o más, 10% o más, 20% o más, más preferiblemente del 50% o más, y lo más preferiblemente del 75% o más, en el nivel, por ejemplo, en el nivel de proliferación de las células.

Mecanismos de acción de mAb

Aunque lo siguiente proporciona consideraciones con respecto al mecanismo que subyace a la eficacia terapéutica de los anticuerpos de la invención, no se debe considerar como limitante de ningún modo para la invención.

5 Los anticuerpos descritos en este documento preferiblemente interactúan con componentes del sistema inmune, preferiblemente a través de ADCC o CDC. Los anticuerpos de la invención también pueden usarse para atacar cargas útiles (por ejemplo, radioisótopos, fármacos o toxinas) para destruir directamente células tumorales o pueden usarse sinérgicamente con agentes quimioterapéuticos tradicionales, atacando tumores a través de mecanismos de acción complementarios que pueden incluir respuestas inmunitarias antitumorales que pueden haber sido comprometidos debido a los efectos secundarios citotóxicos de un agente quimioterapéutico sobre los linfocitos T. Sin embargo, los anticuerpos de la invención 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

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

20 La ADCC se produce preferiblemente cuando los anticuerpos se unen a antígenos en células tumorales y los dominios Fc del anticuerpo se acoplan a los receptores de Fc (FcR) en la superficie de las células efectoras inmunes. 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 destrucción tumoral inmediata que conduce a la presentación del antígeno y a la inducción de respuestas de células T dirigidas al tumor. Preferiblemente, la inducción *in vivo* de ADCC conducirá a respuestas de células T dirigidas al tumor y respuestas de anticuerpos derivadas del huésped.

Citotoxicidad dependiente del complemento

30 CDC es otro método de destrucción celular que puede ser dirigido por anticuerpos. IgM es el isotipo más efectivo para la activación del complemento. IgG1 e IgG3 también son muy efectivos 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 Clq muy próximos en los dominios C<sub>H</sub>2 de moléculas de anticuerpo participantes tales como moléculas IgG (Clq es uno de los tres subcomponentes del complemento C1). Preferiblemente estos sitios de unión Clq sin cubierta convierten la interacción Clq-IgG previamente de baja afinidad en una de alta avidez, que desencadena una cascada de eventos que involucran 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 de la célula que facilitan el paso libre de agua y solutos hacia y desde la célula.

Producción de anticuerpos

45 Los anticuerpos de la invención se pueden producir mediante una variedad de técnicas, que incluyen la metodología convencional de anticuerpos monoclonales, por ejemplo, la técnica de hibridación de células somáticas estándar de Kohler y Milstein, Nature 256: 495 (1975). Aunque se prefieren procedimientos de hibridación de células somáticas, en principio, se pueden emplear otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales, por ejemplo, transformación viral u oncogénica de linfocitos B o técnicas de presentación en fagos utilizando bibliotecas 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. USA 92: 9348 (1995), véase 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 usando ratones transgénicos o transcromosómicos que portan partes del sistema inmune humano en lugar del sistema de 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 el documento WO2004/035607, ahora concedido, por ejemplo, como EP1558648 (B1) o EP2330130 (B1).

Otra estrategia más para generar anticuerpos monoclonales es aislar directamente genes que codifican anticuerpos de linfocitos que producen anticuerpos de la estrategia definida, por ejemplo, véase 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, véase también Welschof y Kraus, Recombinant antibodies for cancer therapy 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 de GT468, una preparación enriquecida de antígeno GT468 expresado de forma recombinante o fragmentos del mismo 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, la SEQ ID NO: 1) o fragmentos de la misma, en particular los que codifican las SEQ ID NOs: 3-10 y 35-79. En el caso de que las inmunizaciones que usan 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 inmune puede controlarse durante el transcurso del protocolo de inmunización con muestras de plasma y suero que se obtienen a través de la vena de la cola o hemorragias retroorbitales. Se pueden usar ratones con suficientes títulos 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 contra GT468, se pueden aislar esplenocitos y células de ganglios linfáticos de ratones inmunizados y fusionarlos 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 usando células que expresan GT468, se pueden identificar anticuerpos con especificidad por GT468. Los hibridomas que secretan anticuerpos se pueden volver a sembrar en placas, cribar de nuevo, y si todavía son positivos para anticuerpo monoclonales anti-GT468, 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 hospedadora usando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección génica como se conocen bien en la técnica (Morrison, S. (1985) Science 229: 1202).

Por ejemplo, en una realización, el gen o 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 utilizado por el sistema de expresión del gen GS divulgado en los documentos 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 hospedadoras eucariotas tales como células CHO, células NS/0, células HEK293T o células HEK293 o, alternativamente, otras células eucariotas tales 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 por 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 clonados se pueden expresar en otros sistemas de expresión, que incluyen células procariotas, tales como microorganismos, por ejemplo, E. coli. Además, los anticuerpos pueden producirse en animales transgénicos no humanos, tales como en leche de ovejas y conejos o en huevos de gallinas, o en plantas transgénicas; véase, por ejemplo, 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 pueden usarse 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 *Methods in Molecular Biology series, Recombinant antibodies for cancer therapy* ISBN-0-89603-918-8). 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 ligera lambda 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.

## 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 de 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 de 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. USA* 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 usa 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 usa para completar las partes faltantes de las regiones variables. Las secuencias líder 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 ADNc clonadas se pueden combinar con oligonucleótidos sintéticos mediante ligación o amplificación por PCR. Alternativamente, la región variable completa puede sintetizarse como un conjunto de oligonucleótidos cortos que se solapan y combinarse por 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 de hibridomas se usan para diseñar un conjunto solapante de oligonucleótidos sintéticos para crear secuencias V sintéticas con capacidades de codificación de aminoácidos idénticas a las secuencias naturales. Las secuencias sintéticas de cadena pesada y 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 óptimos de iniciación de la traducción se incorporan de acuerdo con las reglas de Kozak (Kozak, 1991, *J. Biol. Chem.* 266: 19867-19870); y los sitios HindIII están diseñados secuencia arriba de los sitios de iniciación de la traducción.

Para las regiones variables tanto de cadena pesada como ligera, las secuencias de cadena de codificación optimizada y las correspondientes no codificantes 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 usan 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 que se superponen. Estos productos

superpuestos se combinan luego mediante amplificación por PCR para formar la región variable completa. También puede ser deseable incluir un fragmento solapante 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.

5 Las regiones variables de cadena pesada y ligera quimerizadas o humanizadas reconstruidas se combinan a continuación con un promotor clonado, líder, iniciación de traducción, región constante, 3' no traducida, poliadenilación y secuencias de terminación de la transcripción para formar construcciones de vector de expresión. Las construcciones de expresión de cadena pesada y ligera se pueden combinar en un solo vector, cotransfectarse, transfectarse en serie o transfectarse por separado en células huésped que luego se fusionan para formar una célula hospedadora que expresa ambas cadenas. Los plásmidos para uso en la construcción de vectores de expresión para IgGk humana se describen a continuación. Los plásmidos se construyeron de modo que las secuencias de ADNc de cadena pesada V y ligera kappa V amplificadas por PCR pudieran usarse para reconstruir minigenes completos de cadena pesada y ligera. Estos plásmidos pueden usarse 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 cadenas ligeras lambda.

20 De este modo, en otro aspecto de la invención, las características estructurales de los anticuerpos anti-GT468 de la invención se usan para crear anticuerpos anti-GT468 humanizados estructuralmente relacionados que retienen al menos una propiedad funcional de los anticuerpos de la invención, como el enlace a GT468. Más específicamente, una o más regiones CDR de anticuerpos monoclonales de ratón pueden combinarse de forma recombinante con regiones flanqueantes humanas conocidas y CDR para crear anticuerpos adicionales de la invención anti-GT468 humanizados, modificados en forma recombinante por ingeniería genética.

25 Unión a células que expresan antígeno

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

30 Caracterización de la unión de anticuerpos

35 Para purificar anticuerpos anti-GT468, los hibridomas seleccionados se pueden cultivar en matraces rotativos 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 cromatografía de afinidad con proteína G-sefarosa o proteína A-sefarosa. El IgG eluido puede monitorizarse mediante electroforesis en gel y cromatografía líquida de alta resolución para garantizar la pureza. La solución reguladora puede intercambiarse por PBS, y la concentración puede determinarse mediante  $DO_{280}$  utilizando un coeficiente de extinción de 1,43. Los anticuerpos monoclonales se pueden guardarse en alícuotas y almacenarse a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

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

45 Determinación del isotipo

50 Para determinar el isotipo de anticuerpos purificados, se pueden realizar ELISA de isotipo con diversos kits comerciales (por ejemplo, Zymed, Roche Diagnostics). Los pozos de las placas de microtitulación se pueden recubrir con anti-Ig de 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, IgG2a, IgG2b o IgG3 de ratón, 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 usar el kit de isotipificación de anticuerpos monoclonales de ratón IsoStrip (Roche, Cat. No. 1493027) tal como lo describe el fabricante.

55 Análisis citométrico de flujo

60 Para 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 usar citometría de flujo. Las líneas celulares que expresan naturalmente o después de transfección GT468 y los controles negativos que carecen de expresión de GT468 (cultivadas 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  $4^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos. Después del lavado, el anticuerpo anti IgG marcado con APC o Alexa647 se puede unir 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 luz y las propiedades de dispersión lateral para atravesar las células vivas individuales. Con el fin de distinguir los anticuerpos

monoclonales específicos de GT468 de los aglutinantes no 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 los anticuerpos no específicos se unen en una relación comparable a las células no transfectadas. Se puede usar un ensayo alternativo usando 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

Para 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 usar el análisis por microscopía de inmunofluorescencia. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan espontáneamente o después de transfección GT468 y los controles negativos que carecen de expresión de GT468 se cultivan en portaobjetos bajo condiciones de crecimiento estándar en medio DMEM/F12, suplementado con 10% de suero de ternera fetal (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 anti-IgG de ratón marcado con Alexa555 (Molecular Probes) en las mismas condiciones. Las células pueden luego examinarse mediante microscopía de fluorescencia.

Se pueden observar los niveles totales de GT468 en las células cuando las células se fijan en metanol o se fijan con paraformaldehído y se permeabilizan con Triton X-100. En células vivas y no permeabilizadas, se puede examinar la localización de GT468 en la superficie de las células fijadas con paraformaldehído. Además, el direccionamiento de GT468 a uniones estrechas se puede analizar mediante tinción conjunta con marcadores de unión estrechas como ZO-1. Además, se pueden examinar los efectos de la unión del anticuerpo y la localización de GT468 dentro de la membrana celular.

#### Transferencia Western

IgG anti-GT468 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 puede detectarse usando peroxidasa anti-IgG de ratón y desarrollada 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 la persona experta, por ejemplo, utilizando criosecciones fijadas con paraformaldehído o acetona, o secciones de tejido embebidas en parafina 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, los anticuerpos reactivos a GT468 pueden incubarse seguidos por anticuerpos antirratón de cabra o anticonejo de cabra conjugados con peroxidasa de rábano picante (DAKO) de acuerdo con las instrucciones de los proveedores.

#### Actividades fagocíticas y de muerte celular de anticuerpos in vitro

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

#### Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC):

En resumen, 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 al 5% inactivado por calor y mezclado con células objetivo marcadas con <sup>51</sup>Cr que expresan GT468 y/o caracterizadas por asociación de GT468 con su superficie celular, con diferentes proporciones de células efectoras para células objetivo. Alternativamente, las células objetivo se pueden marcar con un ligando potenciador de fluorescencia (BATDA). Un

quelato altamente fluorescente de Europio 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 puede usarse 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 por citólisis midiendo la liberación de <sup>51</sup>Cr 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):

Se pueden analizar los anticuerpos monoclonales anti-GT468 para determinar su capacidad para mediar la CDC usando una variedad de técnicas conocidas. Por ejemplo, el suero para el complemento se puede obtener de la sangre de una manera conocida por la persona experta. Para determinar la actividad de la CDC de los mAb, se pueden usar diferentes métodos. Por ejemplo, se puede medir la liberación de <sup>51</sup>Cr, o se puede evaluar la elevada permeabilidad de la membrana usando un ensayo de exclusión de yoduro de propidio (PI). Brevemente, las células objetivo se pueden lavar y se pueden incubar 5 x 10<sup>5</sup>/ml con diversas concentraciones de mAb durante 10-30 minutos a temperatura ambiente o a 37°C. Luego puede agregarse suero o plasma hasta 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 de PI en un tubo FACS. La mezcla puede luego analizarse inmediatamente mediante análisis de citometría de flujo usando FACSAArray.

En un ensayo alternativo, la inducción de CDC puede determinarse en células adherentes. En una realización de este ensayo, las células se siembran 24 h antes del ensayo con una densidad de 3 x 10<sup>4</sup>/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 se mide la emisión de fluorescencia por excitación a 520 nm a 600 nm usando un Tecan Safire. El porcentaje de lisis específica se calcula de la siguiente manera: % de lisis específica = (muestra de fluorescencia - trasfondo de fluorescencia) / (lisis máxima de fluorescencia - trasfondo de 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 regulador 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, catálogo 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 en proliferación en microplacas. BrdU incorporado se detecta usando anticuerpo monoclonal marcado con europio. Para permitir la detección de anticuerpos, las células se fijan y se desnaturaliza el ADN con la solución de fijación. 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, se puede realizar usando anticuerpos de la invención. Los anticuerpos se pueden administrar a ratones libres de tumores 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 de GT468. Los posibles efectos secundarios de la aplicación in vivo de los anticuerpos de 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 de GT468 en humanos.

#### 15 Mapeo de epítomos

El mapeo de los epítomos reconocidos por los anticuerpos de la invención se puede realizar como se describe en detalle en "Epitope Mapping Protocols (Methods in Molecular Biology) por Glenn E. Morris ISBN-089603-375-9 y en "Epitope Mapping: A Practical Approach" Practical Approach Series, 248 por Olwyn M. R. Westwood, Frank C. Hay.

#### 20 I. Moléculas biespecíficas /multiespecíficas que se unen a GT468

En otra realización más de la invención, los anticuerpos contra GT468 pueden formar derivados o unirse a otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, un fragmento Fab') para generar una molécula biespecífica o multiespecífica que se une a sitios de enlaces múltiples o epítomos objetivo. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede estar funcionalmente unido (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro tipo) a una o más moléculas de unión diferentes, tales como otro anticuerpo, péptido o mimético de unión.

Por consiguiente, la presente enseñanza incluye moléculas biespecíficas y multiespecíficas que comprenden al menos una primera especificidad de unión para GT468 y una segunda especificidad de unión para un segundo epítomo objetivo. En una realización particular, el segundo epítomo objetivo es un receptor de Fc, por ejemplo, Fc-gammaR humano (CD64) o un receptor de Fc-alfa humano (CD89), o un receptor de células T, por ejemplo, CD3. Por lo tanto, la enseñanza incluye moléculas biespecíficas y multiespecíficas capaces de unirse tanto a células efectoras que expresan Fc-gammaR, Fc-alfaR o Fc-épsilonR (por ejemplo, monocitos, macrófagos o células polimorfonucleares (PMN)), como a células objetivo que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular. Estas moléculas biespecíficas y multiespecíficas pueden dirigirse a células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por asociación de GT468 con su superficie celular a células efectoras y pueden desencadenar actividades de células efectoras mediadas por el receptor de Fc, tales como fagocitosis de células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por asociación de GT468 con su superficie celular, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), liberación de citoquinas o generación de anión superóxido.

Las moléculas biespecíficas y multiespecíficas 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 inmune contra la célula objetivo. La "porción del 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 receptor de Fc 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 la primera y segunda especificidades. Por ejemplo, la porción del factor anti-potenciación puede unirse a una célula T citotóxica (por ejemplo, a través de CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 u otra célula inmunitaria que produce una mayor respuesta inmune contra la célula objetivo).

En una realización, las moléculas biespecíficas y multiespecíficas comprenden como una especificidad de unión al menos un anticuerpo, que incluye, por ejemplo, un Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, o un Fv de cadena sencilla. 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 sencilla como se describe en Ladner et al., patente 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 multiespecíficas comprenden una especificidad de unión por un Fc-gammaR o un Fc-alfaR presente en la superficie de una célula efectora, y una segunda especificidad de unión por 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 humana (IgG). Como se usa 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 de Fc-gamma: Fc-gammaRI (CD64), Fc-gammaRII (CD32) y Fc-gammaRIII (CD16). En una realización preferida, el receptor de Fc-gamma es un Fc-gammaRI de alta afinidad humana.

La producción y caracterización de estos anticuerpos monoclonales preferidos se describen por Fanger et al. en el documento WO 88/00052 y en el documento US 4.954.617. Estos anticuerpos se unen a un epítipo de Fc-gammaRI, Fc-gammaRII o Fc-gammaRIII en un sitio que es distinto del sitio de unión de Fcγ del receptor y, por lo tanto, su unión no está bloqueada sustancialmente por niveles fisiológicos de IgG. Los anticuerpos específicos anti-Fc-gammaRI útiles en esta invención son mAb 22, mAb 32, mAb 44, mAb 62 y mAb 197. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-receptor de 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 HA022CL1 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 humano, 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 kDa. 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 por IgA1 e IgA2, que aumenta con la exposición a citoquinas tales como G-CSF o GM-CSF (Morton, H.C. et al. (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, RC et al. (1992) J. Immunol. 148: 1764).

Fc-alfaRI y Fc-gammaRI son receptores desencadenantes preferidos para su uso de acuerdo con la presente enseñanza 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) median en la presentación mejorada de antígenos de antígenos, incluidos autoantígenos, dirigidos a ellos.

En otra realización, la molécula biespecífica está compuesta por dos anticuerpos monoclonales de acuerdo con la invención 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 usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo o fragmento funcional de anticuerpo que se une al receptor de Fc de células efectoras. Los anticuerpos preferidos para uso en la presente invención se unen al receptor de Fc de células efectoras en un sitio que no está unido por inmunoglobulina endógena.

Como se usa en el presente 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. Los ejemplos de células inmunes incluyen células de origen mieloide o linfoide, por ejemplo, linfocitos (por ejemplo, células B y células T que incluyen células T citolíticas (CTL), células asesinas, células asesinas naturales, macrófagos, monocitos, eosinófilos, neutrófilos, células polimorfonucleares, granulocitos, mastocitos y basófilos. Algunas células efectoras expresan receptores específicos de Fc y llevan a cabo funciones inmunes específicas. En realizaciones preferidas, una célula efectora es capaz de inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), por ejemplo, un neutrófilo capaz de inducir ADCC. ejemplo, monocitos, macrófagos, que expresan FcR están implicados en la muerte específica de células objetivo y que presentan antígenos a otros componentes del sistema inmune, o uniéndose 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 sobrerregulada por interferón gamma (IFN-γ). Esta expresión mejorada 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" significa cualquier célula indeseable en un sujeto (por ejemplo, un ser humano o animal) que pueda ser blanco de un anticuerpo de la invención. 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 la presente invención pueden prepararse usando técnicas químicas (véase, por ejemplo, DM Kranz et al. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 5807), técnicas de "polidoma" (Véase el documento US 4.474.893 de Reading) o técnicas de ADN recombinante.

5 En particular, las moléculas biespecíficas y multiespecíficas descritas en este documento pueden prepararse conjugando las especificidades de unión constituyentes, por ejemplo, las especificidades de unión anti-FcR y anti-GT468, usando 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 usar una variedad de agentes de acoplamiento o  
10 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 et al. (1984) J. Exp. Med. 160: 1686, Liu, MA et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 8648). Otros métodos incluyen los descritos por Paulus (Behring Ins. Mitt. (1985) números 78, 118-132); Brennan et al. (Science (1985) 229: 81-83), y Glennie et al. (J. Immunol. (1987) 139: 2367-2375). Los agentes de conjugación preferidos son SATA y sulfo-SMCC, ambos disponibles a través de Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

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

25 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')<sub>2</sub> o ligando x Fab. Una molécula biespecífica y multiespecífica de la invención, por ejemplo, una molécula biespecífica, puede ser una molécula de una sola cadena, tal como un anticuerpo biespecífico de cadena sencilla, una molécula biespecífica de cadena sencilla que comprende un anticuerpo de cadena sencilla y un determinante de unión, o una molécula biespecífica de cadena sencilla que comprende dos determinantes de unión. Las moléculas biespecíficas y multiespecíficas también pueden ser moléculas de cadena sencilla o pueden comprender al menos dos moléculas de cadena sencilla. Los métodos para preparar moléculas biespecíficas 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.

35 La unión de las moléculas biespecíficas y multiespecíficas a sus objetivos específicos puede confirmarse mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), un radioinmunoanálisis (RIA), un análisis FACS, un bioensayo (por ejemplo, inhibición del 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 usando, 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 usando 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, Séptimo curso de formación sobre Técnicas de Ensayo con Radioligandos, 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.

## 50 II. Inmunoconjugados

En otro aspecto, la presente enseñanza presenta 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, dihidroxi-antracino-diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos.

60 Los agentes terapéuticos adecuados para formar inmunoconjugados incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-fluorouracil-descarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tiotepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptoizotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclina (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.

5 Los anticuerpos también se pueden conjugar 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 anticuerpo descritos en la presente memoria se pueden usar para modificar una respuesta biológica dada, y la fracción de fármaco no debe interpretarse como limitada 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 el factor de necrosis tumoral o interferón  $\gamma$ ; o modificadores de la respuesta biológica, tales como, por ejemplo, linfoquinas, interleuquina 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 tal resto terapéutico a anticuerpos son bien conocidas, véase, por ejemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), páginas 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery* (2da Ed.), Robinson et al. (eds.), páginas 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), páginas 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), páginas 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 se pueden unir a un enlazador-quelante, por ejemplo, tiuxetano, que permite que el anticuerpo se conjugue con un radioisótopo.

### 30 III. Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la presente enseñanza abarca una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene uno o una combinación de anticuerpos descritos en este documento. 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 descritas 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 la invención 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 la presente enseñanza también se pueden administrar en terapia de combinación, es decir, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir una composición de la presente enseñanza con al menos un agente antiinflamatorio o al 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, tales como rofecoxib (Vioxx) y celecoxib (Celebrex), AINE tales como ibuprofeno (Motrín, Advil), fenoprofeno (Nalfon), naproxeno (Naprosyn), sulindac (Clinoril), diclofenaco (Voltarén), piroxicam (Feldene), cetoprofeno (Orudis), diflunisal (Dolobid), nabumetona (Relafen), etodolac (Lodine), oxaprozin (Daypro) e indometacina (Indocina).

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.

55 En otra realización más, tales agentes terapéuticos incluyen uno o más agentes quimioterapéuticos, tales como derivados de Taxol, Taxotere, gemcitabina, 5-Fluoruracilo, doxorubicina (Adriamicina), cisplatino (Platinol), ciclofosfamida (Cytoxan, Procytox, Neosar). En otra realización, los anticuerpos de la presente enseñanza se pueden administrar en combinación con agentes quimioterapéuticos, que preferiblemente muestran eficacia terapéutica en pacientes que padecen cáncer de mama, pulmón, estómago y/o ovario u otros tipos de cáncer, por ejemplo, como se describe aquí.

En otra realización adicional, los anticuerpos de la presente enseñanza se pueden administrar junto con radioterapia y/o trasplante de células madre periféricas autólogas o de médula ósea.

En otra realización más, los anticuerpos de la presente enseñanza se pueden administrar en combinación con uno o más anticuerpos seleccionados de anticuerpos anti-CD25, anticuerpos anti-EPCAM, anticuerpos anti-EGFR, anti-Her2/neu y anti-CD40.

- 5 En otra realización más, los anticuerpos de la presente enseñanza se pueden administrar en combinación con un anticuerpo anti-C3b(i) para mejorar la activación del complemento.

10 Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de 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, es decir, anticuerpo, molécula biespecífica y multiespecífica, se puede recubrir en un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

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

20 Los ejemplos de tales sales incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de base. Las sales de adición de ácido incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como ácido clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos alifáticos mono y dicarboxílicos, ácidos alcanóicos fenil sustituidos, 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.

30 Una composición de la presente enseñanza 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 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 usar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como acetato de vinil 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, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

40 Para administrar un compuesto de la invención 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 reguladoras acuosas. Los liposomas incluyen emulsiones de CGF de agua en aceite en agua, así como liposomas convencionales (Strejan et al. (1984) J. Neuroimmunol., 7:27).

45 Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones 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 la invención. Compuestos activos suplementarios también se pueden incorporar en las composiciones.

50 Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables en 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.

65 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.

En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los 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 liofilización (liofilización) que rinden un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente esterilizada filtrada del mismo.

Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (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 usa 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 la invención 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.

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.

Para las composiciones terapéuticas, las formulaciones de la presente enseñanza incluyen aquellas adecuadas para administración oral, nasal, tópica (que incluye 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 farmacéutica. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material de vehículo para producir una forma de dosificación unitaria variará dependiendo del sujeto que se está tratando, y del modo particular de administración. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material de vehículo para producir una forma de dosificación unitaria 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 que son adecuadas para administración vaginal también incluyen pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de atomización 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 invención 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, reguladores o propelentes que pueda ser necesarios.

Las expresiones "administración parenteral" y "administrada por vía parenteral" como se usan en la presente memoria significa modos de administración distintos a la administración enteral y tópica, habitualmente mediante inyección, e incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, epidural e intraesternal.

Ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas 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 recubrimiento, 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 fenol sórbico 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 la gelatina.

En una realización, los anticuerpos monoclonales de la invención se administran en forma cristalina mediante inyección subcutánea, consultar Yang et al. (2003) PNAS, 100 (12): 6934-6939. Cuando los compuestos de la presente invención 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 portador farmacéuticamente aceptable.

Independientemente de la vía de administración seleccionada, los compuestos descritos en la presente memoria, que se pueden usar en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas descritas aquí, se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables por métodos convencionales conocidos por aquellos expertos en la técnica.

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas se pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular, composición y modo de administración, sin ser tóxica para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares empleadas, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de eliminación 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, la condición, el estado general de salud y el historial médico previo del paciente que está siendo tratado, y factores similares bien conocidos en las artes 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 presente 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 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 invención se administre solo, es preferible administrar el compuesto como una formulación (composición) farmacéutica.

En una realización, los anticuerpos de la presente enseñanza se pueden administrar 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, tal 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 puede determinarse o ajustarse midiendo la cantidad de anticuerpos anti-GT468 monoclonales circulantes tras la administración en una muestra biológica usando anticuerpos anti-idiotípicos que se dirigen a los anticuerpos anti-GT468.

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.

En otra realización más, los anticuerpos de acuerdo con la presente 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.

Las composiciones terapéuticas se pueden administrar con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización preferida, una composición terapéutica puede administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tal como los dispositivos descritos en los documentos 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.

Ejemplos de implantes y módulos bien conocidos útiles en la presente invención incluyen los descritos en: el documento US 4.487.603, que describe una bomba de microinfusión implantable para dispensar medicamentos a una velocidad controlada; el documento US 4.486.194, que divulga un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; el documento US 4.447.233, que describe una bomba de infusión de medicación para suministrar medicación a una velocidad de infusión precisa; el documento US 4.447.224, que describe un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración continua de fármacos; el documento US 4.439.196, que describe un sistema de suministro osmótico de fármaco que tiene múltiples compartimentos de cámaras; y el documento US 4.475.196, que describe un sistema osmótico de administración de fármacos.

Muchos otros implantes, sistemas de suministro y módulos de este tipo son conocidos por los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, los anticuerpos descritos en este documento pueden formularse para asegurar la distribución apropiada in vivo. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BBB) excluye muchos compuestos

altamente hidrófilos. Para asegurar que los compuestos terapéuticos de la invención cruzan la BBB (si se desea), se pueden formular, por ejemplo, en liposomas. Para métodos de fabricación de liposomas, véase, por ejemplo, los documentos US 4.522.811; US 5.374.548; y US 5,399,331. Los liposomas pueden comprender uno o más restos 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 ejemplos de restos de direccionamiento incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, el documento US 5.416.016 de Low et al.); manósidos (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. Agents Chemother.*, 39: 180); y el receptor de proteína A surfactante (Briscoe et al. (1995) *Am. J. Physiol.* 1233: 134).

En una realización, los compuestos terapéuticos descritos en este documento 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.

En una realización adicional, los anticuerpos de la presente enseñanza 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)<sub>2</sub>'. Otras referencias se pueden hacer para "Cunningham-Rundles C, Zhuo Z, Griffith B, Keenan J. (1992) Biological activities of polyethylene-glycol immunoglobulin conjugates. Resistance to enzymatic degradation. *J. Immunol. Methods*, 152: 177-190; y a "Landor M. (1995) Maternal-fetal transfer of immunoglobulins, *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 74: 279-283.

Se puede medir una "dosificación terapéuticamente efectiva" para la terapia tumoral mediante 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%. El tiempo medio para la progresión es una medida que caracteriza la durabilidad de la respuesta tumoral objetiva.

También se puede medir una "dosificación terapéuticamente efectiva" para la terapia tumoral por su capacidad de estabilizar la progresión de la enfermedad. La capacidad de un compuesto para inhibir el cáncer se puede evaluar en un sistema de un 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 bien mejorar 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.

La composición debe ser estéril y fluida en la medida en que la composición se pueda suministrar mediante una jeringa. Además de agua, el vehículo puede ser una solución salina regulada 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.

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.

#### IV. Usos y métodos de la invención

Los anticuerpos (incluyendo inmunocombinados, biespecíficos/multiespecíficos, composiciones y otros derivados descritos en este documento) de la presente descripción 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 usa en este 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.

Un efecto terapéutico en los tratamientos discutidos aquí se logra preferiblemente a través de las propiedades funcionales de los anticuerpos de la invención para mediar en la destrucción de células, por ejemplo, induciendo lisis mediada por citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), lisis mediada por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), apoptosis, adhesión homotípica y/o fagocitosis, preferiblemente induciendo lisis mediada por CDC y/o lisis mediada por ADCC.

Por ejemplo, en una realización, los anticuerpos de la presente enseñanza se pueden usar para tratar 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 que incluye, 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, cáncer de próstata y cáncer de hígado. Estos cánceres pueden estar en etapas temprana, intermedia o avanzada, por ejemplo, metástasis.

Las composiciones farmacéuticas y los métodos de tratamiento descritos de acuerdo con la presente enseñanza también se pueden usar para inmunización o vacunación para evitar una enfermedad descrita en este documento.

En otra realización, los anticuerpos se pueden usar 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 pueden usarse para reducir o interactuar con la función de células que expresan GT468 y/o caracterizarse 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.

Los anticuerpos de la presente enseñanza pueden probarse inicialmente por su actividad de unión asociada con usos terapéuticos o de diagnóstico *in vitro*. Por ejemplo, los anticuerpos pueden analizarse usando ensayos de citometría de flujo como se describe en este documento.

Además, la actividad de los anticuerpos para desencadenar al menos una actividad de célula efectora mediada por efector, que incluye inhibir el crecimiento y/o destruir células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular, puede ser ensayada. 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.

Los anticuerpos de la presente enseñanza se pueden usar para obtener *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 superficie celular; matar una célula que expresa GT468 y/o que se caracteriza por asociación de GT468 con su superficie celular; mediar en la fagocitosis o ADCC de una célula que expresa GT468 y/o que se 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 del complemento; mediar la apoptosis de una célula que expresa GT468 y/o que se caracteriza por la asociación de GT468 con su superficie celular; inducir la adhesión homotípica; y/o inducir la translocación en balsas lipídicas al unirse a GT468.

En una realización particular, los anticuerpos se usan *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, cáncer de próstata y cáncer de hígado.

Las rutas adecuadas para administrar las composiciones de anticuerpos de la invención *in vivo* e *in vitro* son bien conocidas en la técnica y pueden ser seleccionadas por aquellos expertos en la materia.

Como se describió anteriormente, los anticuerpos anti-GT468 de la presente enseñanza se pueden coadministrar con uno u otros agentes terapéuticos adicionales, 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. El anticuerpo se puede unir al agente (como un inmunocomplejo) o se puede administrar separado del agente. En el 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 coadministración de los anticuerpos anti-GT468 de la presente enseñanza con agentes quimioterapéuticos proporciona dos agentes anticancerígenos que operan 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 las volvería no reactivas con el anticuerpo.

5 En otra realización particular, el sujeto al que se le 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 a granel.

10 En otra realización particular, el sujeto al que se le 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.

15 Las células efectoras específicas del objetivo, por ejemplo, células efectoras enlazadas a composiciones (por ejemplo, anticuerpos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la presente enseñanza también pueden usarse como agentes terapéuticos. Las células efectoras para direccionamiento pueden ser leucocitos humanos tales como macrófagos, neutrófilos o monocitos. Otras células incluyen eosinófilos, células asesinas naturales y otras células portadoras de receptores de IgG o IgA. Si se desea, pueden obtenerse células efectoras del sujeto a tratar. Las  
20 células efectoras específicas del objetivo se pueden administrar como una suspensión de células en una solución fisiológicamente aceptable. El número de células administradas puede estar en el 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 que se caracteriza por asociación de GT468 con su superficie celular, y efectuar la muerte celular mediante, por ejemplo, fagocitosis. Las rutas de administración  
25 también pueden variar.

La terapia con células efectoras específicas del objetivo puede realizarse junto con otras técnicas para la eliminación de células objetivo. Por ejemplo, la terapia antitumoral que usa las composiciones de la invención y/o las células efectoras armadas con estas composiciones se puede usar junto con quimioterapia. Además, la inmunoterapia  
30 combinada se puede usar 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 pueden usarse junto con agentes de unión específicos de receptor de IgG o IgA.

Las moléculas biespecíficas y multiespecíficas descritas en la presente memoria también se pueden usar para modular niveles de Fc-gammaR o Fc-alfaR en células efectoras, tales como mediante cubrimiento y eliminación de  
35 receptores sobre la superficie celular. Las mezclas de receptores anti-Fc también se pueden usar para este propósito.

Las composiciones (por ejemplo, anticuerpos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas e inmunoconjugados) de la  
40 presente enseñanza que tienen sitios de unión al complemento, tales como porciones de IgG1, IgG 2, IgG3 o IgM que se unen al complemento, también se pueden usar en presencia del complemento. En una realización, el tratamiento *ex vivo* de una población de células que comprende células objetivo con un agente de unión de la presente enseñanza y células efectoras apropiadas se puede complementar mediante la adición del complemento o de suero que contiene complemento. La fagocitosis de las células objetivo recubiertas con un agente de unión de la  
45 presente enseñanza se puede mejorar mediante la unión de las proteínas del complemento. En otra realización, las células objetivo recubiertas con las composiciones también pueden lisarse por el complemento. En otra realización más, las composiciones de la enseñanza no activan el complemento.

Las composiciones de la presente enseñanza también pueden administrarse junto con el complemento. Por  
50 consiguiente, la enseñanza abarca 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.

Alternativamente, los anticuerpos, moléculas multiespecíficas o biespecíficas y el complemento o suero pueden  
55 administrarse por separado. La unión de las composiciones de la presente enseñanza 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.

También están dentro del alcance de la presente enseñanza kits que comprenden las composiciones de anticuerpos  
60 descritas en este documento (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 invención (por ejemplo, un anticuerpo que tiene una actividad complementaria).

65

De acuerdo con esto, los pacientes tratados con composiciones de anticuerpos de la invención se les puede administrar adicionalmente (antes, simultáneamente o después de la administración de un anticuerpo de la invención) otro agente terapéutico, tal como un agente citotóxico o radiotóxico, que mejora o aumenta el efecto terapéutico de los anticuerpos de la presente enseñanza.

5 En otras realizaciones, el sujeto puede tratarse adicionalmente con un agente que modula, por ejemplo, mejora 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  
10 estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) y factor de necrosis tumoral (TNF). Otros agentes importantes para aumentar la eficacia terapéutica de los anticuerpos y composiciones farmacéuticas descritos en la presente memoria son  $\beta$ -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 usar fragmentos de  $\beta$ -glucanos producidos por organismos. Preferiblemente, el  $\beta$ -glucano es un polímero de  $\beta(1,3)$  glucosa en el que al menos algunas de las unidades de  
15 glucosa de la cadena principal, por ejemplo, 3-6% de las unidades de glucosa de la cadena principal, poseen ramificaciones tales como ramificaciones  $\beta(1,6)$ .

En una realización particular, la enseñanza proporciona 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  
20 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 del mismo y GT468. Entonces se detecta la formación de un complejo, en el que una diferencia en la formación del complejo entre la muestra comparada con la muestra de control es indicativa de la presencia del antígeno GT468 en la muestra.

En aún otra realización, la enseñanza proporciona un método para detectar la presencia o cuantificación de la cantidad de células que expresan GT468 y/o que se caracteriza por la asociación de GT468 con su superficie celular  
25 in vivo o in vitro. El método comprende (i) administrar a un sujeto una composición de la invención 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  
30 superficie celular.

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 cancerosas. Preferiblemente, una cantidad de GT468 en una muestra que es mayor que la cantidad de GT468 en una muestra  
35 de control es indicativa de la presencia de una enfermedad relacionada con GT468 en un sujeto, en particular un ser humano, del que se deriva la muestra.

En aún otra realización, los inmunoconjugados de la invención pueden usarse para dirigir compuestos (por ejemplo, agentes terapéuticos, marcadores, citotoxinas, inmunosupresores de radiotoxinas, etc.) a células que tienen GT468  
40 asociado con su superficie uniendo tales compuestos al anticuerpo. Por lo tanto, la enseñanza también proporciona métodos para localizar células ex vivo o in vitro que expresan GT468 y/o que se caracterizan por asociación de GT468 con su superficie celular, tales como células tumorales circulantes.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no se deben considerar como  
45 limitantes del alcance de la invención.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1: Materiales y métodos

50 Las técnicas y métodos mencionados en este documento se llevan a cabo en una forma ya 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, NY, 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.

55 Tejidos y líneas celulares

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  
60 procedimientos terapéuticos y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y BT549 se cultivaron en DMEM 10% de FCS.

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

65 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. & 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', hibridación a 60°C) en un RT-PCR de 35 ciclos. El análisis de expresión cuantitativa en tiempo real se realizó por triplicado en un RT-PCR de 40 ciclos. Después de normalización con HPRT (sentido 5'-TGA CAC TGG CAA AAC GCA-3', antisentido 5'-GGT CCT TTT CAC CAG CAA GCT-3', hibridación a 62°C) se cuantificaron transcritos de GT468 en muestras de tumor en relación con tejidos normales utilizando el cálculo de  $\Delta\Delta CT$ . La especificidad de las reacciones de PCR se confirmó mediante clonación y secuenciación de productos de amplificación a partir de muestras seleccionadas arbitrariamente.

## 10 Bioinformática

Para la clonación in silico de moléculas específicas de trofoblasto, se modificó y adaptó una estrategia de extracción de datos descrita en detalle en otra parte (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, HA, Brunner, J., Seitz, G., Nestlé, FO, 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 bibliotecas de ADNc.

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 usando 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 electrónico se realizó una transferencia Northern (eNorthern) para todos los clones obtenidos mediante búsqueda de palabras clave mediante búsqueda por BLAST de cada secuencia de ADN de interés contra una base de datos EST en NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Se tomó en consideración que varias bibliotecas de ADNc en el dominio público no están anotadas adecuadamente (Scheurle, D., DeYoung, MP, Binninger, DM, Page, H., Jahanzeb, M. & Narayanan, R. (2000) *Cancer Res.* 60, 4037-4043).

[0269] Para la sustracción digital, se utilizó la herramienta xProfiler de ADNc 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 bibliotecas de ADNc donde cada grupo puede ser una sola biblioteca o varias bibliotecas. Las opciones de búsqueda para el Grupo A y el Grupo B se fijaron como "Homo sapiens" por Organismo y "todas las bibliotecas EST" para que Library Group busque todas las bibliotecas de ADNc en dbEST. Todas las bibliotecas 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 bibliotecas de tejidos mixtos. Para el grupo B, se seleccionaron todas las bibliotecas 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 de 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, DT, 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 (Garnier, J., Osguthorpe, DJ & Robson, B. (1978) *J. Mol. Biol.* 120, 97-120).

## 45 Antisueros, inmunofluorescencia e inmunoquímica

El antisuero policlonal generado 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 regulador de muestra de reducción (Roth, Karlsruhe, Alemania), se sometieron a SDS-PAGE y posteriormente se electrotransferieron a una 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-Actina (Abcam, Cambridge, Reino Unido) seguido por detección del anticuerpo primario con anticuerpos secundarios anti-ratón de cabra y anti-conejo de cabra conjugados con peroxidasa de rábano picante (Dako, Glostrup, Dinamarca).

## Dúplex ARNpi

El dúplex de ARNpi de GT468 (Qiagen, Hilden, Alemania) (5'-r(GCA CGA UGA UAG CCA GCA) dTdT-3' sentido, 5'-r(UUG CUG GCU ACU CUC AUG G)dAdG-3' antisentido) nucleótidos dirigidos 670-690 de la secuencia de ARNm de GT468 (NM\_021796.3). Como control se usó un dúplex de ARNpi codificado (5'-r(UAA CUG UAU AAU CGA CUA G) dTdT-5' sentido, 5'-r(CUA GUC GAU UAU ACA GUU A)dGdA-3' antisentido). Para los estudios de silenciamiento de GT468 se transfectaron células con dúplex de ARNpi 10 nM usando un reactivo de transfección HiPerFect (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Todos los resultados se reprodujeron con un segundo conjunto de

dúplex de ARNpi de GT468 (5'-r(GGU UCA GGA CAA AGU CCA A)dTdT-3' sentido, 5'-r(UUG GAC UUU GUC CUG AAC C) dGdG-3' antisentido) dirigidos a los nucleótidos 342-362.

Análisis de proliferación celular después de la transfección de ARNpi

24 horas después de la transfección con dúplex de ARNpi, se cultivaron  $1 \times 10^4$  células durante 48 h en medio suplementado con 10% de FCS. La proliferación se analizó midiendo la incorporación de BrdU en hebras de ADN recién sintetizadas usando el kit de proliferación celular DELFIA (Perkin Elmer, Boston, MA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante en un contador de múltiples etiquetas Wallac Victor<sup>2</sup> (Perkin Elmer, Boston, MA).

Análisis del ciclo celular

Las células se cultivaron en medio suplementado con 10% de FCS en concentraciones variables. 72 h después de la transfección con las células dúplex de ARNpi, se recogieron, se fijaron con EtOH, y se tiñeron con yoduro de propidio antes del análisis del contenido de ADN por citometría de flujo. Las células en las diferentes fases del ciclo celular se cuantificaron utilizando CellQuest<sup>MR</sup> Pro (BD, Franklin Lakes, NJ) y un software de análisis de citometría de flujo FlowJo<sup>MR</sup> (Tree Star, Ashland, OR). Las células apoptóticas se cuantificaron mediante tinción con AnexinaV 48 horas y 72 horas después de la transfección de ARNpi.

Migración celular y ensayo de invasión *in vitro*

Se llevaron a cabo ensayos de migración celular en cámaras entre pozos con membranas de 8,0  $\mu\text{m}$  de poro (BD Biosciences, San José, CA) con células cultivadas en medio sin suero durante 12 h antes de los experimentos. Para los experimentos de ARNpi, las células se transfirieron a condiciones libres de suero 24 h después de la transfección con dúplex de ARNpi como se describió anteriormente. Se añadieron  $4 \times 10^4$  células en 400  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo sin suero a la cámara superior. Las cámaras inferiores contenían 800  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo suplementado con 5% de FCS como quimioatrayente. 24 horas 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 (aumento de 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 tanto a la cámara superior como inferior. Para ensayos de invasión *in vitro*, las cámaras superiores se prepararon con 100  $\mu\text{L}$  de Matrigel (BD Biosciences, San José, NJ) diluida a 1 mg/mL en medio exento de suero. Las cámaras se incubaron a 37°C durante 5 h para gelificación.

Análisis de proliferación celular después de la incubación con anticuerpos

Las líneas celulares de cáncer que expresan GT468 en forma endógena, 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 usando el kit de proliferación celular DELFIA (Perkin Elmer) de acuerdo con las instrucciones del fabricante en un contador de múltiples etiquetas Wallac Victor<sup>2</sup> (Perkin Elmer).

Alternativamente, las líneas celulares de cáncer que expresan GT468 en forma endógena, 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 las indicadas. La proliferación se analizó como se describió anteriormente.

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 utilizó el análisis por microscopía de inmunofluorescencia. Las células CHO transfectadas con GT468-eGFP se cultivaron en portaobjetos de cámara en condiciones de cultivo estándar en medio DMEM/F12, suplementado con 10% de suero de ternera fetal (FCS), de L-glutamina 2 mM, 100 UI/mL de penicilina y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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 anticuerpo secundario anti-IgG de ratón marcado con Alexa555 (Molecular Probes) en las mismas condiciones.

ELISA específico del péptido GT468

Se recubrieron placas (Nunc) durante una hora a 37°C con el péptido GT468 relevante (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). El bloqueo se realizó con PBS 3% BSA durante la noche a 4°C. Después de lavar tres veces con PBS, las placas se cargaron con sobrenadantes de hibridoma (diluidos 1:5 o 1:10 en PBS 3% BSA, 50  $\mu\text{L}$  por pozo) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente (agitación orbital a 90 rpm). Se añadió anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón de cabra conjugado con HRPO, Jackson Immunoresearch) en PBS 3% BSA después de lavar tres veces con PBS, y se

incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación orbital a 90 rpm. Después de una etapa de lavado final (tres veces con PBS), se añadió una solución de sustrato que consistía en ABTS 1,5 mM en acetato de sodio 100 mM (pH 5,2). Inmediatamente antes del uso, la solución de sustrato se suplementó con 0,3  $\mu$ L por mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%. La absorción se midió a 405 nm en un lector de placas Tecan Safire (Tecan) después de 30-60 minutos.

5 Inmunizaciones

En la producción de los clones depositados bajo el no. de acceso. DSM ACC2822 (4E9-1H9), DSM ACC2826 (9B6-2A9), DSM ACC2824 (59D6-2F2), DSM ACC2825 (61C11-2B5), DSM ACC2823 (78H11-1H6), se inmunizaron Balb/c o C57/BL6 con péptidos acoplados a KLH. Se inyectaron intraperitonealmente (ip) 50  $\mu$ g de péptidos con 50  $\mu$ l de Montanide ISA 50V como adyuvante los días 1, 15, 45 y 86. Se controló la presencia de anticuerpos dirigidos contra GT468 en sueros de ratones mediante ELISA específica de péptido los días 24, 57 y 92.

15 Se reforzaron los ratones con respuestas inmunes detectables tres días antes de la esplenectomía para la generación de anticuerpos monoclonales.

En todos los demás casos, se inmunizaron ratones Balb/c o C57/BL6 con plásmido GT468 pcDNA3.1 con PEI Manosa como adyuvante por vía intramuscular (i.m.) en los días 1 y 15. Posteriormente, se inyectaron 50  $\mu$ g de péptidos con 50  $\mu$ l de Montanide ISA 50V como adyuvante (intraperitonealmente) o 150  $\mu$ g de proteína con adyuvante de Freund incompleto (IFA) (subcutáneamente) los días 30 y 45. Se controló la presencia de anticuerpos dirigidos contra GT468 en sueros de ratones por ELISA específico de péptido o CrELISA. Los ratones con respuestas inmunes detectables se reforzaron tres días antes de la esplenectomía para la generación de anticuerpos monoclonales.

25 Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos para GT468

Se aislaron esplenocitos de ratón y se fusionaron con PEG a una línea de células de mieloma de ratón con base en protocolos estándar. Los hibridomas resultantes, se cribaron a continuación para la producción de inmunoglobulinas con especificidad por GT468 usando ELISA específico de péptido, CrELISA de GT468 y células CHO transfectadas con GT468-eGFP por IF.

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) en una relación 2: 1 usando 50% de PEG (Roche Diagnostics, CRL 738641). Las células se sembraron en placa a razón de aproximadamente  $3 \times 10^4$ /pozo en placas de microtitulación de fondo plano, seguido de una incubación de aproximadamente dos semanas en medio selectivo que contenía 10% de suero bovino fetal, 2% de fusión de hibridoma y suplemento de clonación (HFCS, Roche Diagnostics, CRL 1 363 735) más HEPES 10 mM, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, 50  $\mu$ g/mL de gentamicina y 1x HAT (Sigma, CRL H0262). Después de 10 a 14 días, los pozos individuales se clivaron mediante ELISA específico de péptido para anticuerpos monoclonales anti-GT468. Los hibridomas que secretan anticuerpos se sembraron nuevamente en placa, se cribaron de nuevo y, si eran aún positivos para anticuerpos monoclonales anti-GT468, se subclonaron mediante dilución limitante. Los subclones estables se cultivaron luego in vitro para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en el medio de cultivo tisular para caracterización. Se eligió al menos un clon de cada hibridoma, que retuvo la reactividad de las células progenitoras (por ELISA e IF).

45 Isotipificación

Para la isotipificación de sobrenadantes de hibridoma, se usó el kit de isotipificación de anticuerpos monoclonales de ratón IsoStrip (Roche, Cat. No. 1493027) como lo describe el fabricante.

50 Procedimiento CrELISA utilizando lisados crudos de lisados bacterianos que expresan GT468

• Preparación del antígeno

Las bacterias XLOLR de *E. coli* se transformaron con el plásmido pQE GT468 o pQE sin inserción (se denominará "referencia") y se cultivaron en medio LB hasta A600 nm ~ 0,35 E. La expresión de la proteína se indujo con IPTG 2 mM., y las 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 en 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 clorhidrato de AEBSF (AppliChem). Las células se colocaron en hielo y se rompieron mediante sonicación (Branson Sonic Power A Smithkline). Se diluyeron GT468 y los lisados de referencia 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.

• Conducción del ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas

Antes de su uso, GT468, así como los lisados de referencia, se diluyeron en regulador de recubrimiento (HEPES 100 mM, pH 7,2), luego se transfirieron a placas de micropozos F96 Maxisorp de fondo plano (50 µL/pozo, Nunc) y se adsorbieron durante 2 horas a 37°C.

Después de inmovilización del antígeno, se lavaron las placas dos veces con regulador de lavado (Tris 50 mM, cloruro de sodio 150 mM, pH 7,2) que contenía 0,1% de Tween 20, y posteriormente dos veces sin detergente. Se añadieron 50 microlitros de sueros humanos 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.

Cada muestra de suero individual se analizó 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 hora 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 hexahidrato de sal disódica de 4-nitrofenil fosfato (Merck) por mL de regulador de ALP (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania)] durante 30 min a temperatura ambiente, y se leyeron los valores de absorbancia inmediatamente a 405 nm en un lector de microplacas (Victor2 Wallac, Perkin-Elmer, Turku, Finlandia).

Análisis de citometría de flujo

Se recogieron células HEK293 transfectadas con plásmido pcDNA3.1 GT468 o plásmido sin inserción (simulado), se fijaron con metanol helado y se bloquearon con PBS/10% de FCS durante 30 min. Las células se incubaron con sobrenadante de hibridoma durante 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).

Transferencias Western

Se prepararon lisados de células completas HEK293 transfectadas con el plásmido GT468 pcDNA3.1 o plásmido sin insertos (simulado) usando regulador de lisis a base de Triton-X (HEPES 50 mM (pH 7,4), 10% (v/v) de glicerol, Triton X-100 al 1% (v/v), NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, EDTA 5 mM, NaF 100 mM). Los extractos se diluyeron en regulador de muestra de reducción (Roth), se sometieron a SDS-PAGE y posteriormente se electrotransfirieron sobre membrana de PVDF (Pall). La inmunotinción se realizó con un anticuerpo policlonal reactivo a GT468 (Koslowski et al., 2007) seguido de detección de anticuerpo primario con anticuerpos secundarios anti-conejo de cabra conjugados con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch Laboratories).

Ejemplo 2: GT468 se activa en forma aberrante y se expresa altamente en diferentes tumores

Para identificar genes trofoblásticos específicos de la placenta, se adaptó una estrategia de extracción de datos de todo el genoma, que se había desarrollado originalmente para 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, HA, Brunner, J., Seitz, G., Nestlé, FO, 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 de palabras clave jerárquica de GenBank se combinó con la sustracción digital de bibliotecas de ADNc para la predicción de genes auténticamente específicos de la placenta. GT468 se identificó mediante este enfoque.

Se investigó el ARNm de GT468 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 (Figuras 1A, B, C, Tabla 1). La única excepción es el testículo, aunque con niveles de transcripción de 3 a 4 registros inferiores a los observados en la placenta.

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

Tejidos normales	Expresión de GT468
Testículo	2/3
Placenta	3/3
Cerebro	0/3
Pulmón	0/3
Mama	0/3
Colon	0/3
Hígado	0/3
Estómago	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
PBMC en reposo	0/3
PBMC en proliferación	1/6
Intestino delgado	0/3
Timo	0/2
Glándula suprarrenal	0/2
<b>Tejidos cancerosos</b>	
Cáncer de mama	44/62
Cáncer de pulmón	21/50
Cáncer gástrico	18/31
Cáncer de ovario	2/9
Carcinoma hepatocelular	1/5
Líneas celulares cancerosas	22/40

En 38% (86/225) de las muestras de tumores primarios a través de diferentes tipos de cáncer y 55% (22/40) de líneas celulares tumorales, sin embargo, se encontró activación aberrante de este gen con una transcripción estrechamente controlada. Los niveles de prevalencia y transcripción de GT468 fueron más altos en cáncer de mama y en líneas celulares de 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 al menos 100 veces por encima del fondo en tejidos normales no trofoblásticos), con un 24% (15/62) que muestra baja expresión (100-1.000 veces), 40% (25/62) que muestra una expresión moderada (1.000-10.000 veces) y 17% (11/62) que muestra alta expresión (> 10.000 veces) (Fig. 1B). Además, se encontró 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.

### 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 (anti-GT468 /terminal C de conejo) contra un epítipo peptídico específico de GT468 (aa 117-127 de la SEQ ID NO: 2). La especificidad del anticuerpo se verificó por silenciamiento génico de GT468 usando ARN pequeño de interferencia (ARNpi). Para excluir ARNpi fuera de rango se llevaron a cabo experimentos de actividad con dos conjuntos de dúplex de ARNpi específicos de GT468, un oligonucleótido no silenciado codificado y células no transfectadas. Transfectando las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y BT-549 con estos dúplex de ARNpi, se logró una reducción estable y reproducible de la expresión constitutiva de ARNm de GT468 en un 80-90% en comparación con los controles (Fig. 1D). De acuerdo con esta observación, la banda de 26 kDa, detectada de acuerdo con el tamaño predicho de GT468 en una transferencia Western, desapareció casi por completo en ambas líneas celulares (Fig. 1E), demostrando tanto una fuerte desactivación de la expresión de la proteína GT468 como de especificidad del anticuerpo.

La tinción de la transferencia Western de la proteína GT468 en muestras de tejido humano primario con anti-GT468 /terminal C confirmó que este gen es detectable en muestras de cáncer de mama en niveles comparables a la placenta en la que sólo se expresa tejido normal (Fig. 1F). La inmunohistoquímica con anti-GT468/terminal C en secciones de tumor de mama humano mostró inmunoreactividad específica en muestras tipificadas positivas para la expresión de ARNm de GT468 por 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 coincidentes del paciente 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.

En 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 gran dominio extracelular constituido por aa 23 a 212. Los aminoácidos 29 a 119 de la parte extracelular de GT468 representan un dominio de zona pelúcida (ZP) truncada. El dominio ZP se encuentra en una variedad de proteínas similares a receptores expuestas extracelularmente, que incluyen al receptor TGF-beta tipo III, uromodulina, glicoproteína GP2, así como los receptores de esperma ZP2 y ZP3 (Bork, P. y Sander, C. (1992) FEBS Lett. 300, 237-240) y está implicado en la polimerización (Jovine, L., Janssen, WG, Litscher, ES & Wassarman, PM (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 /terminal C de conejo, que tiene su epítipo (aa 117 a 127) en la parte supuestamente extracelular de la proteína. Ambas líneas celulares mostraron distintas tinciones en la membrana celular (Fig. 2A). La pérdida de señal tras la

desactivación inducida por ARNpi de la expresión de GT468 confirmó la especificidad de la tinción. Lo que es más importante, se observó tinción específica de la membrana no solo en células nativas fijadas en metanol sino también no fijadas (Fig. 2B) que implica que el epítipo del anticuerpo es accesible sin permeabilización de la membrana celular y apoya la topología pronosticada con localización extracelular del extremo carboxilo.

Ejemplo 4: Silenciamiento génico inducido por ARNpi 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 ARNpi en funciones celulares esenciales.

Primero, se investigó el rendimiento de las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y BT-549 en ensayos de migración entre pozos. La motilidad basal (quimioquinesis) de ambas líneas celulares evaluada mediante la adición de 5% de FCS como quimioatrayente tanto a la cámara superior como a la inferior del sistema se inhibió sustancialmente por los dúplex de ARNpi específicos de GT468 (Fig. 3A). En consecuencia, también se observó 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 ARNpi 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 incorporación de BrdU en el ADN se redujo en 80-90% en ambas líneas celulares mediante dúplex de ARNpi específicos de GT468 (Fig. 4A). El análisis del ciclo celular reveló una detención G1/S distinta en las células transfectadas con ARNpi de GT468 como la causa subyacente del bloqueo de proliferación (Fig. 4B). La vitalidad de las células no se vio afectada y la tinción de Anexin V no dio indicaciones de muerte celular apoptótica (Fig. 4C).

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

Se midió la proliferación de células MCF-7 y BT-549 incubadas con anti-GT468/terminal C de conejo 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 ARNpi 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 quinasas dependientes de ciclina D y E (Morgan, DO (1997) Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 13, 261 - 291; Sherr, CJ (2000) Cancer Res. 60, 3689 - 3695). Para investigar si el silenciamiento de GT468 induce la desregulación observada del ciclo celular a través de la alteración de la expresión de ciclina, se determinó la expresión de ciclinas D1, D2, D3 y ciclina E en células de cáncer de mama MCF-7 y BT-549 tratadas con ARNpi de GT468.

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

Se sabe que la ciclina D1 es un regulador principal 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, CE, Daly, RJ, Sutherland, RL & Musgrove, EA (2006) J. Cell Biochem. 97, 261-274; Sutherland, RL & Musgrove, EA (2004) J. Mammary. Gland. 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 tipo D actúan como sensores del factor de crecimiento, formando quinasas activas en respuesta a factores extracelulares (Sutherland, RL y Musgrove, EA (2004) J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia. 9, 95-104; Sherr, CJ (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, RL y Musgrove, EA (2004) J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia., 9, 95-104; D'Amico, M., Hult, J., Amanatullah, DF, Zafonte, BT, Albanese, C., Bouzahzah, B., Fu, M., Augenlicht, LH, Donehower, LA, Takemaru, K. et al. (2000) J. Biol. Chem. 275, 32649-32657; Muise-Helmericks, RC, Grimes, HL, Bellacosa, A., Malstrom, SE, Tsichlis, PN y Rosen, N. (1998) J. Biol. Chem. 273, 29864-29882). 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, RL y Musgrove, EA (2004) J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia. 9, 95-104, Diehl, JA, Cheng, M., Roussel, MF y Sherr, CJ (1998) Genes Dev. 12, 3499-3511; Radu, A., Neubauer, V., Akagi, T., Hanafusa, H. y Georgescu, MM (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, RL y Musgrove, EA (2004) J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia. 9, 95-104, Cantley,

LC (2002) Science 296, 1655- 1657; Luo, J., Manning, BD y Cantley, LC (2003) Cancer Cell 4, 257-262), otras dos funciones celulares en las que aparentemente está implicada GT468. Esto nos lleva a analizar si GT468 tiene un impacto en la regulación de AKT quinasa en células MCF-7 y BT-549.

5 La fosforilación constitutiva y la hiperactivación de AKT consecutivas a la sobreactivación de PI3K se observan con frecuencia en células tumorales. La cuantificación de los niveles de fosforilación de Ser473 de AKT (pAKT) posterior al silenciamiento de GT468 por tecnología de ARNpi y su antagonización funcional con anticuerpo anti-GT468/terminal C resultaron ambos en una marcada reducción de los niveles de pAKT en particular en células MCF-7 (Fig. 6C), lo que sugiere que la activación de la AKT quinasa está involucrada en la ejecución de los efectos descendentes de GT468. Curiosamente, la subregulación 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

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

20 Se realizó un ELISA específico de péptido para asegurar la unión específica de los anticuerpos monoclonales. Los sobrenadantes de hibridoma se ensayaron en dilución 1:5 o 1:10 contra el péptido respectivo utilizado para la inmunización 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 usado para la inmunización de ratones (Fig. 7).

30 Se analizó la unión específica de los anticuerpos monoclonales a la proteína GT468 de longitud completa 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 la tinción solo de las células transfectadas con GT468-eGFP mientras que las células no transfectadas fueron negativas (Fig. 8).

35 Para analizar el impacto de los anticuerpos monoclonales que se unen a GT468 sobre la proliferación de células cancerosas, las líneas celulares de cáncer que expresan GT468 endógenamente BT-549, Caov-3, EFO-21, MCF-7 y MDA-MB-231 se incubaron con sobrenadantes de hibridoma (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).

40 Por lo tanto, se demostró que pueden producirse anticuerpos monoclonales que se dirigen selectivamente a GT468 expresada 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 pcDNA3.1 GT468 seguido de inyección de péptido/proteína

45 La inmunización intramuscular doble usando ADN de GT468 seguido de administración subcutánea doble de la proteína recombinante GT468 dio como resultado hibridomas 22-1A-1, 22-2A-1, 22-9B-1, 23-33A-1 y 23-19A-1. La inmunización intramuscular doble usando 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 usando 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. La siguiente tabla enumera los anticuerpos obtenidos y sus isotipos.

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

Hibridoma	Isotipo
22-1A-1	IgG2b
22-2A-1	IgG2b
22-9B-1	IgG2a
23-33A-1	IgG1
23-19A-1	IgG1
F11#33F7D12	IgG1
4A12 2D4 1A10	IgG1
4E9 1D12 2D4	IgG3

Se realizó un lisado crudo (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 específico de GT468 (Fig. 10A).

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, se probaron los sobrenadantes de hibridoma contra un péptido irrelevante. Los anticuerpos monoclonales reaccionaron específicamente solo con el péptido respectivo usado para la inmunización de ratones (Fig. 10 B).

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 por citometría de flujo del anticuerpo monoclonal 4E9 1D12 2D4 se usaron células HEK transitoriamente transfectadas con una tasa de transfección de aprox. 40%. Todos los sobrenadantes de hibridoma mostraron tinción específica de células transfectadas con GT468, mientras que no se observó tinción en células transfectadas de manera simulada (Fig. 11).

La unión específica de los anticuerpos monoclonales a la proteína GT468 de longitud completa se analizó mediante transferencia Western. Todos los sobrenadantes de hibridoma mostraron reactividad específica con lisados de células HEK293 transfectadas con plásmido de expresión pcDNA3.1 GT468, mientras que los lisados de células transfectadas simuladas no mostraron señal (Fig. 12; la señal débil del sobrenadante de hibridoma 23-33A-1 en el lisado simulado es cree que es el resultado del excedente del lisado de GT468 de HEK).

Se realizó un ELISA de péptido 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 solapantes (15 mer) 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 solapantes que implican reactividad con 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.

Para analizar el impacto de los anticuerpos monoclonales que se unen a GT468 sobre la proliferación de células cancerosas, se incubaron líneas celulares de cáncer SK-BR-3 (4A12 2D4 1A10) o MCF-7 (4E9 1D12 2D4) que expresan endógenamente GT468 con sobrenadantes de hibridoma purificados durante 72 h o 120 h a 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).

Listado de secuencias

<110> Ganymed Pharmaceuticals AG et al.

<120> ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA TRATAMIENTO DE CÁNCER

<130> 342-35PCT

<150> EP07005258.4

<151> 2007-03-14

<150> US60/894.860

<151> 2007-03-14

<160> 79

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 1126

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 664 571 T3

```

atatatcaga ccatcagaag gatttgtata aagagtgact ctctatgaa ggtaaaggcc      60
accctcttc agttccagt actgagatac atttttcca tcctgggggc aaatacagac      120
acagcaagtt ccttctccc tttggaaatt tggcagctgc cttcaccagt gagcacaag      180
ccacatttca aaggaaactg acaaattatc cccagctgcc agaagaaga 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 ttcatgaact aacttgggc ctgggttgcc ccccaaacca      480
tgttcagcca cacgcctacc 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 atatagtgtg caaatgtctg acaataaagt gctcttgtga cctcatgtg     1020
agcacttttg agaaagagaa acctatagca acttcatgaa ttaagccttt ttctatattt     1080
ttatattcat gtgtaaacaa aaaataaaat aaaattctga tcgcat                       1126

```

5 <210> 2  
 <211> 212  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 2

ES 2 664 571 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  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido para Inmunización

<400> 3

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





## ES 2 664 571 T3

<400> 14  
uuggacuuug uccugaaccg g 21

5 <210> 15  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 15  
aaatttgca gctgcctca c 21

15 <210> 16  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 16  
25 tgatgccaca ttcagtaaca c 21

<210> 17  
<211> 326  
<212> PRT  
30 <213> Artificial

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Traducción del producto PCR

35 <400> 17

ES 2 664 571 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 2 664 571 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  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Traducción del producto PCR

10

<400> 18

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

15 <210> 19  
 <211> 324  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: producto PCR

<400> 19

ES 2 664 571 T3

```

cgtacggtgg ctgcaccatc tgtcttcac tccccgcat ctgatgagca gttgaaatct 60
ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aactttctatc ccagagaggc caaagtacag 120
tggaaggtgg ataacgcctt ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag 300
agcttcaaca ggggagagtg ttag 324

```

5 <210> 20  
 <211> 981  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: producto PCR  
 <400> 20

```

ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc 60
ctgggctgcc tggcaagga ctacttcccc gaaccggtga cgggtgctgt gaactcaggc 120
gccctgacca gggcggtgca caccttcccc gctgtcttac agtcctcagg actctactcc 180
ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac 240
gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagaaag ttgagccaa atcttgtgac 300
aaaactcaca catgcccacc gtgccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc 360
ctcttcccc caaaaccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc 420
gtgggtggtg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 480
gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 540
gtggctagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 600
aaggctctca acaaagccct cccagcccc atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg 660
cagccccgag aaccacagg gtacaccctg cccccatccc gggatgagct gaccaagaac 720
caggtcagcc tgacctgctt ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 780
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 840
ggctccttct tcctctatag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 900
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacagca gaagagcctc 960
tcctgtctc cgggtaaatg a 981

```

15 <210> 21  
 <211> 324  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ácido nucleico de codón optimizado  
 <400> 21

ES 2 664 571 T3

```

cgtacggtgg ccgctcccag cgtgttcac tccccccca gcgacgagca gctgaagtcc      60
ggcaccgcca gcgtggtgtg cctgctgaac aacttctacc cccgggagge caaggtgcag      120
tggaaggtgg acaacgccct gcagagcggc aacagccagg agagcgtcac cgagcaggac      180
agcaaggact ccacctacag cctgagcagc accctgacce tgagcaagge cgactacgag      240
aagcacaagg tgtacgctg cgaggtgacc caccagggcc tgtccagccc cgtgaccaag      300
agcttcaaca ggggcgagtg ctag                                             324

```

5 <210> 22  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: proteína de codón optimizado

<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
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

```

15 <210> 23  
 <211> 981  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ácido nucleico de codón optimizado

<400> 23

ES 2 664 571 T3

```

ggcccaagcg tgttccccct ggcccccagc agcaagagca ccagcggcgg cacagccgcc      60
ctgggctgcc tggggaagga ctacttcccc gagcccgtga ccgtgagctg gaacagcggg      120
gccctgacct cgggcgtgca caccttcccc gccgtgctgc agagcagcgg cctgtacagc      180
ctgagcagcg tggtgaccgt gcccagcagc agcctgggca cccagaccta catctgcaac      240
gtgaaccaca agcccagcaa caccaagggt gacaagagag tggagcccaa gagctgcgac      300
aagaccaca cctgcccccc ctgcccagcc 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 gcgacatgc cgtggagtgg      780
gagagcaacg gccagccga gaacaactac aagaccacc cccagtgct ggacagcgac      840
ggcagcttct tcctgtacag caagctgacc gtggacaagt ccaggtggca gcagggcaac      900
gtgttcagct gcagcgtgat gcacgaggcc ctgcacaacc actacacca gaagtcctg      960
agcctgagcc cggcaagta g                                          981

```

<210> 24  
 <211> 326  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: proteína de codón optimizado

10

<400> 24

```

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 2 664 571 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  
<213> Artificial

5

# ES 2 664 571 T3

```

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

<400> 25
5  tgacactggc aaaacaatgc a      21

<210> 26
<211> 21
<212> ADN
10 <213> Artificial

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

15 <400> 26
    ggtccttttc accagcaagc t      21

<210> 27
<211> 21
20 <212> ADN
    <213> Artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: ARNpi
25 <400> 27
    uaacuguaua aucgacuagt t      21

<210> 28
<211> 21
30 <212> ADN
    <213> Artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: ARNpi
35 <400> 28
    cuagucgauu auacaguuag a      21

<210> 29
<211> 15
40 <212> PRT
    <213> Artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido para cribado
45 <400> 29

                                     Met Lys Val Phe Lys Phe Ile Gly Leu Met Ile Leu Leu Thr Ser
50                                     1       5       10       15

<210> 30
<211> 15
<212> PRT
55 <213> Artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido para cribado
60 <400> 30

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

```

ES 2 664 571 T3

<210> 31  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido para cribado  
 <400> 31  
 10  
           Leu Met Ile Leu Leu Thr Ser Ala Phe Ser Ala Gly Ser Gly Gln  
           1                  5                  10                  15  
  
 <210> 32  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido para cribado  
 20  
 <400> 32  
  
           Leu Thr Ser Ala Phe Ser Ala Gly Ser Gly Gln Ser Pro Met Thr  
           1                  5                  10                  15  
  
 25 <210> 33  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 30 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido para cribado  
 <400> 33  
  
           Phe Ser Ala Gly Ser Gly Gln Ser Pro Met Thr Val Leu Cys Ser  
           1                  5                  10                  15  
  
 35 <210> 34  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 40 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido para cribado  
 45 <400> 34  
  
           Ser Gly Gln Ser Pro Met Thr Val Leu Cys Ser Ile Asp Trp Phe  
           1                  5                  10                  15  
  
 50 <210> 35  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 55 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido para cribado  
 <400> 35  
  
           Pro Met Thr Val Leu Cys Ser Ile Asp Trp Phe Met Val Thr Val  
           1                  5                  10                  15  
 60

ES 2 664 571 T3

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

ES 2 664 571 T3

<210> 41  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido para cribado  
 <400> 41  
 10  
           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  
 <213> Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido para cribado  
 20  
 <400> 42  
           His Glu Leu His Leu Gly Leu Gly Cys Pro Pro Asn His Val Gln  
           1                  5                  10                  15  
 25 <210> 43  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 30 <220>  
 <223> Descripción de la 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  
 35 <210> 44  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 40 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido para cribado  
 45 <400> 44  
           Cys Pro Pro Asn His Val Gln Pro His Ala Tyr Gln Phe Thr Tyr  
           1                  5                  10                  15  
 50 <210> 45  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 55 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido para cribado  
 <400> 45  
           His Val Gln Pro His Ala Tyr Gln Phe Thr Tyr Arg Val Thr Glu  
           1                  5                  10                  15  
 60

ES 2 664 571 T3

<210> 46  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido para cribado  
 <400> 46  
 10  
           His Ala Tyr Gln Phe Thr Tyr Arg Val Thr Glu Cys Gly Ile Arg  
           1                  5                  10                  15  
 <210> 47  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido para cribado  
 20  
 <400> 47  
           Phe Thr Tyr Arg Val Thr Glu Cys Gly Ile Arg Ala Lys Ala Val  
           1                  5                  10                  15  
 25 <210> 48  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 30 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido para cribado  
 <400> 48  
           Val Thr Glu Cys Gly Ile Arg Ala Lys Ala Val Ser Gln Asp Met  
           1                  5                  10                  15  
 35 <210> 49  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 40 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido para cribado  
 45 <400> 49  
           Gly Ile Arg Ala Lys Ala Val Ser Gln Asp Met Val Ile Tyr Ser  
           1                  5                  10                  15  
 50 <210> 50  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 55 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido para cribado  
 <400> 50  
           Lys Ala Val Ser Gln Asp Met Val Ile Tyr Ser Thr Glu Ile His  
           1                  5                  10                  15  
 60

ES 2 664 571 T3

<210> 51  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido para cribado  
 <400> 51  
 10  
                   Gln Asp Met Val Ile Tyr Ser Thr Glu Ile His Tyr Ser Ser Lys  
                   1                                  5                                  10                                  15  
 <210> 52  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido para cribado  
 20  
 <400> 52  
                   Ile Tyr Ser Thr Glu Ile His Tyr Ser Ser Lys Gly Thr Pro Ser  
                   1                                  5                                  10                                  15  
 25 <210> 53  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 30 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido para cribado  
 <400> 53  
                   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  
 <213> Artificial  
 40 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido para cribado  
 45 <400> 54  
                   Ser Ser Lys Gly Thr Pro Ser Lys Phe Val Ile Pro Val Ser Cys  
                   1                                  5                                  10                                  15  
 50 <210> 55  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 55 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido para cribado  
 <400> 55  
                   Thr Pro Ser Lys Phe Val Ile Pro Val Ser Cys Ala Ala Pro Gln  
                   1                                  5                                  10                                  15  
 60

ES 2 664 571 T3

<210> 56  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido para cribado  
 <400> 56  
 10  
           Phe Val Ile Pro Val Ser Cys Ala Ala Pro Gln Lys Ser Pro Trp  
           1                  5                  10                                  15  
 <210> 57  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido para cribado  
 20  
 <400> 57  
           Val Ser Cys Ala Ala Pro Gln Lys Ser Pro Trp Leu Thr Lys Pro  
           1                  5                  10                                  15  
 25 <210> 58  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 30 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido para cribado  
 <400> 58  
           Ala Pro Gln Lys Ser Pro Trp Leu Thr Lys Pro Cys Ser Met Arg  
 35          1                  5                  10                                  15  
 <210> 59  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 40 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido para cribado  
 45 <400> 59  
           Ser Pro Trp Leu Thr Lys Pro Cys Ser Met Arg Val Ala Ser Lys  
           1                  5                  10                                  15  
 50 <210> 60  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 55 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido para cribado  
 <400> 60  
           Thr Lys Pro Cys Ser Met Arg Val Ala Ser Lys Ser Arg Ala Thr  
 60          1                  5                  10                                  15



ES 2 664 571 T3

<210> 66  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido para cribado  
 <400> 66  
 10  
           Val Phe Ser Leu Ser Gln Ser Ser Gln Arg Pro Asn Cys Asp Cys  
           1                  5                  10                  15  
 <210> 67  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido para cribado  
 <400> 67  
 20  
           Ser Gln Ser Ser Gln Arg Pro Asn Cys Asp Cys Pro Pro Cys Val  
           1                  5                  10                  15  
 <210> 68  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido para cribado  
 <400> 68  
 30  
           Gln Arg Pro Asn Cys Asp Cys Pro Pro Cys Val Phe Ser Glu Glu  
           1                  5                  10                  15  
 <210> 69  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 35  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido para cribado  
 <400> 69  
 40  
           Cys Asp Cys Pro Pro Cys Val Phe Ser Glu Glu Glu His Thr Gln  
           1                  5                  10                  15  
 <210> 70  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 45  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido para cribado  
 <400> 70  
 50  
           Pro Cys Val Phe Ser Glu Glu Glu His Thr Gln Val Pro Cys His  
           1                  5                  10                  15  
 <210> 71  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 55  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido para cribado  
 <400> 71  
 60  
           Pro Cys Val Phe Ser Glu Glu Glu His Thr Gln Val Pro Cys His  
           1                  5                  10                  15



ES 2 664 571 T3

<210> 76  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido para cribado  
 <400> 76  
 10  
           Leu Gln Pro Ser His Phe Leu Asp Ile Ser Glu Asp Trp Ser Leu  
           1                          5                          10                          15  
  
 <210> 77  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido para cribado  
 20  
 <400> 77  
  
           His Phe Leu Asp Ile Ser Glu Asp Trp Ser Leu His Thr Asp Asp  
           1                          5                          10                          15  
  
 25 <210> 78  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 30 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido para cribado  
 <400> 78  
  
           Ile Ser Glu Asp Trp Ser Leu His Thr Asp Asp Met Ile Gly Ser  
           1                          5                          10                          15  
  
 35 <210> 79  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 40 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido para cribado  
 45 <400> 79  
  
           Ser Glu Asp Trp Ser Leu His Thr Asp Asp Met Ile Gly Ser Met  
           1                          5                          10                          15

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un anticuerpo que se une a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y que media la inhibición de la proliferación de células, donde dichas células expresan una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y/o se caracterizan por la asociación de una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 con su superficie celular.
- 10 2. El anticuerpo según la reivindicación 1, donde dicha inhibición de proliferación de células se induce mediante la unión de dicho anticuerpo a una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 expresada por dichas células y/o asociada a la superficie de dichas células, preferiblemente mediante la unión de dicho anticuerpo al dominio extracelular de una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 expresada por dichas células y/o asociada con la superficie de dichas células.
- 15 3. El anticuerpo de la reivindicación 1 o 2, donde dichas células que expresan una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 y/o que se caracteriza por asociación de una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 con su superficie celular son células cancerosas, preferiblemente seleccionadas del grupo que consiste en células de cáncer de mama, pulmón, gástricas, de ovario y hepatocelulares tumorígenicas.
- 20 4. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 que es un anticuerpo monoclonal, quimérico, humano o humanizado, o un fragmento de un anticuerpo.
- 25 5. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 seleccionado del grupo que consiste en un anticuerpo IgG1, IgG2, preferiblemente IgG2a e IgG2b, un IgG3, un IgG4, un IgM, un IgA1, un IgA2, un IgA secretor, un IgD y un IgE.
- 30 6. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde la secuencia de aminoácidos de dicha proteína consiste en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 2.
- 35 7. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde dicha proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 se expresa en la superficie de dichas células.
- 40 8. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 que se puede obtener mediante un método que comprende la etapa de inmunización de un animal con una proteína o péptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 2-10 y 35 -79, o un fragmento inmunogénico o derivado del mismo, o un ácido nucleico o célula huésped que expresa dicha proteína o péptido, o fragmento inmunogénico o derivado del mismo.
- 45 9. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde dicho anticuerpo se produce mediante un clon depositado bajo el No. de acceso. DSM ACC2826 (9B6-2A9), DSM ACC2824 (59D6-2F2) o DSM ACC2823 (78H11-1H6).
- 50 10. Un hibridoma que produce el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 o un hibridoma depositado bajo el No. de acceso DSM ACC2826 (9B6-2A9), DSM ACC2824 (59D6-2F2) o DSM ACC2823 (78H11-1H6).
- 55 11. Un conjugado que comprende un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 acoplado a un agente terapéutico, preferiblemente una toxina, un radioisótopo, un fármaco o un agente citotóxico.
- 60 12. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y/o un conjugado de la reivindicación 11, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
13. Un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y/o un conjugado de la reivindicación 11 para uso en un método de terapia.
14. El anticuerpo para uso de la reivindicación 13, el conjugado para uso de la reivindicación 13 o la composición farmacéutica de la reivindicación 12 para uso en un método para tratar o prevenir un tumor o enfermedad o trastorno por cáncer.
15. El anticuerpo para uso de la reivindicación 14, el conjugado para uso de la reivindicación 14 o la composición farmacéutica para uso de la reivindicación 14 donde la enfermedad o trastorno se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de ovario y cáncer hepatocelular.

16. El anticuerpo para usar de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, el conjugado para uso de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15 o la composición farmacéutica para uso de las reivindicaciones 13 a 15 donde dicha proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO. : 2 se expresa en la superficie de dichas células.

5

**Fig. 1**

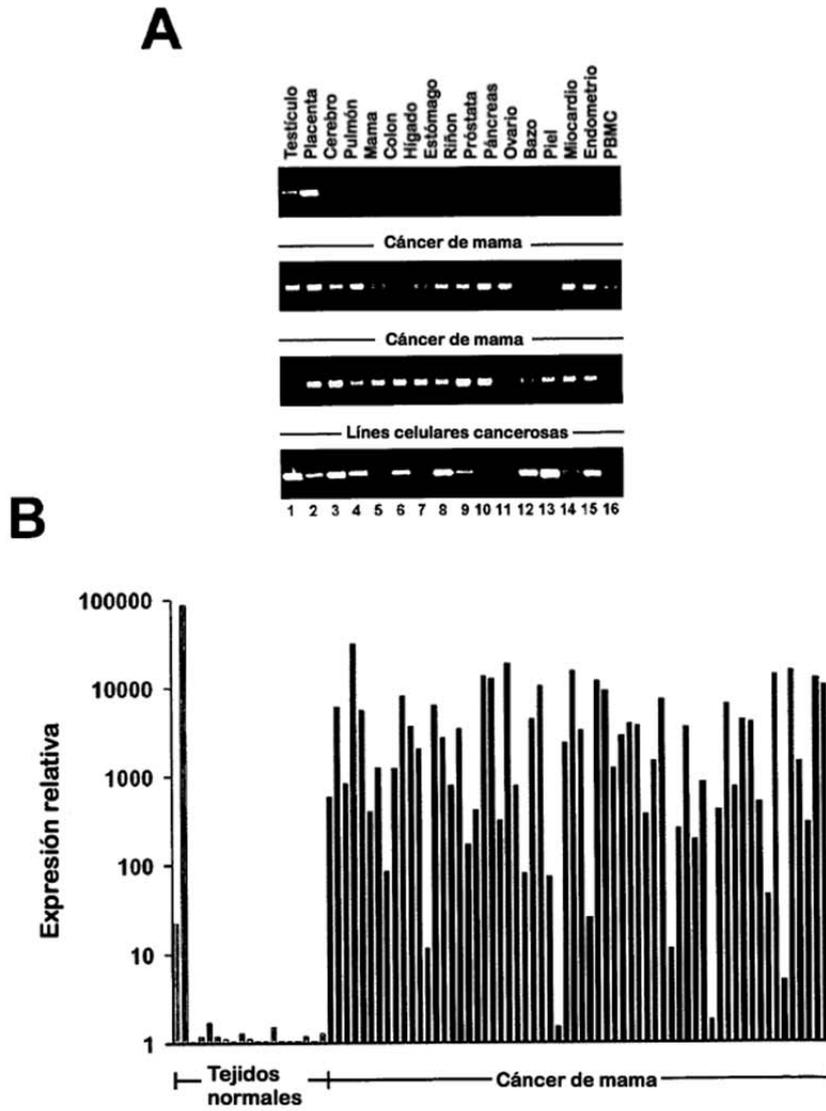
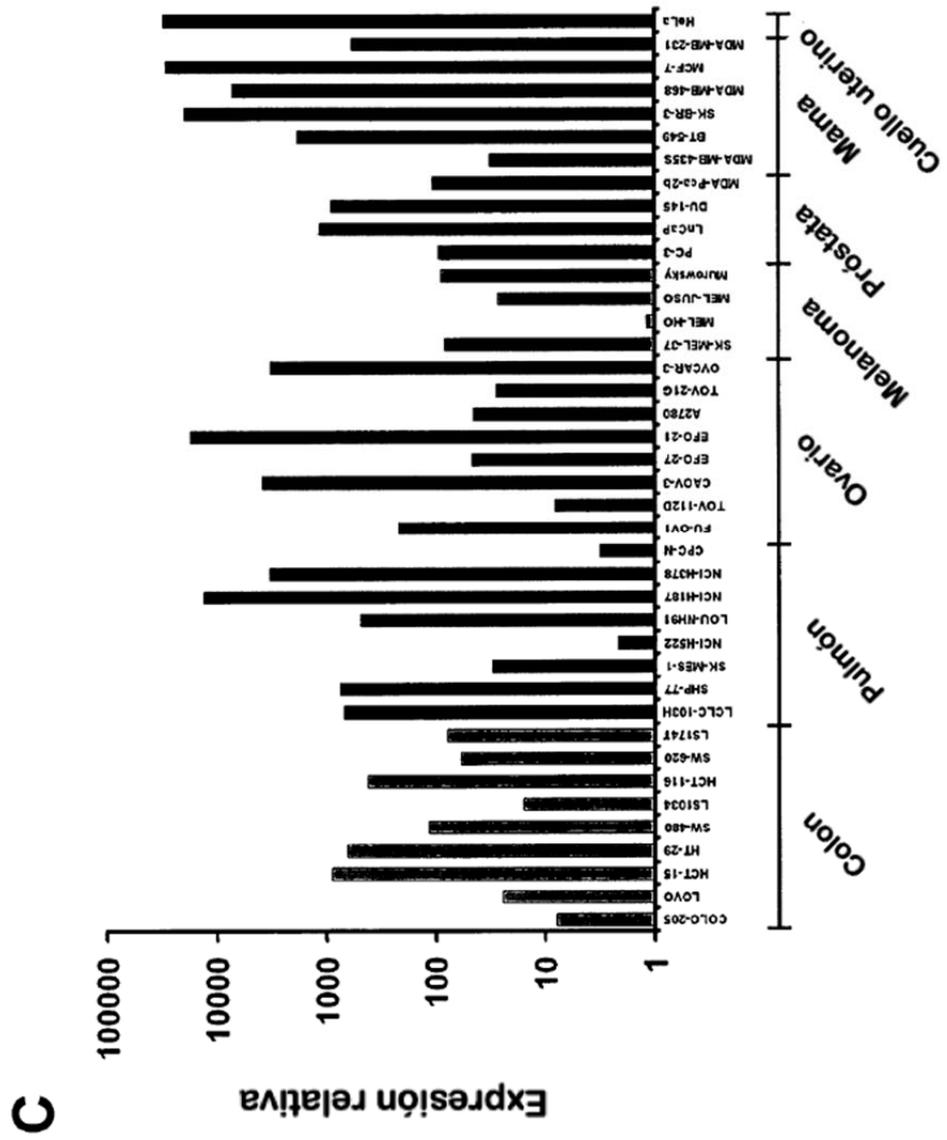
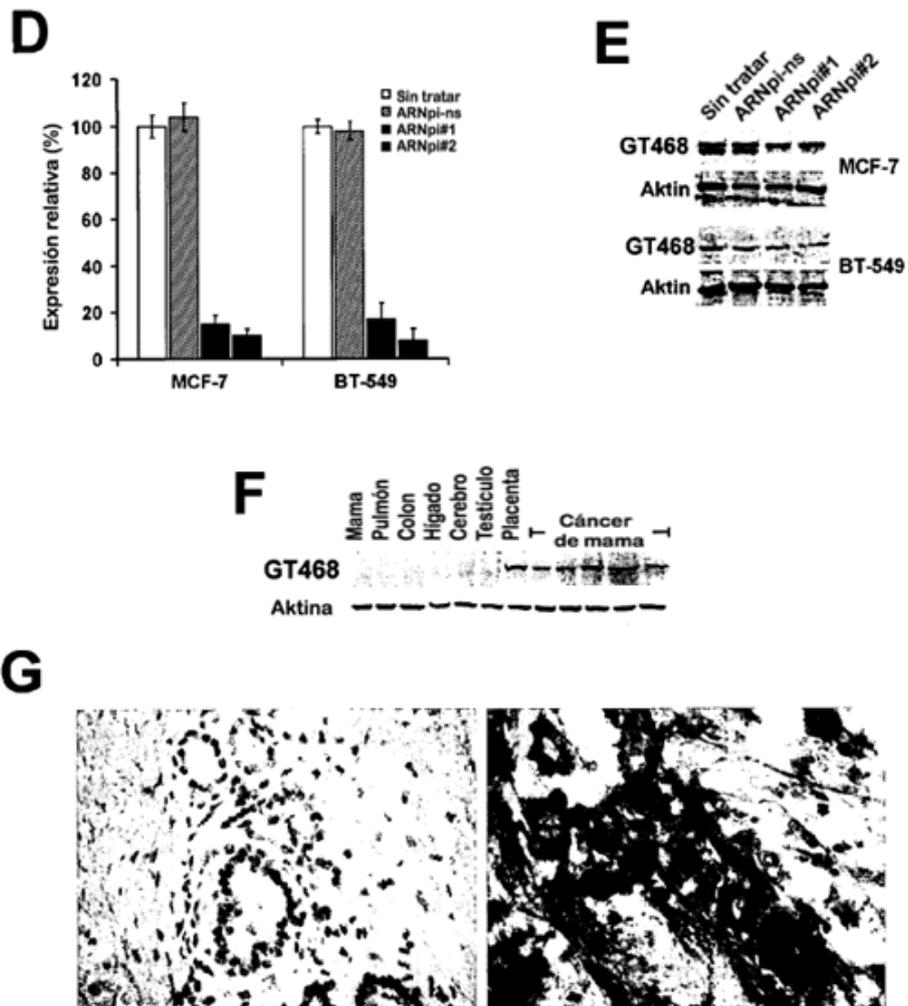


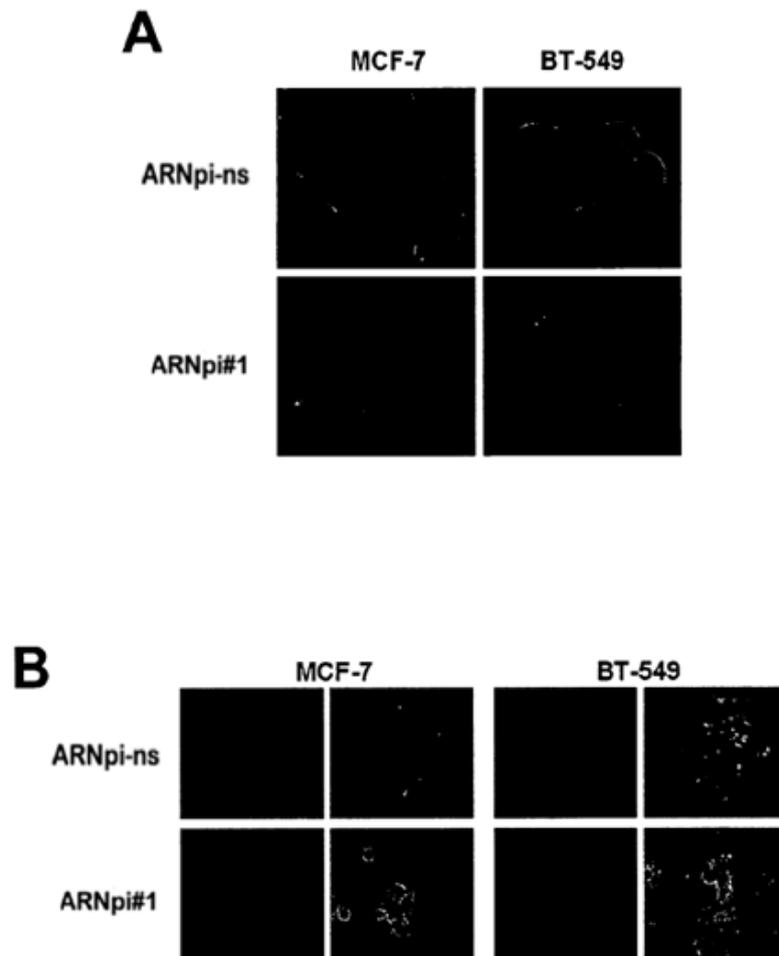
Fig. 1



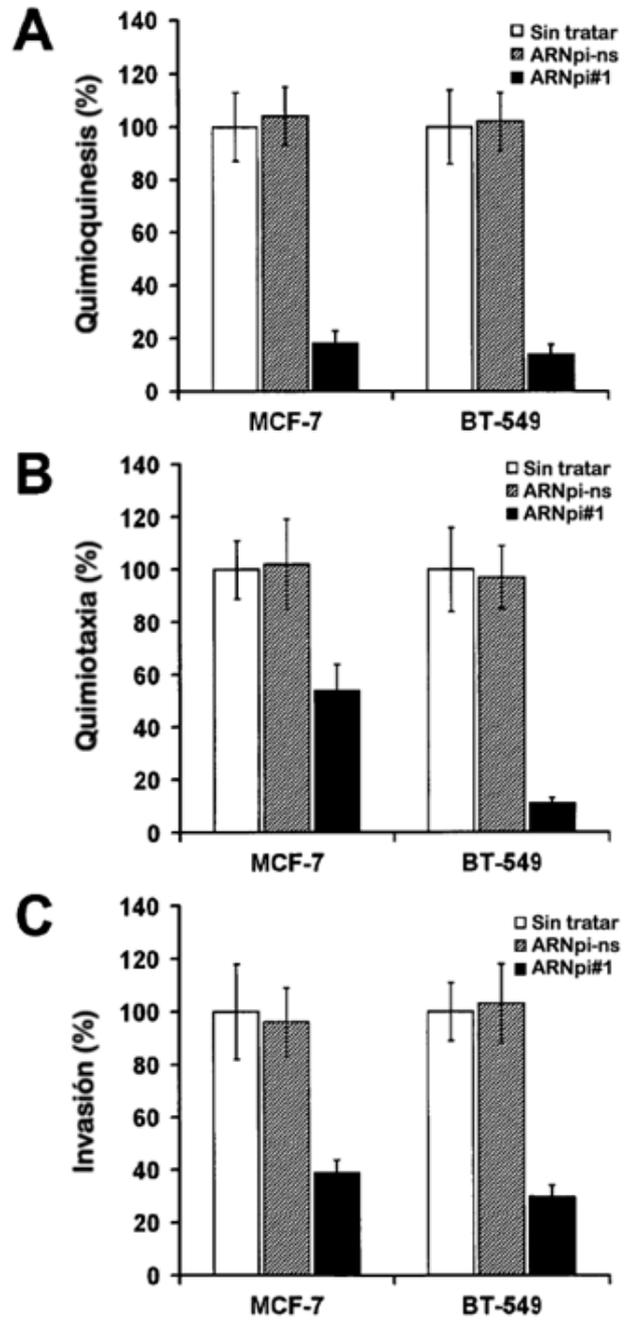
**Fig. 1**



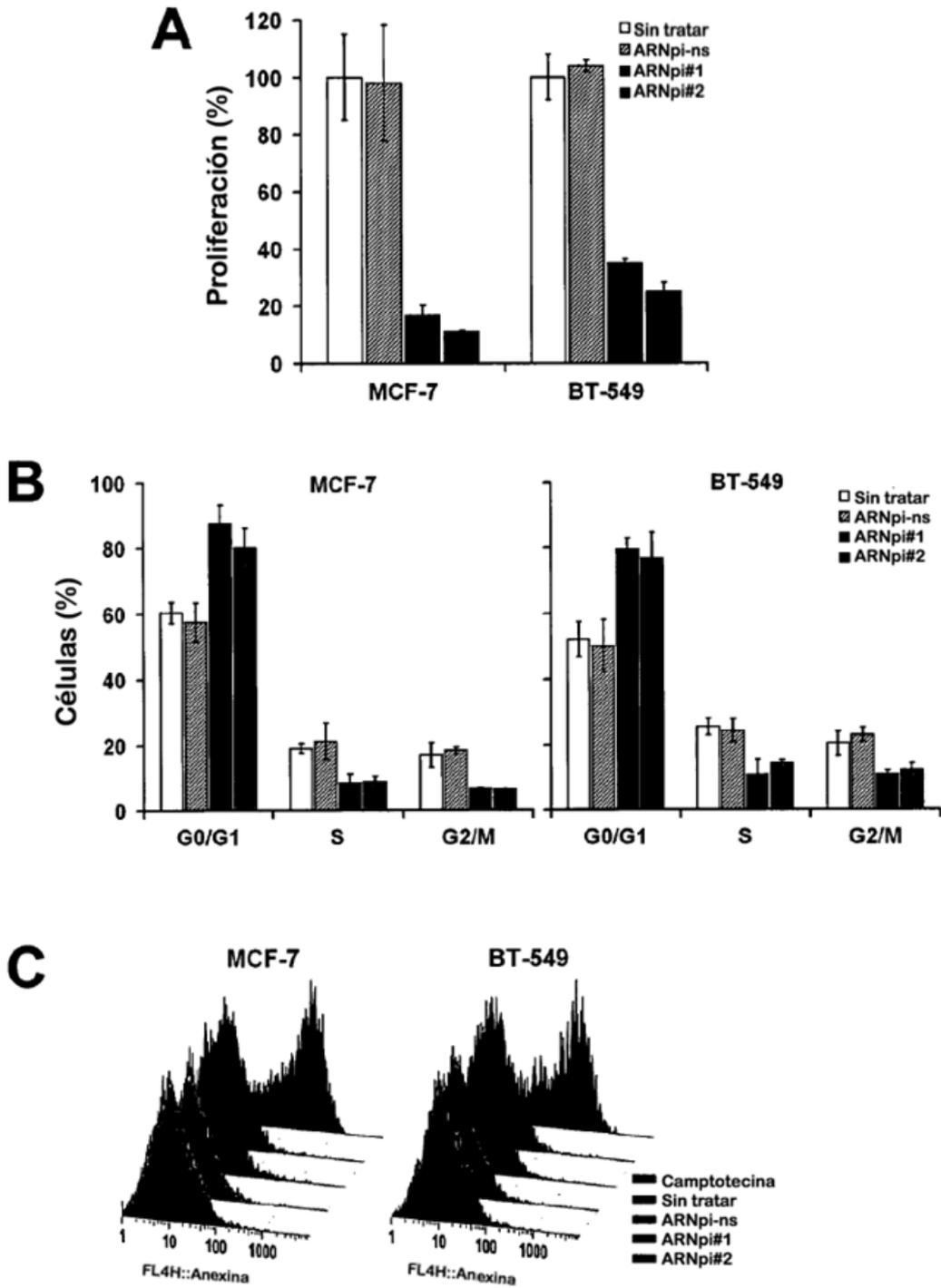
**Fig. 2**



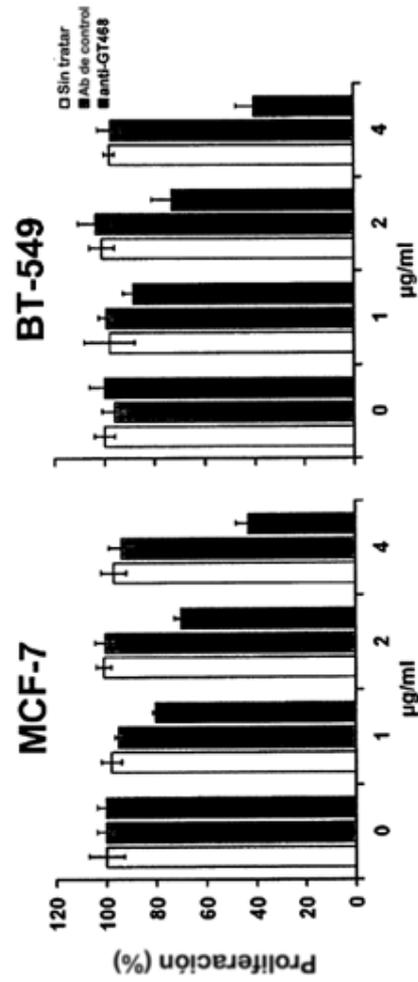
**Fig. 3**



**Fig. 4**



**Fig. 5**



**Fig. 6**

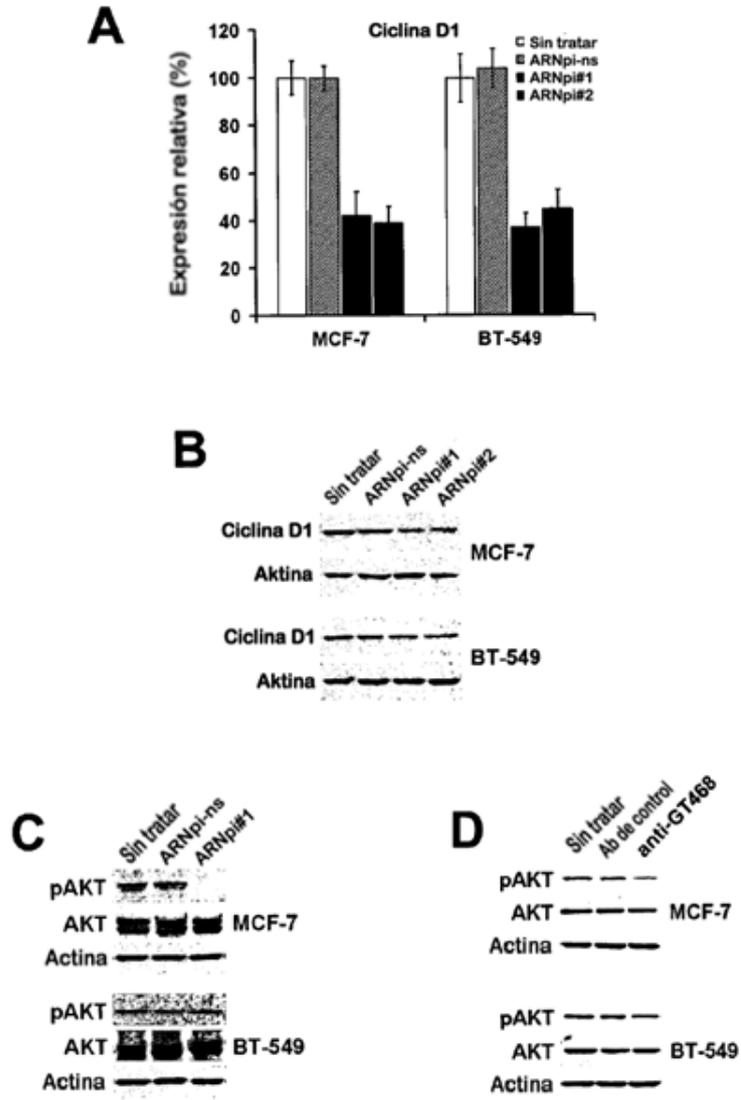
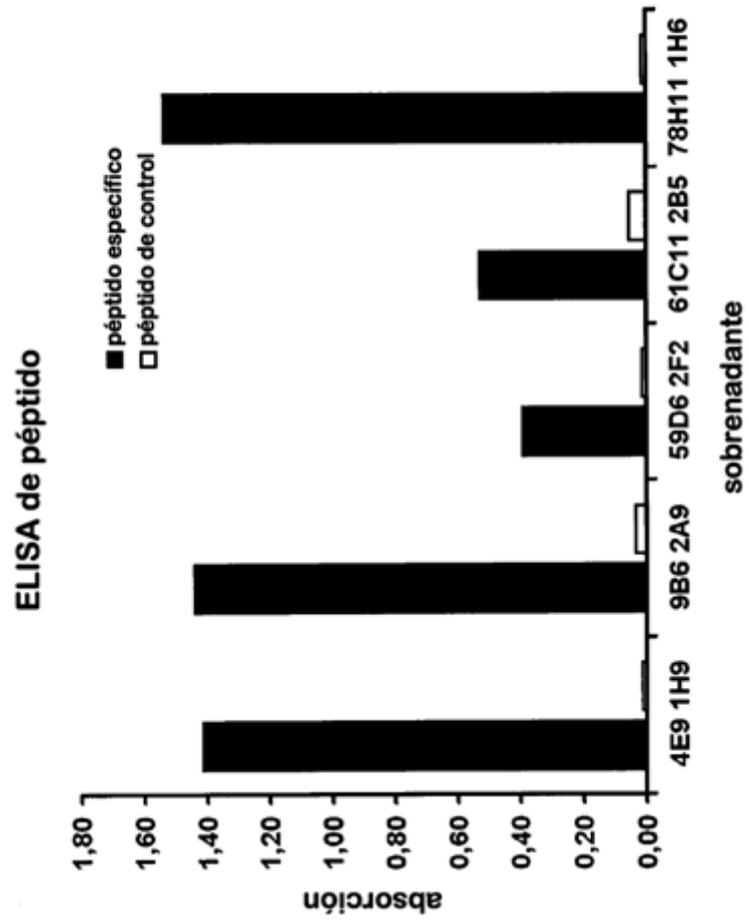
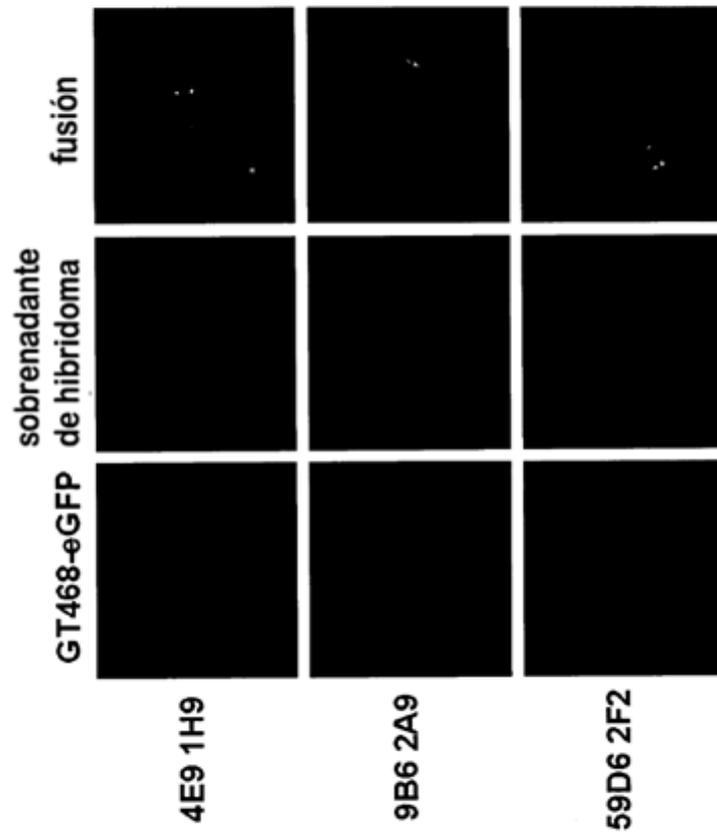


Fig. 7



**Fig. 8**



**Fig. 9**

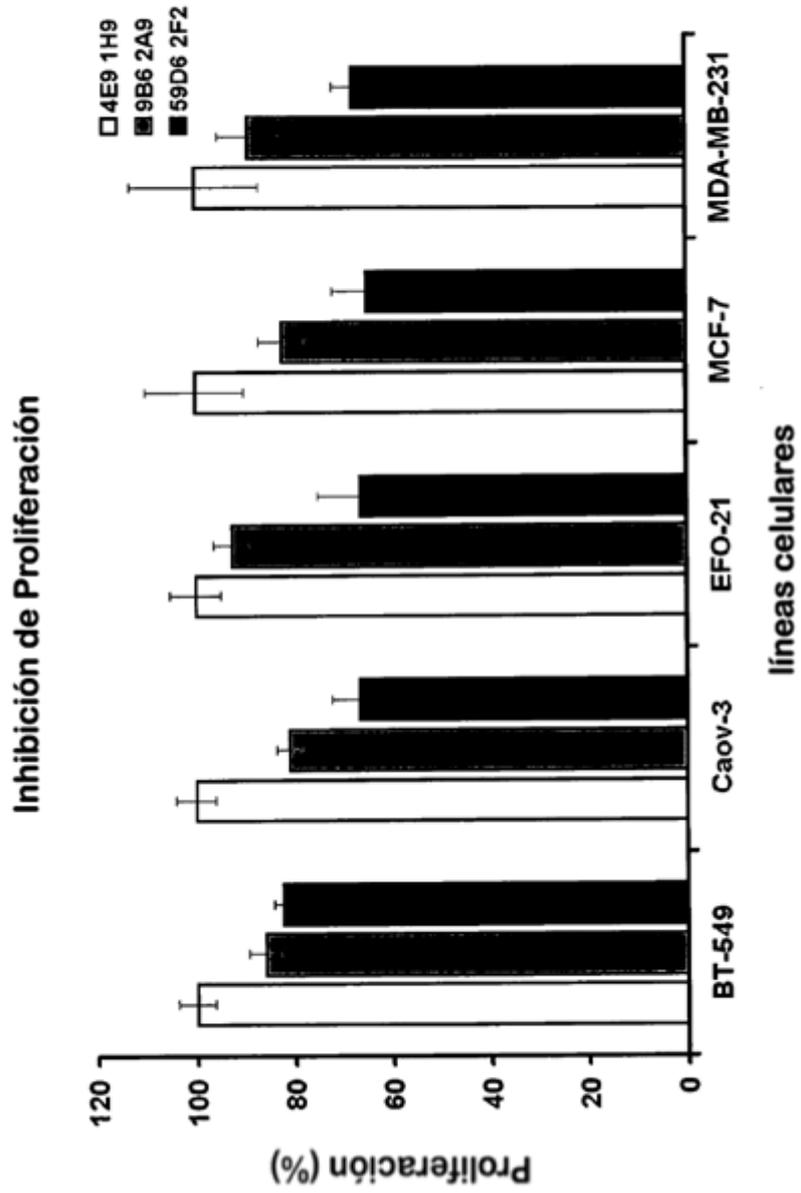


Fig. 10

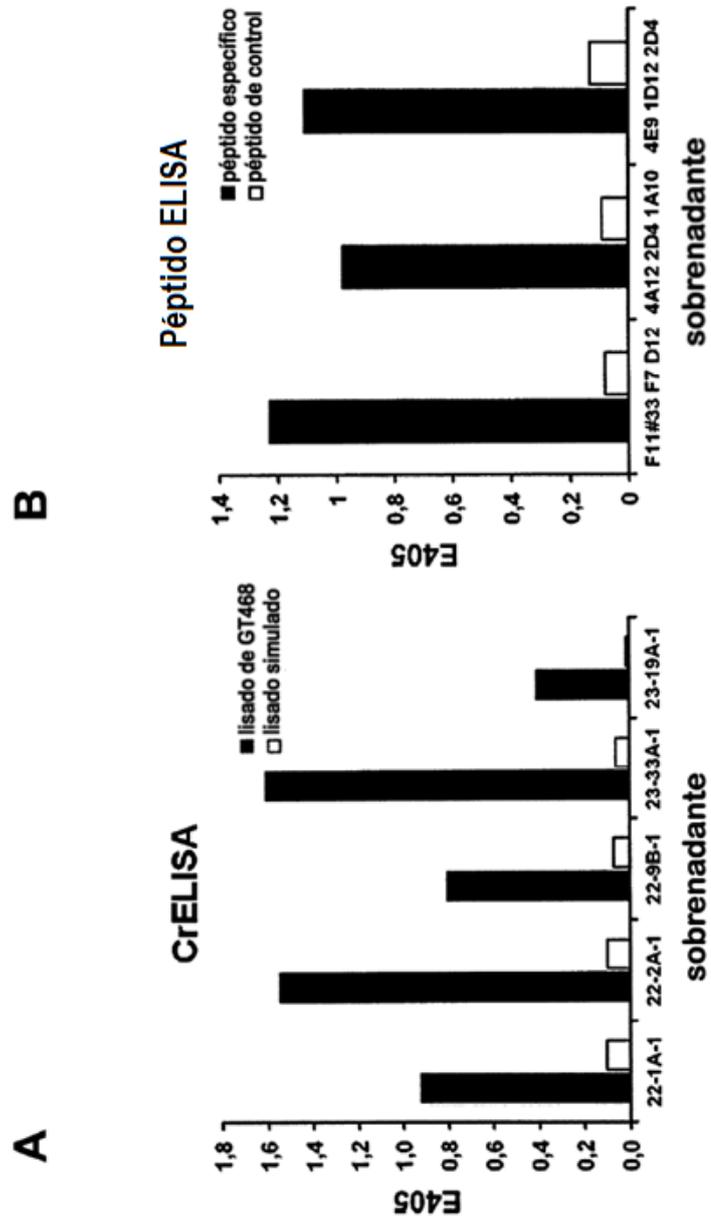


Fig. 11

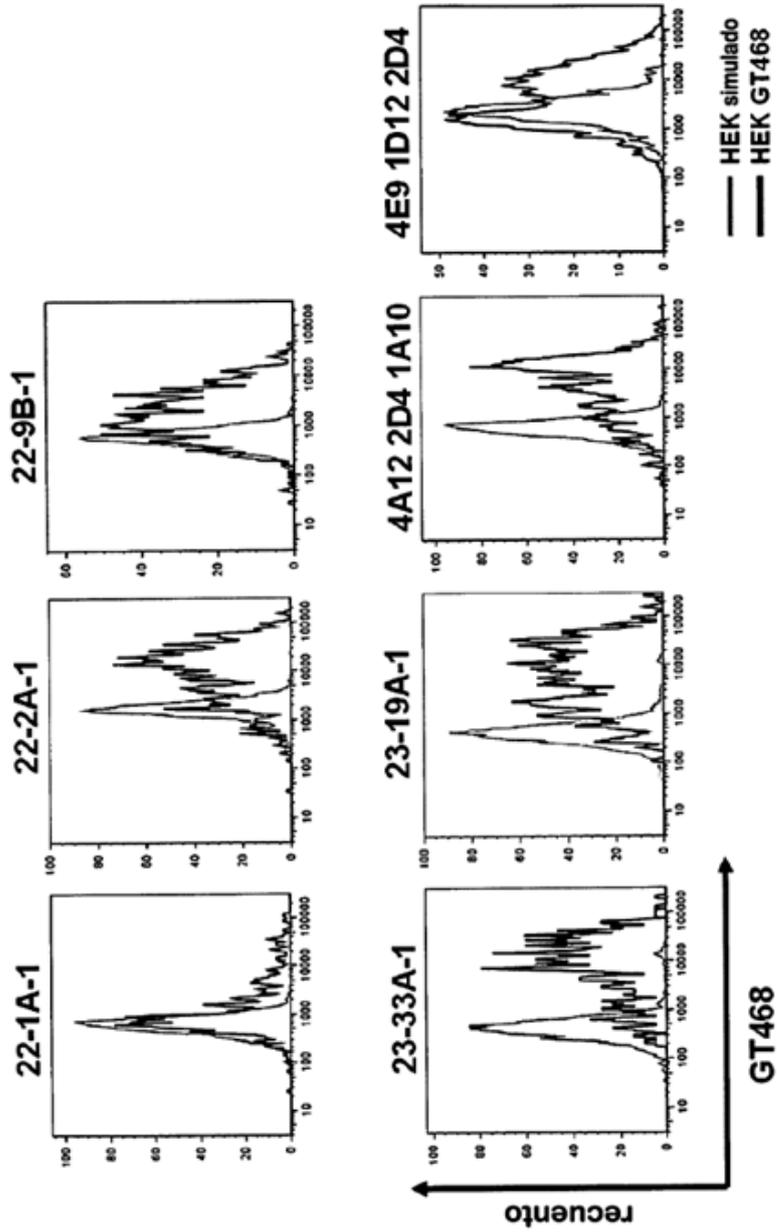
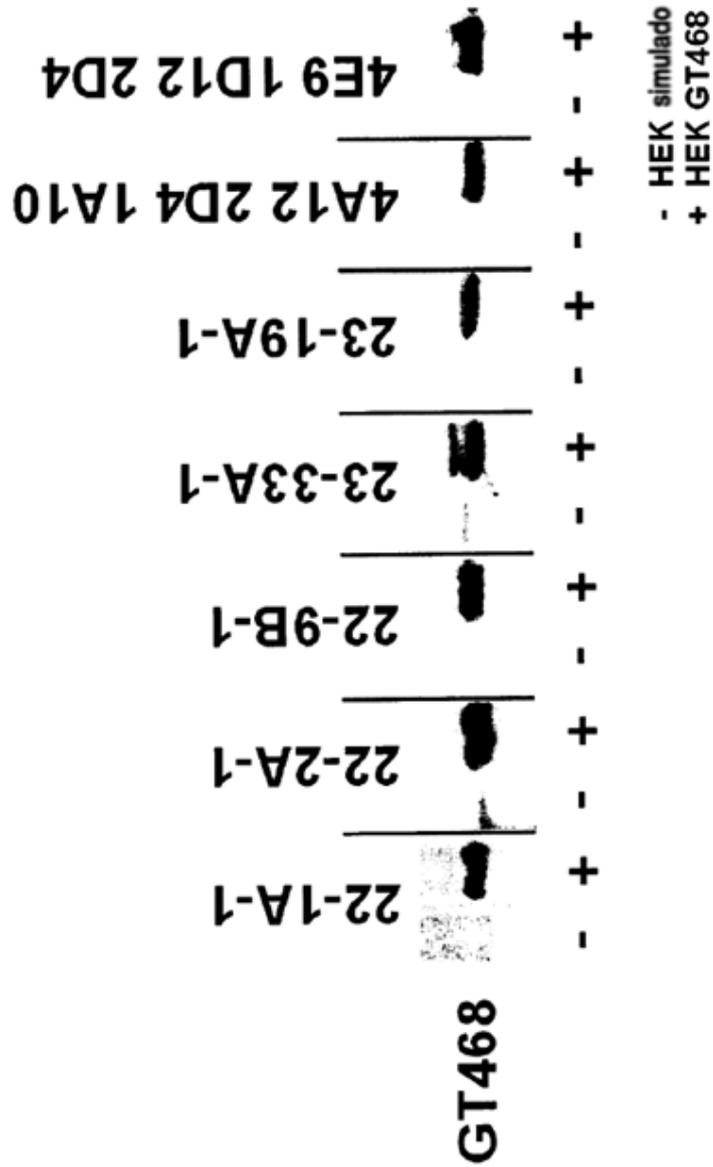


Fig. 12



**Fig. 13**

Péptido	Secuencia	Péptido	Secuencia
1	MKVFKFIGLMILLTS	26	SSKGTPSKFVIPVSC
2	KFIGLMILLTSAFSA	27	TPSKFVIPVSCAAPQ
3	LMILLTSAFSAGSGQ	28	FVIPVSCAAPQKSPW
4	LTSAFSAGSGQSPMT	29	VSCAAPQKSPWLTKP
5	FSAGSGQSPMTVLCS	30	APQKSPWLTKPCSMR
6	SGQSPMTVLCSIDWF	31	SPWLTKPCSMRVASK
7	PMTVLCSIDWFMVTV	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	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

