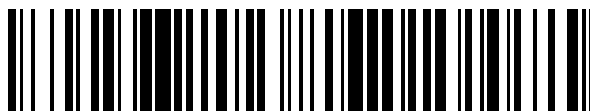


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 678 049**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.06.2016 PCT/GB2016/051609**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.12.2016 WO16198834**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2016 E 16727798 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.05.2018 EP 3221352**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales de unión a Mcm5**

30 Prioridad:

08.06.2015 GB 201509907

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

08.08.2018

73 Titular/es:

**ARQUER DIAGNOSTICS LIMITED (100.0%)
North East Business & Innovation Centre
Wearfield
Sunderland, Tyne and Wear SR5 2TA, GB**

72 Inventor/es:

**LASKEY, RONALD ALFRED y
STOEBER, KAI**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 678 049 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 de unión a Mcm5

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a anticuerpos monoclonales que se unen a proteínas Mcm, a composiciones o a kits que comprenden los anticuerpos monoclonales, o a métodos de uso de los anticuerpos.

10 **Antecedentes de la invención**

Los cánceres urológicos (en ocasiones denominados 'cánceres del aparato urinario') son un problema epidemiológico importante y en aumento continuo. Dos de los cánceres urinarios de mayor importancia económica son el cáncer de vejiga y el cáncer de próstata.

15 El cáncer de próstata es el segundo cáncer más común en hombres después del cáncer de piel no melanoma, con más de 35.000 nuevos casos diagnosticados cada año en el RU; el cáncer de próstata provoca aproximadamente 10.200 muertes al año. Cada año se producen alrededor de 300.000 casos nuevos en Europa, 190.000 en los Estados Unidos y 670.000 en todo el mundo. Cancer Research UK informa que un cuarto de todos los casos nuevos de cáncer diagnosticados en hombres en el RU son cánceres de próstata y que el 60 % de los nuevos diagnósticos son en hombres de más de 70 años. La forma más común de la enfermedad es el adenocarcinoma. La tasa de supervivencia a 5 años es de casi el 80 % en el RU. No se conoce una causa ambiental, pero las personas con parientes cercanos con cáncer de próstata o de mama tienen más riesgo de desarrollar la enfermedad. Los hombres de África Occidental y afrocaribeños tienen un mayor riesgo de cáncer de próstata.

25 Los síntomas del cáncer de próstata son similares a los provocados por la hiperplasia benigna de la próstata e incluyen la necesidad imperiosa de orinar, dificultad o disuria, y rara vez, sangre en la orina o en el semen. Sin embargo, en muchos hombres, la enfermedad permanece asintomática hasta que se forman metástasis dolorosas, predominantemente en los huesos.

30 El tratamiento depende del estadio y del grado de malignidad del tumor, y de la salud general y edad del paciente. Las opciones incluyen vigilancia activa, prostatectomía parcial o radical, orquiectomía, el tratamiento hormonal y radioterapia, tal como la braquirradioterapia. La orquiectomía y el tratamiento hormonal reducen o eliminan la producción de testosterona, que es esencial para el crecimiento tumoral.

35 El diagnóstico definitivo de cáncer de próstata precisa un enfoque multifacético. La prueba de diagnóstico de referencia actual para el cáncer de próstata es el examen histológico del material de biopsia. La decisión de tomar una biopsia está basada en el nivel sérico del APS (antígeno prostático específico) relacionado con la edad y/o en tacto rectal (TR) anómalo. El TR, en el cual se palpa la glándula por vía transrectal para examinar la morfología anómala, también es inespecífico. Los tumores que son demasiado pequeños para alterar la morfología de la glándula no se detectarán, y las afecciones benignas también provocan una morfología o agrandamiento anómalos. Este es un problema en la técnica. Habitualmente, las muestras de próstata se toman con biopsia de próstata por punción dirigida por ecografía transrectal TRUS (forma siglada del inglés *transrectal ultrasound*, ecografía transrectal). Se toman varias muestras con aguja gruesa, normalmente hasta 12, para maximizar el área de glándula de la que se toma una muestra. El procedimiento lo lleva a cabo un urólogo en el servicio de consultas externas, con anestesia local, con la ayuda de personal de enfermería o un auxiliar de clínica. Este procedimiento tiene inconvenientes, que incluyen ser algo doloroso para el paciente y exponer al paciente a un riesgo de sepsis y/o hemorragia. Las muestras de tejido con aguja gruesa se examinan al microscopio en el laboratorio en cuanto a la presencia de células malignas, lo que tiene el problema de ser laborioso y de precisar citólogos muy entrenados, además de ser susceptible de error humano.

50 Se puede apreciar que las biopsias son invasivas y costosas. Existe una necesidad en la técnica de una herramienta más rentable, fiable y/o no invasiva para el diagnóstico y/o vigilancia del cáncer urinario, tal como el cáncer de próstata. Los procedimientos conocidos de diagnóstico alternativos y/o menos invasivos para el cáncer de próstata implican el análisis de marcadores biológicos específicos ('biomarcadores').

55 Un ejemplo de un biomarcador de ácido nucleico del cáncer de próstata es la prueba de PCA3 (gen de cáncer de próstata 3). Este ensayo urinario identifica el ARNm no codificante del gen PCA3, que se sobreexpresa en el cáncer de próstata (Hessels y Schalken, The use of PCA3 in the diagnosis of prostate cancer. Nat Rev Urol, 6, 255-61; 2009). La prueba PCA3 (Gen-Probe, Inc) se basa en el análisis de una muestra de ensayo de la primera micción producida después de una forma definida de masaje prostático, utilizado para expresar secreciones prostáticas, que contienen células epiteliales de la uretra. Como diagnóstico del cáncer de próstata PCA3 tiene un valor de curva ROC (curva de eficacia diagnóstica) de 0,68 (Chun *et al*, Prostate Cancer Gene 3 (PCA3): development and internal validation of a novel biopsy nomogram. Eur Urol; 2009 vol 56 pág. 659-668), que es similar al de la prueba de PSA analizada a continuación. Sin embargo, la prueba PCA3 es costosa y no es apta para el uso como análisis de diagnóstico inmediato, que son los problemas con esta técnica de la técnica anterior.

Un ejemplo de biomarcador proteico, que se usa con frecuencia para indicar la presencia de cáncer de próstata, es el PSA (antígeno prostático específico). A los pacientes sintomáticos que se presentan en atención primaria generalmente se les realiza una prueba de PSA sérica y un TR. Sin embargo, el PSA no es específico para el cáncer de próstata. El PSA es una enzima intracelular específica de tejido expresada constitutivamente. El PSA está presente a bajas concentraciones en el suero de hombres con una próstata sana. Un nivel elevado de PSA en suero se produce debido a la filtración procedente de la próstata y es una indicación del tamaño relativo de la glándula. El PSA elevado puede producirse en afecciones benignas, tales como la hiperplasia prostática benigna y la prostatitis, y también en el cáncer de próstata. A medida que los hombres se hacen mayores, el volumen de la glándula aumenta, lo que da como resultado un aumento de los niveles de PSA, en ausencia de neoplasia maligna. En un estudio reciente, se encontró que el 60-70 % de las pruebas de PSA 'positivas' (nivel sérico de PSA mayor a 4 ng/ml) no estaban asociadas con cáncer (Kilpeläinen *et al.*, False-positive screening results in the Finnish prostate cancer screening trial, *British Journal of Cancer*. 102, 469-474; 2010). La alta tasa de resultados positivos falsos conduce a muchas operaciones de biopsia innecesarias y hace que la prueba sea inapropiada para el cribado poblacional. Además, la prueba de PSA no detecta un número significativo de casos de cáncer de próstata, particularmente en hombres más jóvenes. La precisión de la prueba de PSA medida en el análisis ROC (curva de eficacia diagnóstica) es de 0,678 (Thompson *et al.*, Operating characteristics of a prostate-specific antigen in men with an initial PSA level of 3.0 ng/ml or lower. *JAMA*, 294, 66-70; 2005). En el RU, habitualmente, las pruebas de PSA se llevan a cabo en laboratorios de hospitales, aunque están disponibles análisis de diagnóstico inmediato rápidos.

El cáncer de vejiga es el cuarto cáncer más común en los hombres y el noveno cáncer más común en las mujeres, y da como resultado una morbilidad y mortalidad significativas (Jemal *et al.* *CA Cancer J Clin*. 2007. 57:43-66.). La mayoría de los pacientes con cáncer de vejiga reciben el diagnóstico después de presentar hematuria macroscópica o microscópica, o con otros síntomas de micción irritativa, tal como la frecuencia y la disuria. En el diagnóstico inicial, aproximadamente el 70 % de los pacientes tienen cánceres de vejiga que están restringido al epitelio o al tejido conectivo subepitelial. Estos cánceres se pueden tratar con resección endoscópica y terapia intravesical. La tasa de recidiva de estos tumores varía del 50 % al 70 %, y del 10 % al 15 % de los casos progresa a invasión muscular a lo largo de un período de 5 años (Shariat *et al.*, 2008. *Rev Urol*. 10:120-135). La recidiva se puede ver de forma local y más raramente en las vías urinarias superiores, incluso después de varios años, necesitando una vigilancia de por vida. El 30 % restante de los pacientes tiene cáncer músculo invasivo en el momento del diagnóstico inicial. De esta población, el 50 % tiene metástasis a distancia dentro de los 2 años y el 60 % muere dentro de los 5 años, a pesar del tratamiento.

El diagnóstico definitivo de cáncer de vejiga requiere una combinación de procedimientos. Actualmente no existen métodos para identificar con precisión y facilidad la presencia de cáncer de vejiga temprano. El cribado de cáncer de vejiga en pacientes que se presentan en el consultorio de urología con los síntomas apropiados se realiza actualmente con análisis de orina, cistoscopia y un procedimiento de exploración tal como ecografía abdominal, urografía intravenosa, tomografía computarizada o resonancia magnética. La citología de orina, en que se examinan microscópicamente células de muestras de orina, se usa de forma ocasional. La cistoscopia, el pilar para la detección del cáncer de vejiga, es un procedimiento relativamente corto, mínimamente traumático, realizado con anestesia local de la uretra, que identifica casi todas las lesiones papilares y sésiles. No obstante, sigue siendo invasivo y una causa de malestar y angustia para el paciente. Además, en ocasiones la cistoscopia puede no ser concluyente debido a al aspecto anómalo macroscópico de la mucosa de la vejiga, especialmente en pacientes con una sonda permanente o inflamación activa, y es incapaz de detectar cánceres dentro de los uréteres. Aunque se considera se la considera el diagnóstico de referencia del cáncer de vejiga debido a que permite la visualización directa y la biopsia del urotelio de la vejiga, la cistoscopia tiene una tasa de negativos falsos considerable ya sea por error del técnico o por las áreas pequeñas de "carcinoma *in situ*", que pueden ser difíciles de detectar. (van der Poel y Debruyne. *Curr Opin Urol*. 2001; 11:503-509; Herr. *BJU Int*. 1999; 84:1102-1103.)

En la citología urinaria para el cáncer de vejiga, se pueden investigar células exfoliadas en cuanto a la presencia de antígenos específicos de la superficie celular, la morfología nuclear, expresión génica u otros marcadores biológicos. La citología urinaria tiene una alta sensibilidad y especificidad para la detección del cáncer de vejiga de gran malignidad, pero carece de sensibilidad para detectar tumores de baja malignidad (Wiener *et al.*, *Acta Cytol*. 1993; 37:163-169). La precisión de la citología urinaria para predecir la recidiva del cáncer de vejiga puede variar ampliamente, en parte debido a que hay un elemento de subjetividad en la interpretación de los resultados. Por lo tanto, la citología no es ideal para cribar y vigilar el cáncer de vejiga.

Mcm5 es un biomarcador de cáncer (documento WO99021014). Un nivel aumentado de proteínas Mcm, tal como Mcm5, en el sedimento urinario está asociado con cambios malignos en la próstata. Por lo tanto, los niveles aumentados de estas proteínas Mcm podrían usarse para detectar el cáncer de próstata. Usando el DELFIA® (forma siglada de *dissociation-enhanced lanthanide fluorometric immunoassay* inmunoensayo fluorométrico de intensificación disociativa de la fluorescencia por lantánido) y los anticuerpos monoclonales anti Mcm5 4B4 y 12A7 en un doble ensayo de anticuerpos, Dudderidge *et al.* (*BJC*, 103, 701 - 707; 2010) investigaron el uso de Mcm5 como un biomarcador urinario para la detección del cáncer de próstata y concluyeron que 'parece ser un método simple, preciso y no invasivo para la identificación de pacientes con cáncer de próstata'. En comparación con la prueba de PSA, que tiene una especificidad del 30 %, la especificidad de Mcm5 se estimó como de entre el 73 % y

93 %. Es importante destacar que, la hiperplasia prostática benigna no generó resultados positivos falsos, lo cual es una desventaja de la prueba de PSA.

5 Sin embargo, no hay una divulgación de secuencias de anticuerpos que se unan a Mcm5 de una manera altamente específica y, por lo tanto, que sean adecuadas para diseñar un ensayo de alta afinidad para Mcm5.

Sumario de la invención

10 La presente invención proporciona anticuerpos que se unen a biomarcadores tales como una proteína Mcm, por ejemplo Mcm5, de una manera altamente específica. Estos anticuerpos son útiles para detectar los niveles del biomarcador. Por ejemplo, estos anticuerpos pueden usarse en pruebas de diagnóstico para detectar cánceres urológicos.

15 Actualmente, la detección de los cánceres urológicos, en particular del cáncer de próstata o de vejiga, es difícil y puede precisar técnicas invasivas. Mcm5 es un biomarcador de cáncer. Los presentes inventores han desarrollado dos anticuerpos que se unen a Mcm5, pero se unen a epítomos distintos entre sí (12A7 se une a la SEQ ID NO: 1 y 4B4 se une a la SEQ ID NO: 2). Dichos anticuerpos son ventajosos dado que pueden usarse en ensayos para detectar Mcm5 (o proteínas Mcm similares que contienen estos epítomos). En particular, estos anticuerpos pueden usarse en un ensayo que precisa la inmovilización del antígeno Mcm5. Por ejemplo, Mcm5 podría detectarse usando
20 un ensayo inmunométrico con dos sitios. Podría unirse a una placa un primer anticuerpo que se une a Mcm5. Esta placa podría exponerse a una muestra, tal como una muestra de orina. Cualquier Mcm5 en la muestra será inmovilizada ("*capturado*") por el primer anticuerpo. Después, la placa puede lavarse, dejando el Mcm5 inmovilizada unida al primer anticuerpo, pero eliminando cualquier otro contaminante. Puede usarse un segundo anticuerpo que se une a Mcm5 para detectar la concentración de Mcm5 unida. Este segundo anticuerpo debe estar conjugado con
25 un agente de detección, tal como Eu^{3+} . La placa puede exponerse al segundo anticuerpo y el segundo anticuerpo se unirá a Mcm5 inmovilizada. Cualquier exceso de anticuerpo puede eliminarse mediante lavado. La cantidad restante de segundo anticuerpo se puede detectar mediante cuantificación de fluorescencia, que medirá la cantidad de Eu^{3+} presente. La cantidad restante de segundo anticuerpo será proporcional a la concentración de Mcm5 en la muestra.

30 Sin embargo, para que desarrollar tal ensayo, deben identificarse dos anticuerpos que se unan a Mcm5. Adicionalmente, estos dos anticuerpos deben unirse a epítomos distintos entre sí, pero además los dos epítomos distintos a los que se unen los dos anticuerpos deben estar ubicados desde el punto de vista espacial de forma que ambos anticuerpos puedan unirse a Mcm5 al mismo tiempo (sin impedimento estérico sustancial). Los presentes inventores han desarrollado dos de tales anticuerpos (llamados 12A7 y 4B4). Estos dos anticuerpos se unen a la
35 SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2, respectivamente. La SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 2 representan dos epítomos de Mcm5 distintos que están dispuestos de forma espacial en Mcm5 como para permitir que los dos anticuerpos se unan a Mcm5 al mismo tiempo. Esto se demuestra en los Ejemplos 2 y 3. Los presentes inventores son los primeros en identificar dos epítomos de Mcm5 que están dispuestos de forma que los anticuerpos para cada epítomo puedan unirse simultáneamente. Adicionalmente, los inventores son los primeros en proporcionar secuencias de dos
40 anticuerpos que pueden unirse independientemente a Mcm5.

Por consiguiente, en un primer aspecto de la invención se proporciona un anticuerpo que:

45 (i) se une a un epítomo que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o 2; o
(ii) comprende:

a.

50 la CDRH1 de 12A7 que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 9;
la CDRH2 de 12A7 que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 11;
la CDRH3 de 12A7 que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 13;
la CDRL1 de 12A7 que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 3;
la CDRL2 de 12A7 que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 5; y
55 la CDRL3 de 12A7 que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 7; o

b.

60 la CDRH1 de 4B4 que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 21;
la CDRH2 de 4B4 que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 23;
la CDRH3 de 4B4 que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 25;
la CDRL1 de 4B4 que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 15;
la CDRL2 de 4B4 que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 17; y
65 la CDRL3 de 4B4 que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 19.

En un segundo aspecto de la invención, se proporciona una composición que comprende el anticuerpo de la invención.

En un tercer aspecto de la invención, se proporciona una línea celular de hibridoma que tiene la capacidad de producir el anticuerpo de la invención.

5 En un cuarto aspecto de la invención, se proporciona una composición que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la cadena pesada de un anticuerpo de la invención y una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende la cadena ligera de un anticuerpo de la invención.

10 En un quinto aspecto de la invención, se proporciona una composición que comprende una secuencia de ácido nucleico al menos el 98 %, 99 % o 100 % idéntica a 28 o 32, y una secuencia de ácido nucleico al menos el 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 30 o 34.

15 En un sexto aspecto de la invención, se proporciona una composición que comprende una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 28 o 32, y una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 30 o 34.

En un séptimo aspecto de la invención, se proporciona un vector que comprende un ácido nucleico de la invención.

20 En un octavo aspecto de la invención, se proporciona una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico o vector de la invención.

En un noveno aspecto de la invención, se proporciona un método para fabricar un anticuerpo, que comprende:

- (i) cultivar una línea celular de hibridoma o una célula hospedadora de la invención; y
- (ii) aislar un anticuerpo de la línea celular de hibridoma o de la célula hospedadora.

25 En un décimo aspecto de la invención, se proporciona un kit que comprende:

- (i) una composición que comprende un primer anticuerpo de la invención; y
- (ii) una composición que comprende un segundo anticuerpo que se une a Mcm5.

30 En un undécimo aspecto de la invención, se proporciona un kit que comprende:

- (i) una composición que comprende un primer anticuerpo de la invención; y
- (ii) una composición que comprende un segundo anticuerpo de la invención.

35 En un duodécimo aspecto de la invención, se proporciona un método para determinar la concentración de Mcm5 en una muestra, que comprende las siguientes etapas:

- (i) proporcionar un primer anticuerpo inmovilizado, que es un anticuerpo de la invención inmovilizado en un soporte sólido;
- (ii) exponer la muestra al primer anticuerpo inmovilizado, de forma que la Mcm5 en la muestra se pueda unir al anticuerpo inmovilizado para proporcionar la Mcm5 inmovilizada;
- (iii) proporcionar un segundo anticuerpo marcado, que es un anticuerpo de la invención conjugado con un marcador;
- 45 (iv) exponer la Mcm5 inmovilizada al segundo anticuerpo marcado, de forma que el segundo anticuerpo marcado se pueda unir a la Mcm5; y
- (v) detectar la concentración del segundo anticuerpo marcado.

50 Descripción detallada

Anticuerpo

La presente invención proporciona un anticuerpo. El término '*anticuerpo*' puede referirse a formas de origen natural o a anticuerpos recombinantes tales como anticuerpos monocatenarios, anticuerpos quiméricos o anticuerpos humanizados. Puede considerarse que los términos '*anticuerpo*' y '*anticuerpos*' también abarcan fragmentos de anticuerpos que pueden unirse a una proteína diana, tal como una proteína Mcm como Mcm5. Dichos fragmentos pueden incluir un Fab'₂, un F'(ab)₂, un Fv, anticuerpos monocatenarios o diacuerpos. En una realización preferente, los anticuerpos de la invención son de origen natural, anticuerpos de longitud completa (en lugar de fragmentos). En una realización preferente, el anticuerpo es un anticuerpo de ratón (es decir, obtenido originalmente de células de bazo de ratón).

65 En general, los anticuerpos están formados por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Cada cadena pesada está compuesta por una región constante de la cadena pesada (CH) y una región variable de la cadena pesada (VH). De forma similar, cada cadena ligera está compuesta por una región constante de la cadena ligera (CL) y una región variable de la cadena ligera (VL). Las regiones VH y VL comprenden regiones que definen la complementariedad (CDR). Las CDR principalmente son responsables de la unión específica a la proteína diana.

Un anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo de cualquier clase, en particular una IgG, IgM o IgA. En una realización preferente, el anticuerpo es un anticuerpo IgG.

5 La expresión "*anticuerpo monoclonal*" pretende referirse a un anticuerpo que se obtiene a partir de una población de anticuerpos sustancialmente similares, es decir, a partir de una población de anticuerpos que son idénticos, excepto por una minoría de variantes naturales. Una población de anticuerpos monoclonales se unirá al mismo epítipo. Los anticuerpos monoclonales se pueden producir mediante una diversidad de técnicas bien conocidas por el experto en la materia y que incluyen los métodos divulgados en "Monoclonal Antibodies: A manual of techniques", H Zola (CRC Press, 1988) y en "Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Application", SG Hurrell (CRC Press, 1982).
10 El anticuerpo de la invención es un anticuerpo monoclonal.

Diana del anticuerpo

15 El anticuerpo se une específicamente a Mcm5. El anticuerpo se une a al menos una de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2. El anticuerpo se une específicamente a al menos una de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2.

Mcm5 es un supuesto factor permisivo de la replicación de ADN y un miembro de la familia de proteínas MCM (mantenimiento de minicromosomas). Las proteínas MCM se unen a la cromatina y se cree que presentan actividad helicasa y, por lo tanto, son componentes centrales de la replicación del ADN. Mcm5 está regulada al alza en la transición de la fase G0 a G1/S del ciclo celular y puede participar activamente en la regulación del ciclo celular; Mcm5 puede interactuar con al menos otros dos miembros de la familia MCM.
20

Las proteínas MCM 2 - 7 comprenden parte de los complejos de prerreplicación que se forman en la cromatina y que son requisitos previos esenciales, o factores permisivos, para la posterior replicación del ADN. Los complejos de proteínas MCM actúan como helicasas replicativas y, por lo tanto, son componentes centrales de la maquinaria de replicación del ADN. Las MCM están reguladas al alza en la transición de la fase G0 a G1/S del ciclo celular y participan activamente en la regulación del ciclo celular. Las proteínas MCM forman una estructura anular alrededor de la cromatina.
25

30 El gen de Mcm5 humana mapea en 22q13.1 y la proteína Mcm5 madura consiste en 734 aminoácidos (SEQ ID NO: 35; UNIPROT P33992: factor permisivo de replicación MCM5, ADN HUMANO). Sin embargo, las secuencias del gen Mcm5 puede diferir ligeramente entre individuos. Por este motivo, la frase "*se une a Mcm5*" se refiere a anticuerpos que se unen a la SEQ ID NO: 35, pero también a anticuerpos que se unen a un polipéptido que tiene secuencias de al menos el 90 %, 95 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 35. En una realización preferente, el anticuerpo se une a un polipéptido el 100 % idéntico a la SEQ ID NO: 35. Adicionalmente, un anticuerpo de la invención se unirá a un epítipo (fragmento) de Mcm5 (por ejemplo, la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2). Por lo tanto, la expresión "*anticuerpo que se une a Mcm5*" se refiere a un anticuerpo que se une a un único epítipo de Mcm5, tal como la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2.
35

40 Para los fines de la presente invención, la expresión '*afinidad de unión*' se refiere a la capacidad de un anticuerpo de unirse a su diana. Para los fines de la presente invención, la expresión '*se une específicamente*' se refiere a un anticuerpo que se une a una diana, tal como Mcm5, con una afinidad de unión que es al menos 2 veces, 10 veces, 50 veces o 100 veces mayor que su afinidad de unión por la unión a otra molécula no diana. En una realización, la molécula no diana es una proteína Mcm, distinta de Mcm5, tal como Mcm 2. Preferentemente, un anticuerpo de la invención tiene la capacidad de unirse a una proteína Mcm, de forma opcional a Mcm5, con una afinidad de unión que es al menos 2 veces, 10 veces, 50 veces o 100 veces mayor que su afinidad de unión por la unión a otra molécula no diana. Incluso más preferentemente, un anticuerpo de la invención tiene la capacidad de unirse a la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2 con una afinidad de unión que es al menos 2 veces, 10 veces, 50 veces o 100 veces mayor que su afinidad de unión por la unión a otra molécula no diana.
45

50 Un método preferente para la evaluación de la afinidad de unión para Mcm5 es mediante ELISA. Preferentemente, un anticuerpo de la invención tiene una afinidad por Mcm5 (medida como una CE50 o el 50 % de la concentración de unión máxima, como se describe en el Ejemplo 2) de 2500 ng/ml o menor, 1500 ng/ml o menor, 1000 ng/ml o menor, 600 ng/ml o menor, 50 ng/ml o menor, 30 ng/ml o menor, 20 ng/ml o menor, o 10 ng/ml o menor. La CE50 normalmente será superior a 1 ng/ml y, por lo tanto, la CE50 puede estar entre 1 ng/ml y cualquiera de los límites superiores especificados en la oración precedente. Se conocen en la técnica otros ensayos convencionales para evaluar la capacidad de unión de ligandos, tales como anticuerpos para con sus dianas, incluyendo, por ejemplo, transferencia de Western, los RIA y los análisis por citometría de flujo. La cinética de unión (por ejemplo, la afinidad de unión) del anticuerpo también se puede evaluar mediante ensayos convencionales conocidos en la técnica, tal como mediante análisis de resonancia de plasmón superficial (RPS) (por ejemplo, sistema Biacore™). La constante de afinidad (KD) para la unión a Mcm5 está preferentemente en el intervalo de 1-10 000 nM, 1-1000 nM, 1-500 nM, 1-100 nM, 1-50 nM o 1-10 nM. La constante de asociación (ka) está preferentemente en el intervalo de 0,4-3,4 x 10⁶ 1/M. La constante de disociación (kd) está preferentemente en el intervalo de 1-10 x 10⁻³ 1/s. Normalmente, estos valores pueden determinarse por RPS (resonancia de plasmón superficial).
55
60

65

Regiones determinantes de complementariedad (las CDR)

Un anticuerpo de la invención comprende las CDR de los anticuerpos 12A7 o 4B4, es decir:

- 5 a. la CDRH1 de 12A7 que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 9;
 b. la CDRH2 de 12A7 que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 11;
 c. la CDRH3 de 12A7 que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 13;
 d. la CDRL1 de 12A7 que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 3;
 e. la CDRL2 de 12A7 que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 5; y
 10 f. la CDRL3 de 12A7 que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 7; o
 g. la CDRH1 de 4B4 que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 21;
 h. la CDRH2 de 4B4 que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 23;
 i. la CDRH3 de 4B4 que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 25;
 j. la CDRL1 de 4B4 que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 15;
 15 k. la CDRL2 de 4B4 que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 17; y
 l. la CDRL3 de 4B4 que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 19.

Los anticuerpos que tienen las mismas CDR que los anticuerpos 4B4 y 12A7 pueden diferir sustancialmente de las secuencias de 4B4 y 12A7 en otras regiones. Dichos anticuerpos pueden, por ejemplo, ser fragmentos de anticuerpos.

La frase "secuencia que difiere de la SEQ ID NO: 3 en una única sustitución de aminoácido" se refiere a la posibilidad de reemplazar un aminoácido definido en la SEQ ID NO: 3 por un aminoácido distinto. Preferentemente, tal reemplazo es una sustitución conservativa de aminoácidos. Los siguientes ocho grupos contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones normalmente conservativas entre sí:

- 1) Alanina, Glicina;
 2) Ácido aspártico, Acido glutámico;
 3) Asparagina, Glutamina;
 30 4) Arginina, Lisina;
 5) Isoleucina, Leucina, Metionina, Valina;
 6) Fenilalanina, Tirosina, Triptófano;
 7) Serina, Treonina; y
 8) Cisteína, Metionina.

En una divulgación, el anticuerpo de la invención comprende al menos una CDR de la cadena pesada de 12A7 (la CDRH1 de 12A7, la CDRH2 de 12A7 o la CDRH3 de 12A7), así como al menos una CDR de la cadena ligera de 12A7 (la CDRL1 de 12A7, la CDRL2 de 12A7 o la CDRL3 de 12A7). En una divulgación adicional, el anticuerpo de la invención comprende al menos dos CDR de la cadena pesada de 12A7 y al menos dos CDR de la cadena ligera de 12A7. En una divulgación, el anticuerpo de la invención comprende las tres CDR de la cadena pesada de 12A7 y/o las tres CDR de la cadena ligera de 12A7. En una divulgación el anticuerpo de la invención comprende la CDRL1 de 12A7 y la CDRL2 de 12A7, la CDRL1 de 12A7 y la CDRL3 de 12A7, la CDRL1 de 12A7 y la CDRH1 de 12A7, la CDRL1 de 12A7 y la CDRH2 de 12A7, la CDRL1 de 12A7 y la CDRH3 de 12A7, la CDRL2 de 12A7 y la CDRH1 de 12A7, la CDRL2 de 12A7 y la CDRH2 de 12A7, la CDRL2 de 12A7 y la CDRH3 de 12A7, la CDRL3 de 12A7 y la CDRH1 de 12A7, la CDRL3 de 12A7 y la CDRH2 de 12A7, la CDRL3 de 12A7 y la CDRH3 de 12A7, la CDRH1 de 12A7 y la CDRH2 de 12A7, la CDRH1 de 12A7 y la CDRH3 de 12A7, o la CDRH2 de 12A7 y la CDRH3 de 12A7.

En una divulgación, el anticuerpo de la invención comprende al menos una CDR de la cadena pesada de 4B4 (la CDRH1 de 4B4, la CDRH2 de 4B4 o la CDRH3 de 4B4), así como al menos una CDR de la cadena ligera de 4B4 (la CDRL1 de 4B4, la CDRL2 de 4B4 o la CDRL3 de 4B4). En una divulgación adicional, el anticuerpo de la invención comprende al menos dos CDR de la cadena pesada de 4B4 y al menos dos CDR de la cadena ligera de 4B4. En una divulgación, el anticuerpo de la invención comprende las tres CDR de la cadena pesada de 4B4 y/o las tres CDR de la cadena ligera de 4B4. En una divulgación el anticuerpo de la invención comprende la CDRL1 de 4B4 y la CDRL2 de 4B4, la CDRL1 de 4B4 y la CDRL3 de 4B4, la CDRL1 de 4B4 y la CDRH1 de 4B4, la CDRL1 de 4B4 y la CDRH2 de 4B4, la CDRL1 de 4B4 y la CDRH3 de 4B4, la CDRL2 de 4B4 y la CDRL3 de 4B4, la CDRL2 de 4B4 y la CDRH1 de 4B4, la CDRL2 de 4B4 y la CDRH2 de 4B4, la CDRL2 de 4B4 y la CDRH3 de 4B4, la CDRL3 de 4B4 y la CDRH1 de 4B4, la CDRL3 de 4B4 y la CDRH2 de 4B4, la CDRL3 de 4B4 y la CDRH3 de 4B4, la CDRH1 de 4B4 y la CDRH2 de 4B4, la CDRH1 de 4B4 y la CDRH3 de 4B4, o la CDRH2 de 4B4 y la CDRH3 de 4B4.

En una divulgación, el anticuerpo de la invención comprende al menos una CDR que tiene una secuencia idéntica a la descrita en una cualquiera de la SEQ ID NO: 3 (CDRL1 de 12A7), la SEQ ID NO:5 (12A7 CDRL2), la SEQ ID NO: 7 (CDRL3 de 12A7), la SEQ ID NO: 9 (CDRH1 de 12A7), la SEQ ID NO: 11 (CDRH2 de 12A7), la SEQ ID NO: 13 (CDRH3 de 12A7), la SEQ ID NO: 15 (CDRL1 de 4B4), la SEQ ID NO: 17 (CDRL2 de 4B4), la SEQ ID NO: 19 (CDRL3 de 4B4), la SEQ ID NO: 21 (CDRH1 de 4B4), la SEQ ID NO: 23 (CDRH2 de 4B4) o la SEQ ID NO:25 (CDRH3 de 4B4). Cuando un anticuerpo de la invención comprende la CDRL2 de 12A7, la CDRL2 de 12A7 tiene la

secuencia descrita en la SEQ ID NO: 5. Cuando un anticuerpo de la invención comprende la CDRL1 de 12A7, la CDRL1 de 12A7 tiene la secuencia descrita en la SEQ ID NO: 3. Cuando un anticuerpo de la invención comprende la CDRL3 de 12A7, la CDRL3 de 12A7 tiene la secuencia descrita en la SEQ ID NO: 7. Cuando un anticuerpo de la invención comprende la CDRH1 de 12A7, la CDRH1 de 12A7 tiene la secuencia descrita en la SEQ ID NO: 9.

5 Cuando un anticuerpo de la invención comprende la CDRH2 de 12A7, la CDRH2 de 12A7 tiene la secuencia descrita en la SEQ ID NO: 11. Cuando un anticuerpo de la invención comprende la CDRH3 de 12A7, la CDRH3 de 12A7 tiene la secuencia descrita en la SEQ ID NO: 13. Cuando un anticuerpo de la invención comprende la CDRL1 de 4B4, la CDRL1 de 4B4 tiene la secuencia descrita en la SEQ ID NO: 15. Cuando un anticuerpo de la invención comprende la CDRL2 de 4B4, la CDRL2 de 4B4 tiene la secuencia descrita en la SEQ ID NO: 17. Cuando un anticuerpo de la invención comprende la CDRL3 de 4B4, la CDRL3 de 4B4 tiene la secuencia descrita en la SEQ ID NO: 19. Cuando un anticuerpo de la invención comprende la CDRH1 de 4B4, la CDRH1 de 4B4 tiene la secuencia descrita en la SEQ ID NO: 21. Cuando un anticuerpo de la invención comprende la CDRH2 de 4B4, la CDRH2 de 4B4 tiene la secuencia descrita en la SEQ ID NO: 23. Cuando un anticuerpo de la invención comprende la CDRH3 de 4B4, la CDRH3 de 4B4 tiene la secuencia descrita en la SEQ ID NO: 25.

15 Preferentemente, un anticuerpo que comprende al menos una de las CDR de 12A7 o de 4B4 se une (de forma opcional se une específicamente) a Mcm5. Aún más preferentemente, un anticuerpo que comprende al menos una de las CDR de 12A7 o de 4B4 se une (de forma opcional se une específicamente) a la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2.

20 **Secuencias de la región variable de las cadenas pesada y ligera**

El anticuerpo de la invención comprende preferentemente una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de al menos el 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 29 o 33 y/o una secuencia de la región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de al menos el 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 27 o 31. Dicho anticuerpo se denomina en el presente documento *"anticuerpo variante de la invención"*.

30 En una realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia al menos el 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 29. En una realización adicional, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia al menos el 98% idéntica a la SEQ ID NO: 29. En una realización, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia al menos el 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 27. En una realización adicional, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia al menos el 98% idéntica a la SEQ ID NO: 27. En una realización adicional, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia al menos el 95% idéntica a la SEQ ID NO: 27 y una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia al menos el 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 29. En una realización preferente, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia al menos el 98 % idéntica a la SEQ ID NO: 29 y una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia al menos el 98% idéntica a la SEQ ID NO: 27.

40 En una realización adicional, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia al menos el 95% idéntica a la SEQ ID NO: 33. En una realización adicional, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia al menos el 98% idéntica a la SEQ ID NO: 33. En una realización adicional, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia al menos el 95% idéntica a la SEQ ID NO: 31. En una realización adicional, el anticuerpo comprende una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia al menos el 98% idéntica a la SEQ ID NO: 31. En una realización adicional, el anticuerpo tiene una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia al menos el 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 33 y una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia al menos el 95% idéntica a la SEQ ID NO: 31. En una realización preferente, el anticuerpo tiene una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia al menos el 98 % idéntica a la SEQ ID NO: 33 y una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia al menos el 98% idéntica a la SEQ ID NO: 31.

55 Como saben los expertos en la materia, los anticuerpos contienen múltiples regiones, que incluyen las regiones marco conservadas. Es poco probable que la delección o adición de aminoácidos en las regiones marco conservadas afecte la capacidad del anticuerpo para unirse a su diana. Por otro lado, es considerablemente más probable que las mutaciones en las CDR afecten la capacidad de un anticuerpo de unirse a una diana. Por lo tanto, los anticuerpos variantes se unen a un epítipo que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o 2, o tienen CDR que son idénticas a las CDR de los anticuerpos 12A7 o 4B4. Los anticuerpos variantes de la invención pueden tener regiones marco conservadas que difieren en secuencia de forma bastante significativa de las descritas en la SEQ ID NO: 27, 29, 31 o 33. Cuando un anticuerpo de la invención comprende una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de al menos el 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 29, el anticuerpo comprende adicionalmente la CDRH1 de 12A7, la CDRH2 de 12A7 y la CDRH3 de 12A7. Un experto en la materia entiende que, dado que la especificidad de unión a la diana está determinada por las CDR, un anticuerpo que comprende las CDR de 12A7 aún puede unirse a Mcm5 incluso si el resto de la secuencia del anticuerpo es bastante variable. Por este motivo, cuando el anticuerpo comprende la CDRH1 de 12A7, la CDRH2 de 12A7 y la CDRH3 de 12A7, el anticuerpo comprende preferentemente una región variable de la cadena pesada que tiene una

secuencia al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 29. En una realización más preferente, el anticuerpo de la invención comprende la CDRH1 de 12A7, la CDRH2 de 12A7 y la CDRH3 de 12A7, y comprende una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia al menos el 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 29.

5 Cuando un anticuerpo de la invención comprende una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de al menos el 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 33, el anticuerpo comprende adicionalmente la CDRH1 de 4B4, la CDRH2 de 4B4 y la CDRH3 de 4B4. Un experto en la materia entiende que, dado que la especificidad de unión a la diana está determinada por las CDR, un anticuerpo que comprende las CDR de 4B4 aún puede unirse a M_{cm5} incluso si el resto de la secuencia del anticuerpo es bastante variable. Por este motivo, cuando el anticuerpo comprende la CDRH1 de 4B4, la CDRH2 de 4B4 y la CDRH3 de 4B4, el anticuerpo comprende preferentemente una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 33. En una realización más preferente, el anticuerpo de la invención comprende la CDRH1 de 4B4, la CDRH2 de 4B4 y la CDRH3 de 4B4, y comprende una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia al menos el 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 33.

15 Cuando un anticuerpo de la invención comprende una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de al menos el 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 27, el anticuerpo comprende adicionalmente la CDRL1 de 12A7, la CDRL2 de 12A7 y la CDRL3 de 12A7. Un experto en la materia entiende que, dado que la especificidad de unión a la diana está determinada por las CDR, un anticuerpo que comprende las CDR de 12A7 aún puede unirse a M_{cm5} incluso si el resto de la secuencia del anticuerpo es bastante variable. Por este motivo, cuando el anticuerpo comprende la CDRL1 de 12A7, la CDRL2 de 12A7 y la CDRL3 de 12A7, el anticuerpo comprende preferentemente una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 27. En una realización más preferente, el anticuerpo de la invención comprende la CDRL1 de 12A7, la CDRL2 de 12A7 y la CDRL3 de 12A7, y comprende una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia al menos el 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 27.

30 Cuando un anticuerpo de la invención comprende una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de al menos el 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 31, el anticuerpo comprende adicionalmente la CDRL1 de 4B4, la CDRL2 de 4B4 y la CDRL3 de 4B4. Un experto en la materia entiende que, dado que la especificidad de unión a la diana está determinada por las CDR, un anticuerpo que comprende las CDR de 4B4 aún puede unirse a M_{cm5} incluso si el resto de la secuencia del anticuerpo es bastante variable. Por este motivo, cuando el anticuerpo comprende la CDRL1 de 4B4, la CDRL2 de 4B4 y la CDRL3 de 4B4, el anticuerpo comprende preferentemente una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia al menos el 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 31. En una realización más preferente, el anticuerpo de la invención comprende la CDRL1 de 4B4, la CDRL2 de 4B4 y la CDRL3 de 4B4, y comprende una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia al menos el 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 31.

En una realización adicional de la invención, el anticuerpo de la invención comprende:

- 40 (i) la CDRH1 de 12A7, la CDRH2 de 12A7 y la CDRH3 de 12A7;
 (ii) una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia al menos el 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 29;
 (iii) la CDRL1 de 12A7, la CDRL2 de 12A7 y la CDRL3 de 12A7; y
 (iv) una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia al menos el 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 27.

En una realización adicional, el anticuerpo de la invención comprende:

- 50 (i) la CDRH1 de 4B4, la CDRH2 de 4B4 y la CDRH3 de 4B4;
 (ii) una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia al menos el 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 33;
 (iii) la CDRL1 de 4B4, la CDRL2 de 4B4 y la CDRL3 de 4B4; y
 (iv) una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia al menos el 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 31.

55 Un anticuerpo que tiene una secuencia variable de la cadena pesada idéntica a la SEQ ID NO: 29 y una secuencia variable de la cadena ligera idéntica a la SEQ ID NO: 27, puede denominarse anticuerpo 12A7. Un anticuerpo que tiene una secuencia variable de la cadena pesada idéntica a la SEQ ID NO: 33 y una secuencia variable de la cadena ligera idéntica a la SEQ ID NO: 31, puede denominarse un anticuerpo 4B4.

60 En algunas realizaciones, el anticuerpo variante de la invención competirá por la unión a M_{cm5} con el anticuerpo 12A7. De manera similar, en algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo variante de la invención competirá por la unión a M_{cm5} con el anticuerpo 4B4. Para los fines de la presente invención, un anticuerpo es 'al menos el 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntico' a un segundo anticuerpo si las secuencias tienen al menos el 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad cuando se evalúa usando ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) con los siguientes parámetros:

Parámetros de alineación por pares -Método: preciso, Matriz: PAM, Penalización de apertura de hueco: 10,00, Penalización de extensión de hueco: 0,10;

Parámetros de alineación múltiple -Matriz: PAM, Penalización de apertura de hueco: 10,00, identidad % para retraso: 30, Penalizar huecos finales: en funcionamiento, Distancia de separación de huecos: 0, Matriz negativa: no, Penalización de extensión de hueco: 0,20, Penalizaciones de huecos específicas de restos: en funcionamiento, Penalizaciones de huecos hidrófilos: en funcionamiento, Restos hidrófilos: GPSNDQEKR.

Es parte del conocimiento de la persona experta en la materia cómo fabricar anticuerpos variantes que se unen a Mcm5. Dichos anticuerpos variantes pueden comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 50 o 100 mutaciones de sustitución o delección, en comparación con las SEQ ID NO: 27, 29, 31 o 33. Los anticuerpos variantes de 'delección' pueden comprender la delección de 1, 2, 3, 4, 5 o más aminoácidos o, en algunos casos, la delección de regiones completas de las SEQ ID NO: 27, 29, 31 o 33. Las variantes de 'sustitución' pueden comprender el reemplazo de 1, 2, 3, 4, 5 o más aminoácidos por el mismo número de aminoácidos nuevos.

Preferentemente, los anticuerpos variantes comprenden secuencias que difieren de las SEQ ID NO: 27, 29, 31 o 33 en sustituciones de aminoácidos conservativas (de forma opcional solo en sustituciones de aminoácidos conservativas). El experto en la materia es consciente de que es poco probable que tales sustituciones conservativas modifiquen las propiedades de unión de un anticuerpo.

Anticuerpos que compiten con los anticuerpos de la invención

La divulgación proporciona adicionalmente un anticuerpo que compite con un anticuerpo de la invención que:

(i) se une a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o 2.

(ii) comprende al menos una CDR seleccionada del grupo que consiste en: la CDRH1 de 12A7, la CDRH2 de 12A7, la CDRH3 de 12A7, la CDRL1 de 12A7, la CDRL2 de 12A7 y la CDRL3 de 12A7, o la CDRH1 de 4B4, la CDRH2 de 4B4, la CDRH3 de 4B4, la CDRL1 de 4B4, la CDRL2 de 4B4 y la CDRL3 de 4B4.

Preferentemente, la divulgación proporciona un anticuerpo que compite con un anticuerpo que comprende la CDRH1 de 12A7, la CDRH2 de 12A7, la CDRH3 de 12A7, la CDRL1 de 12A7, la CDRL2 de 12A7 y la CDRL3 de 12A7, o un anticuerpo que comprende la CDRH1 de 4B4, la CDRH2 de 4B4, la CDRH3 de 4B4, la CDRL1 de 4B4, la CDRL2 de 4B4 y la CDRL3 de 4B4. Incluso más preferentemente, la divulgación proporciona un anticuerpo que compite con un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia el 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 29 o 33, y una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia el 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 27 o 31. La divulgación proporciona un anticuerpo que compite con el anticuerpo 12A7 o con el anticuerpo 4B4.

Está dentro de las competencias de los expertos en la materia determinar si un anticuerpo compite con otro anticuerpo de la invención.

Por ejemplo, se puede realizar un ensayo de ELISA inmovilizando el anticuerpo de referencia, tal como un anticuerpo 4B4 o 12A7, en una placa ELISA. Después, la placa se bloquea con un agente bloqueante adecuado. Se añade un exceso de un segundo anticuerpo (el segundo anticuerpo es el anticuerpo cuya capacidad para competir con el anticuerpo 4B4 o 12A7 se evaluará, por ejemplo un anticuerpo de la invención que compite con 4B4 o 12A7). Se añade Mcm5.

Después de un período de incubación adecuado, la placa ELISA se lava y se añade un agente de detección de Mcm5 para medir la cantidad de Mcm5 unida al anticuerpo de referencia inmovilizado. Si esta prueba se va a utilizar para detectar si un anticuerpo compite con 4B4, un reactivo de detección adecuado es un anticuerpo 12A7 marcado. De forma similar, si esta prueba se va a utilizar para detectar si un anticuerpo compite con 12A7, un reactivo de detección adecuado es un anticuerpo 4B4 marcado. La concentración a la que se produce el 50 % de inhibición se conoce como Ki. Un anticuerpo que compite con 12A7 o 4B4 puede unirse con una Ki 2 veces, 5 veces, 10 veces, 50 veces o 100 veces más baja que un anticuerpo que no se une a Mcm5.

Un anticuerpo que compite con un anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo que se une al mismo epítipo (por ejemplo, la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2). Es posible determinar a qué epítipo se une un anticuerpo realizando un experimento en que la proteína diana, tal como Mcm5, se digiere para dar fragmentos (por ejemplo, ver el Ejemplo 3 a continuación). Después puede determinarse la afinidad con la que los anticuerpos 12A7 y 4B4 se unen a cada uno de los fragmentos. Una vez que se ha determinado el fragmento (que representa el epítipo) al que el primer anticuerpo se une con una afinidad razonable, el epítipo puede sintetizarse. Después, es posible determinar si un segundo anticuerpo tiene la capacidad de unirse al mismo epítipo midiendo la afinidad de unión de ese segundo anticuerpo al fragmento.

Anticuerpos marcados

Un anticuerpo de la invención se puede conjugar con un marcador (por ejemplo, Europio³⁺ o peroxidasa de rábano

picante). El marcador puede unirse directamente o puede unirse a través de un enlazador (tal como ácido adípico dihidrazida (ADH por sus siglas en inglés: *adipic acid dihydrazide*)).

5 El marcador se puede unir por conjugación química. Se conocen en la técnica métodos de conjugación de marcadores con anticuerpos. Por ejemplo, la conjugación de carbodiimida (Bauminger y Wilchek (1980) *Methods Enzymol.* 70, 151-159) se pueden usar para conjugar marcadores a anticuerpos. Además, se pueden usar otros métodos para conjugar un marcador con un anticuerpo. Por ejemplo, se puede usar la oxidación con peryodato de sodio seguida de alquilación reductora de reactivos apropiados, al igual que la reticulación con glutaraldehído. Sin embargo, se reconoce que, independientemente de qué método de producción de un conjugado de la invención se
10 seleccione, debe hacerse una determinación de que el anticuerpo conjugado mantiene su capacidad de direccionamiento y de que el marcador conjugado mantiene su función.

En una realización preferente, el anticuerpo de la invención se marca por conjugación con Europio. Esto se puede lograr utilizando un kit de marcaje con Eu DELFIA^(R) de EG&G Wallac y siguiendo el protocolo del fabricante.
15

Composiciones

En aspectos adicionales de la invención, se proporcionan composiciones que comprenden un anticuerpo de la invención. Dichas composiciones pueden comprender adicionalmente agentes estabilizadores adecuados que
20 tengan la capacidad de estabilizar el anticuerpo en solución. Por ejemplo, la composición puede comprender un tampón seleccionado del grupo que consiste en TAPS (ácido 3-[[tris(hidroximetil)metil]amino] propanosulfónico), Bicina (N,N-bis(2-hidroxietil)glicina), Tris (tris(hidroximetil)metilamina), Tricina (N-tris(hidroximetil)metilglicina), TAPSO (3-[ácido N-Tris(ácido hidroximetil)metilamino]-2-hidroxiopropanosulfónico), HEPES (ácido 4-2-hidroxietil-1-piperazinetasulfónico), solución salina tamponada con fosfato y MOPS (ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico). En una realización preferente, la composición comprende solución salina tamponada con fosfato a pH 7,6. En una
25 realización preferente adicional, la composición comprende solución salina tamponada con fosfato con azida sódica entre el 0,01 % y el 0,09 %. Preferentemente, la composición comprende agentes adecuados para almacenar los anticuerpos de la invención a temperatura ambiente o a una temperatura inferior o igual a 15 °C, 10 °C, 7 °C, 5 °C, 0 °C, -10 °C o -25 °C. En una realización preferente, la composición comprende agentes adecuados para almacenar los anticuerpos de la invención a una temperatura de entre 2 °C y 8 °C. En una realización adicional, la composición
30 comprende un agente estabilizador tal como un azúcar, por ejemplo lactosa o trehalosa.

Si el anticuerpo de la invención está conjugado, por ejemplo, a un marcador de Europio, es ventajoso incluir en la composición un estabilizador de BSA purificada al 7,5 %.
35

Ácidos nucleicos y vectores

Un polinucleótido puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica cualquier anticuerpo como se describe en el presente documento. Las expresiones "*molécula de ácido nucleico*" y "*polinucleótido*" se usan
40 indistintamente en el presente documento y se refieren a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos o análogos de los mismos.

Un ácido nucleico que "*codifica*" un polipéptido seleccionado es una molécula de ácido nucleico que se transcribe (en el caso del ADN) y se traduce (en el caso de ARNm) para dar un polipéptido *in vivo* cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Los límites de la secuencia codificante están determinados mediante un codón de iniciación en el extremo 5' (amino) y un codón de terminación de la traducción en el extremo 3' (carboxilo).
45

Por ejemplo, una composición de la invención puede comprender un ácido nucleico que codifica un anticuerpo que
50 comprende una región variable que tiene una secuencia al menos 98 % idéntica a la SEQ ID NO: 29 o 33, y un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia al menos el 98 % idéntica a la SEQ ID NO: 27 o 31. Un polinucleótido de la invención puede codificar tanto un polipéptido que tiene una secuencia al menos el 98 % idéntica a la SEQ ID NO: 29 como un polipéptido que tiene una secuencia al menos el 98 % idéntica a la SEQ ID NO: 27. Como alternativa, un polinucleótido de la invención puede codificar tanto un polipéptido que tiene una secuencia al menos el 98 % idéntica a la SEQ ID NO: 33 como un polipéptido que tiene una secuencia al menos el 98 % idéntica a la SEQ ID NO: 31.
55

Un ejemplo de una composición de la invención comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico al menos el 98%, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 28 o 32, y una secuencia de ácido nucleico al menos el 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 30 o 34. El polinucleótido de la divulgación comprende o consiste en una
60 secuencia de ácido nucleico al menos el 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 28, 30, 32 o 34. De forma opcional, el polinucleótido de la invención comprende una secuencia de polinucleótido que tiene al menos el 98 % de identidad con la SEQ ID NO: 28 y una secuencia polinucleótido que tiene al menos el 98 % de identidad con la SEQ ID NO: 30. De forma opcional, el polinucleótido de la invención comprende una secuencia de polinucleótido que tiene al menos el 98 % de identidad con la SEQ ID NO: 32 y una secuencia polinucleótido que tiene al menos el 98 % de identidad con la SEQ ID NO: 34.
65

Por lo tanto, un anticuerpo de la invención puede producirse a partir de un polinucleótido que lo codifica y tiene la capacidad de expresarlo. Cuando el anticuerpo comprende dos o más cadenas, un polinucleótido puede codificar una cadena ligera de anticuerpo y una cadena pesada de anticuerpo, o ambas. Se pueden proporcionar dos polinucleótidos, uno de los cuales codifica una cadena ligera de anticuerpo y el otro codifica la cadena pesada de anticuerpo correspondiente. Dicho polinucleótido o pareja de polinucleótidos se pueden expresar juntos, de forma que se genera un anticuerpo de la invención.

Los polinucleótidos de la invención se pueden sintetizar de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica, como se describe a modo de ejemplo en Sambrook *et al* (1989, Molecular Cloning - a laboratory manual; Cold Spring Harbor Press).

La invención proporciona adicionalmente un vector (tal como un plásmido o vector vírico recombinante) que comprende al polinucleótido de la invención. Normalmente, el vector comprende adicionalmente una secuencia de control unida operativamente a la secuencia insertada, permitiendo así la expresión del anticuerpo de la invención *in vivo*. Preferentemente, el vector de la invención comprende adicionalmente iniciadores, promotores, potenciadores y otros elementos apropiados que pueden ser necesarios y que se colocan en la orientación correcta, para permitir la expresión de un polipéptido de la invención.

Líneas celulares de hibridomas

La presente invención proporciona adicionalmente una línea celular de hibridoma que tiene la capacidad de producir un anticuerpo de la invención. Dicha línea celular de hibridoma producirá el anticuerpo de la invención cuando se mantenga en condiciones de cultivo adecuadas.

Está dentro de las competencias del experto en la materia desarrollar un hibridoma que exprese un anticuerpo de la invención. Esto se puede realizar inmunizando a un mamífero, tal como un ratón, conejo o cobaya, con un antígeno (por ejemplo, Mcm5). Puede ser beneficioso incluir un adyuvante, tal como el adyuvante completo de Freund. Las células del bazo del mamífero inmunizado se retiran y se fusionan con células de mieloma para formar líneas de hibridoma que son inmortales dadas las condiciones apropiadas y que secretan anticuerpos. Los hibridomas se separan en clones individuales y los anticuerpos secretados por cada clon se evalúan en cuanto a su capacidad de unión a la proteína Mcm5.

Líneas celulares hospedadoras

La invención también proporciona células hospedadoras que comprenden los ácidos nucleicos o vectores de la invención. Dichas células hospedadoras incluyen células que se han modificado para expresar un anticuerpo de la invención. Dichas células hospedadoras pueden ser células eucariotas o células procariotas. Por ejemplo, las células hospedadoras pueden ser células de mamífero, células de insecto o células bacterianas. Los ejemplos particulares de células hospedadoras que pueden modificarse mediante la inserción de vectores o ácidos nucleicos de la invención incluyen a las células HEK293T, CHO, HeLa, NS0 y COS de mamífero. Como alternativa, pueden usarse células bacterianas tales como *E. coli*.

Dichas células hospedadoras pueden cultivarse usando los métodos de rutina para producir un anticuerpo de la invención.

Producción de anticuerpos

Los anticuerpos de la invención se pueden producir usando cualquier método. En una realización, los anticuerpos se producen directamente a partir de una línea celular de hibridoma. En una realización adicional de la invención, los anticuerpos se producen de forma recombinante.

Para producir un anticuerpo a partir de una línea celular de hibridoma, la línea celular puede cultivarse *in vitro*, por ejemplo, en un recipiente tal como un matraz de cultivo celular o un fermentador, y el anticuerpo se puede aislar del recipiente usando técnicas convencionales conocidas en la técnica. Para los fines de la presente invención, se considerará que un anticuerpo se ha "producido mediante una línea celular de hibridoma" si el anticuerpo se obtiene de un anticuerpo que se produjo mediante la línea celular de hibridoma. Por ejemplo, está dentro de las competencias del experto en la materia obtener un anticuerpo de una línea celular de hibridoma, secuenciar la secuencia de aminoácidos del anticuerpo, y transfectar células tales como células CHO o células de *E. coli* con vectores que codifican la secuencia de aminoácidos del anticuerpo. Se puede considerar que tales anticuerpos se han "obtenido" a partir de un anticuerpo que se produjo mediante la línea celular de hibridoma. En una realización particular, los anticuerpos de la invención se producen directamente a partir de la propia línea celular de hibridoma.

Como alternativa, los anticuerpos de la invención se pueden producir usando técnicas recombinantes. La secuencia de un anticuerpo de la invención se puede usar para transfectar una línea de células hospedadoras de la invención. Las líneas celulares pueden cultivarse en un matraz o un fermentador, y el anticuerpo expresado por las células puede aislarse y purificarse usando técnicas convencionales (tales como cromatografía de afinidad).

Una vez purificados, los anticuerpos pueden conjugarse entonces con un radiomarcador o inmovilizarse en un soporte sólido. Un ejemplo de un soporte sólido adecuado es una placa de ELISA.

Kits y métodos para determinar la concentración de Mcm5 en una muestra.

5 Los anticuerpos de la invención pueden usarse como parte de un kit. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ser parte de un kit para su uso en la detección de la concentración de Mcm5 en una muestra, por ejemplo, una muestra de un ser humano, esto puede permitir la detección de un cáncer en un sujeto del cual se toma la muestra.

10 Como alternativa, los anticuerpos de la invención pueden usarse en un método para detectar la concentración o cantidad de Mcm5 en una muestra (también denominado método de detección de Mcm5 de la invención). Preferentemente, tal método comprende las siguientes etapas:

- 15 (i) proporcionar un primer anticuerpo inmovilizado, que es un anticuerpo de la invención inmovilizado en un soporte sólido;
- (ii) exponer la muestra al primer anticuerpo inmovilizado, de forma que la Mcm5 en la muestra se pueda unir al anticuerpo inmovilizado para proporcionar la Mcm5 inmovilizada;
- (iii) proporcionar un segundo anticuerpo marcado, que es un anticuerpo conjugado con un marcador;
- 20 (iv) exponer la Mcm5 inmovilizada al segundo anticuerpo marcado, de forma que el segundo anticuerpo marcado se pueda unir a la Mcm5; y
- (v) detectar la concentración del segundo anticuerpo marcado.

25 Preferentemente, hay una etapa de lavado entre las etapas (iv) y (v), para asegurar que el segundo anticuerpo, cuya concentración se detecta en la etapa (v), se una a la Mcm5 en la etapa (iv). De forma opcional, hay una etapa de lavado adicional tras la etapa (i) para eliminar el exceso del primer anticuerpo y/o tras de la etapa (ii) para eliminar el exceso de Mcm5. De forma opcional, la etapa de lavado se realiza exponiendo el soporte sólido a un tampón de lavado.

30 En una realización, los anticuerpos presentes en un kit de la invención o usados en un método de la invención son adecuados para detectar un cáncer urológico, tal como cáncer de próstata o un cáncer de vejiga.

35 Preferentemente, un método para detectar la concentración o cantidad de Mcm5 en una muestra usa, o un kit de la invención comprende, dos anticuerpos de la invención que no compiten entre sí (tales como los anticuerpos 4B4 y 12A7), y preferentemente se unen a distintos epítomos del antígeno de interés. Esto se puede determinar realizando un ELISA, tal como el descrito anteriormente. Uno de los dos anticuerpos puede inmovilizarse en una placa de ELISA. Después, la placa se bloquea con un agente bloqueante adecuado. Después, se añade un exceso del otro anticuerpo (el anticuerpo cuya capacidad para competir con el primer anticuerpo debe evaluarse). A continuación se añade el antígeno diana, tal como Mcm5. Después de un período de incubación adecuado, se lava la placa de ELISA y se añade un agente de detección que tenga la capacidad de unirse al antígeno diana, para medir la

40 cantidad del antígeno diana unido al anticuerpo inmovilizado. Si los dos anticuerpos compiten, la cantidad del antígeno diana unido al anticuerpo inmovilizado será menor que si los anticuerpos no compitieran (y, de forma opcional, se unieran a epítomos distintos). La concentración a la que se produce el 50 % de inhibición se conoce como Ki. En una realización preferente, un anticuerpo que compite con otro anticuerpo se une con una Ki 2 veces, 5 veces, 10 veces, 50 veces o 100 veces más baja que un anticuerpo que no compite.

45 En una realización preferente, un método de detección de Mcm5 de la invención usa, o un kit de la invención comprende, un primer anticuerpo de la invención y un segundo anticuerpo de la invención. El primer anticuerpo se puede unir (de forma opcional, se une específicamente) a la SEQ ID NO: 1 y el segundo anticuerpo se puede unir (de forma opcional, se une específicamente) a la SEQ ID NO: 2. El primer anticuerpo puede comprender las CDR de la CDRH1 de 12A7, la CDRH2 de 12A7, la CDRH3 de 12A7, la CDRL1 de 12A7, la CDRL2 de 12A7 y la CDRL3 de 12A7. El segundo anticuerpo puede comprender las CDR de la CDRH1 de 4B4, la CDRH2 de 4B4, la CDRH3 de 4B4, la CDRL1 de 4B4, la CDRL2 de 4B4 y la CDRL3 de 4B4. Preferentemente, el primer anticuerpo comprende la CDRH1 de 12A7, la CDRH2 de 12A7, la CDRH3 de 12A7, la CDRL1 de 12A7, la CDRL2 de 12A7 y la CDRL3 de 12A7. Preferentemente, el segundo anticuerpo comprende la CDRH1 de 12A7, la CDRH2 de 12A7, la CDRH3 de 12A7, la CDRL1 de 12A7, la CDRL2 de 12A7 y la CDRL3 de 12A7. El primer anticuerpo puede comprender una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de al menos el 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 29 y una secuencia de la región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de al menos el 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 27. El segundo anticuerpo puede comprender una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia de al menos el 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 33 y una secuencia de la región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia de al menos el 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 31.

65 En un método de detección de Mcm5 de la invención se puede usar un sistema de detección DELFIA. En tales realizaciones, el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo se unen preferentemente a distintos epítomos. En tales realizaciones, uno de los anticuerpos (el primer o el segundo anticuerpo monoclonal) se puede inmovilizar en una placa. Se puede añadir a la placa una muestra a analizar. Después puede añadirse el otro anticuerpo (el primer o el

segundo anticuerpo que no se inmovilizó en la placa). El otro anticuerpo debe estar conjugado con un agente de detección, tal como un marcador de Europio. Después, para determinar si el antígeno diana está presente se puede usar espectroscopía de fluorescencia resuelta en el tiempo (midiendo la cantidad del anticuerpo marcado que está presente).

5 Por consiguiente, en una realización de la invención, un kit de la invención comprende un primer o segundo anticuerpo de la invención que está conjugado con un radiomarcador, por ejemplo Europio. Para conjugar el primer anticuerpo monoclonal o el segundo anticuerpo monoclonal con un marcador de Europio se puede usar cualquier método. Los kits para realizar tal marcaje están disponibles. Por ejemplo, el primer o segundo anticuerpo monoclonal se puede conjugar con Europio usando un quelato de Eu-NI-ITC.

10 En tales realizaciones, un kit de la invención puede comprender componentes adicionales para su uso en un sistema de detección DELFIA. Dichos componentes adicionales pueden incluir una solución de potenciación de DELFIA o una solución de detección de DELFIA.

15 **Definiciones**

El término "*comprende*" significa "*incluye*". Por lo tanto, la palabra "*comprende*" y las variaciones tales como "*comprenden*" y "*que comprende*" se entenderán que implican la inclusión de un compuesto o composición o etapa establecido, o un grupo de compuestos o etapas, pero no la exclusión de algún otro compuesto, composición, etapas o grupos de los mismos.

Tabla 1: Secuencias

| SEQ ID NO | Nucleótido/Polipéptido |
|-----------|---|
| 1 | WDETKGE (epítipo al que se une el anticuerpo 12A7) |
| 2 | DDRVAIH (epítipo al que se une el anticuerpo 4B4) |
| 3 | secuencia polipeptídica de la CDR 1 de la cadena ligera de 12A7 |
| 4 | secuencia nucleotídica de la CDR 1 de la cadena ligera de 12A7 |
| 5 | secuencia polipeptídica de la CDR 2 de la cadena ligera de 12A7 |
| 6 | secuencia nucleotídica de la CDR 2 de la cadena ligera de 12A7 |
| 7 | secuencia polipeptídica de la CDR 3 de la cadena ligera de 12A7 |
| 8 | secuencia nucleotídica de la CDR 3 de la cadena ligera de 12A7 |
| 9 | secuencia polipeptídica de la CDR 1 de la cadena pesada de 12A7 |
| 10 | secuencia nucleotídica de la CDR 1 de la cadena pesada de 12A7 |
| 11 | secuencia polipeptídica de la CDR 2 de la cadena pesada de 12A7 |
| 12 | secuencia nucleotídica de la CDR 2 de la cadena pesada de 12A7 |
| 13 | secuencia polipeptídica de la CDR 3 de la cadena pesada de 12A7 |
| 14 | secuencia nucleotídica de la CDR 3 de la cadena pesada de 12A7 |
| 15 | secuencia polipeptídica de la CDR 1 de la cadena ligera de 4B4 |
| 16 | secuencia nucleotídica de la CDR 1 de la cadena ligera de 4B4 |
| 17 | secuencia polipeptídica de la CDR 2 de la cadena ligera de 4B4 |
| 18 | secuencia nucleotídica de la CDR 2 de la cadena ligera de 4B4 |
| 19 | secuencia polipeptídica de la CDR 3 de la cadena ligera de 4B4 |
| 20 | secuencia nucleotídica de la CDR 3 de la cadena ligera de 4B4 |
| 21 | secuencia polipeptídica de la CDR 1 de la cadena pesada de 4B4 |
| 22 | secuencia nucleotídica de la CDR 1 de la cadena pesada de 4B4 |
| 23 | secuencia polipeptídica de la CDR 2 de la cadena pesada de 4B4 |
| 24 | secuencia nucleotídica de la CDR 2 de la cadena pesada de 4B4 |

| SEQ ID NO | Nucleótido/Polipéptido |
|-----------|--|
| 25 | secuencia polipeptídica de la CDR 3 de la cadena pesada de 4B4 |
| 26 | secuencia nucleotídica de la CDR 3 de la cadena pesada de 4B4 |
| 27 | secuencia completa de la región variable de la cadena ligera de 12A7 (polipeptídica) |
| 28 | secuencia completa de la región variable de la cadena ligera de 12A7 (nucleotídica) |
| 29 | secuencia completa de la región variable de la cadena pesada de 12A7 (polipeptídica) |
| 30 | secuencia completa de la región variable de la cadena pesada de 12A7 (nucleotídica) |
| 31 | secuencia completa de la región variable de la cadena ligera de 4B4 (polipeptídica) |
| 32 | región variable de la secuencia de la región variable de la cadena ligera de 4B4 completa (nucleotídica) |
| 33 | secuencia completa de la región variable de la cadena pesada de 4B4 (polipeptídica) |
| 34 | secuencia completa de la región variable de la cadena pesada de 4B4 (nucleotídica) |
| 35 | secuencia polipeptídica de Mcm5 |
| 36 | secuencia polinucleotídica de Mcm5 |

Ejemplos

Clonación de Mcm5

5

Estadio I: Estrategia de clonación

1. Se obtuvo un clon verificado por IMAGE que contenía el ADNc de *MCM5* humano y que se usó como molde de PCR para amplificar un fragmento de ADN de 648 pb. El cebador de PCR directo codificaba el codón de iniciación, así como una etiqueta de polihistidina sin patentar modificada (HQ)₄.

2. El fragmento de PCR se clonó en el vector de expresión inducible de *E. coli* pTRC99a, utilizando una estrategia de doble sitio de restricción. Este vector permite la expresión inducible dirigida por el promotor híbrido *trp/lac "trc"*. Cadena abajo hay un sitio de unión al ribosoma (SUR) de *lacZ* que está situado a una distancia optimizada de un codón de iniciación ATG, que se suministra mediante el sitio de clonación *NcoI*.

15

Estadio IIA: Expresión y purificación (a pequeña escala - 10ml)

3. El plásmido recombinante que contenía el fragmento Mcm5 se transformó en *E. coli* BL21 (no λ DE3 para asegurar altos rendimientos de proteína expresada).

4. Se indujeron varios cultivos de *E. coli* de pequeño volumen con IPTG. Las células se lisarán en tampón de carga de SDS y la proteína total se separará por SDS-PAGE. Los clones de alta expresión se identificarán mediante transferencia de Western usando un anticuerpo monoclonal de ratón suministrado por Urosens.

20

Estadio IIB: Expresión y purificación (a gran escala - 500ml)

25

5. El clon identificado con altos niveles de proteína recombinante se cultivó en la escala de 0,5 l y se indujo con IPTG. Las células se sedimentaron y conservaron a -70 °C. Las células se rompieron en un tampón de lisis desnaturante descrito por Stoeber *et al.* J Natl Cancer Inst 2002 94 1071-9.

6. La proteína recombinante etiquetada con His se purificó por afinidad en condiciones desnaturantes en una columna de cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC). La proteína se eluyó usando un tampón ácido y se dializó frente a tampón de conservación (PBS que contenía SDS 0,3).

30

7. La proteína eluida se analizó y se cuantificó mediante SDS-PAGE y transferencia de western usando un anticuerpo monoclonal de ratón suministrado por Urosens.

35 Ejemplo 1 - ELISA de exploración de Acm

Los Acm purificados por Proteína A se obtuvieron del Institute for Cancer and Developmental Biology Welcome/CRUK. Estos anticuerpos se analizaron en cuanto a su capacidad para unirse a Mcm5.

40 Se realizó un ELISA de Mcm5 recombinante etiquetada con 6 His usando pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos recubierta con His-Sorb Ni-NTA (Qiagen). Las placas recubiertas con Ni-NTA, prebloqueadas con BSA,

garantizan una presentación orientada de la Mcm etiquetada con 6 His a través de la unión de afinidad del níquel al espaciador, en comparación con la presentación aleatoria de la Mcm5 en el pocillo que se lograría mediante el recubrimiento por adsorción pasiva de la placa. La Mcm5, a una concentración de 625 ng/ml, se inmovilizó por afinidad con níquel en la superficie de Ni-NTA His-Sorb (Qiagen) de una placa de 96 pocillos, a 200 µl/pocillo, dando como resultado 125 ng de *hsMcm5*/pocillo. Esto se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante para aplicar una proteína o péptido etiquetado con 6 His a los pocillos de la placa, con un título >100 ng/pocillo. Esto se hizo para garantizar que la proteína o péptido no sea limitante para la detección del Ac. El análisis de los Acm para el desarrollo de un IFMA (sigla de *immunofluorometric assay*, ensayo inmunofluorométrico) para Mcm5 se realizó con un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) de Mcm5. Para analizar los Acm, los sobrenadantes de los cultivos de hibridoma que expresaban los Acm se incubaron en los pocillos de microtitulación a TA durante 3 h y después se retiraron con una lavadora automática de placas de 96 pocillos. Los complejos de Ag Mcm5-Ac de los Acm se detectaron mediante un ELISA colorimétrico que usaba IgG de cabra anti ratón conjugada con HRP, reactivo TMB y solución de parada de ensayo de H₂SO₄ 1 M, para la medición de la absorbancia de luz a 450 nanómetros (Abs a 450 nm). Se excluyó la ausencia de unión no específica (UNE) del anti ratón de cabra conjugado con HRP a la superficie de Ni-NTA His-Sorb y Mcm5 realizando el ELISA en pocillos sin los Acm. El grado de UNE a los pocillos de poliestireno recubiertos con Ni-NTA de los Acm de ratón analizados se estableció realizando el ELISA en pocillos con la omisión de pocillos de Mcm5, en paralelo a la realización del ELISA en pocillos con la inmovilización a los pocillos de microtitulación por afinidad con Níquel de Mcm5.

El rendimiento en el ELISA colorimétrico de un Acm de ratón en las muestras de medios tomadas de los hibridomas (Tabla 2) se usó para la selección de los clones destacados, 12A7 y 4B4. Los hibridomas de los Acm seleccionados se cultivaron para producir IgG para la purificación a partir del sobrenadante de cultivo, usando separación por proteína A en fase sólida, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Amersham Pharmacia Biotech Little Chalfont Buckinghamshire, RU). El Acm 12A7 dio lugar a la mayor respuesta frente a la Mcm5.

Tabla 2: resultados de Abs a 450-650 del ELISA de análisis de Acm de hibridomas

| Acm para Mcm5 | respuesta del pocillo a Mcm5 | respuesta del pocillo de UNE | respuesta específica a Mcm5 |
|---------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| 12A7 | 1,404 | 0,421 | 0,983 |
| 4B4 | 1,622 | 1,040 | 0,582 |
| Afinidades relativas de los Acm | | | |

Las afinidades relativas de los Acm purificados por proteína A se determinaron mediante la normalización de las concentraciones de Ac y la aplicación de los Acm al ensayo de análisis colorimétrico en condiciones limitantes de Ag. Las condiciones limitantes de Ag se determinaron mediante titulación de la Mcm5 en los pocillos de la placa de microtitulación His-Sorb de Ni-NTA. Una Abs a 450 nm máximo observado de <3,000 es indicativa de condiciones limitantes de Ag, debido a que la lectura máxima de Abs a 450 que se puede obtener cuando el Ag no es limitante es 4,000. La titulación del Ag se realizó usando Apc (anticuerpo policlonal) de conejo frente a Mcm5 (101) y cabra anti conejo HRP para medir la respuesta de ELISA. Una concentración que proporcionó 25 ng de Mcm5 disponible para la unión a cada pocillo de Ni-NTA estaba limitando la respuesta de Abs a 450 del ELISA del Acp. El Acp de conejo se escogió para determinar las condiciones limitantes de Ag para la investigación de los Acm de ratón, dado que el Acp se une a la serie completa de epítopos de Mcm5. Esto garantizó que los Acm pudieran investigarse en estudios de incubación combinados para determinar el grado de competencia epitópica.

La concentración de IgG en las soluciones de Acm purificadas por proteína A se determinó por medición en un espectrofotómetro de la Abs a 280 nm y las concentraciones de Acm se normalizaron mediante dilución en PBS. Después, se determinó el 50 % de la concentración de unión máxima mediante una dilución lineal de los Acm aplicada a un ELISA de pocillos con Mcm5 con afinidad al níquel en condiciones limitantes de Ag Mcm5. Para demostrar la meseta de la señal de unión a *hsMcm5* 25 ng/pocillo en la placa, el Acm 7A3 se procesó en el ELISA a un mayor intervalo de concentración. El 50 % de respuesta de unión máxima para 12A7 se obtuvo a una concentración de 20 ng/pocillo. 12A7 se muestra por su 50 % de concentración de unión máxima para demostrar la mayor afinidad relativa a *hsMcm5*. (Tabla 3).

Tabla 3: Titulaciones de Acm contra antígeno limitante 25 ng/pocillo acoplado a Ni-NTA

| Acm nb/pocillo | Acm | |
|----------------|-------|-------|
| | 4B4 | 12A7 |
| 0 | 0,086 | 0,051 |
| 0,25 | 0,108 | 0,189 |

| | Acm | |
|------|-------|-------|
| 2,5 | 0,464 | 0,762 |
| 25 | 0,966 | 1,804 |
| 500 | 1,848 | 2,808 |
| 1000 | 2,414 | 3,099 |

Ejemplo 2 - Competición de los anticuerpos por los epítomos

5 Para un ensayo inmunométrico de dos sitios, se precisan dos Acm que estén dirigidos a epítomos distintos. En condiciones limitantes de Ag, un pareja de Acm que compiten por el mismo epítomo proporcionarán una medición de Abs a 450 nm en ELISA igual a la señal de Abs a 450 nm del Ac de afinidad relativa más alta, cuando se incuban en ausencia del Acm competidor, sin embargo, la incubación de una pareja de Acm dirigidos a epítomos distintos proporcionará una medición de Abs a 450 nm igual a la suma de las respuestas de Abs a 450 nm individuales de los Acm al Ag limitado disponible, siempre que haya una ausencia de impedimento estérico. Los Acm 12A7 y 4B4 se normalizaron al 50% de la concentración de unión máxima de 20 ng/pocillo del Acm 12A7 de mayor afinidad relativa. Los Acm a la concentración normalizada se sometieron a un ELISA usando incubaciones de Ab individuales y emparejados en la placa de Ni-NTA de Ag Mcm5 limitante 25 ng/pocillo. La señal más alta de Abs a 450 nm medida a partir de una incubación combinada de una pareja de Acm sería indicativa de los Acm más adecuados para su uso en una IFMA de dos sitios.

15 Resultados de la competición de los anticuerpos por los epítomos

20 Los resultados del estudio de ELISA de competición de los Ac por epítomos del Ag (Tabla 4) muestran que el Acm 4B4 está dirigido a un epítomo distinto, lo que es compatible para la unión a dos sitios con el 12A7. Se demuestra que el epítomo que es el objetivo 4B4 es distinto ya que la respuesta de Abs a 450 es igual a la suma de ambos Acm uniéndose al Ag limitante, cuando se incubó 4B4 en paralelo a los otros Acm.

Tabla 4: Resultados del estudio de ELISA de competición de los Ac por epítomos del Ag

| Incubación con Acm 20 ng/pocillo | Respuesta de Abs a 450-650 con Mcm5 25 ng/pocillo |
|----------------------------------|---|
| 12A7 | 1,375 |
| 4B4 | 1,244 |
| 12A7+4B4 | 2,693 |

25 Los Acm se incubaron a una concentración normalizada de 20 ng/pocillo, el 50% de la concentración de unión máxima del Acm 12A7 con la mayor afinidad relativa. Los Acm óptimos para el desarrollo de un inmunoensayo de dos sitios se destacan en azul y sus respuestas de Abs a 450 en ELISA se destacan en amarillo.

30 **Ejemplo 3 - Mapeo epitópico**

Materiales usados:

| | |
|------------------------------|--|
| Contenido de la micromatriz: | La secuencia del antígeno Mcm 5 (aa 367-582) se tradujo para dar péptidos de 15 aa con un solapamiento péptido-péptido |
| Muestras: | Anticuerpos IgG monoclonales de ratón 12A7 y 4B4 |
| Tampón de lavado: | PBS, pH 7,4 con Tween 20 al 0,05 % (3x1 min después de cada ensayo) |
| Tampón de bloqueo: | Tampón de bloqueo MB-070 de Rockland (30 min antes del primer ensayo) |
| Tampón de incubación: | PBS, pH 7,4 con Tween 20 al 0,05 % y tampón de bloqueo de Rockland al 10 % |
| Condiciones de ensayo: | Concentraciones de anticuerpos de 1 µg/ml y 10 µg/ml en tampón de incubación; incubación durante 16 h a 4 °C y |
| Anticuerpo secundario: | Anticuerpo de cabra anti ratón IgG (H+L) DyLight 680; |
| Anticuerpos de control: | Monoclonal anti HA (12CA5)-DyLight680 (1:1000), monoclonal anti FLAG (M2)-DyLight800 (1:500); tinción en |

| | |
|----------|--|
| Escáner: | LI-COR Odyssey Imaging System; 0,8 mm de desplazamiento de barrido, 21 µm de resolución, intensidad de barrido rojo/verde de 5/7 |
|----------|--|

La pretinción de una de las micromatrices de péptidos se realizó con el anticuerpo secundario anti IgG de ratón (H+L) de cabra DyLight680 a una dilución de 1:5000, para investigar las interacciones de fondo con los péptidos procedentes del antígeno que podrían interferir con los ensayos principales. La incubación posterior de las micromatrices de péptidos con los anticuerpos IgG monoclonales de ratón 12A7 y 4B4 a, concentraciones de 1 µg/ml y 10 µg/ml en tampón de incubación, se siguió de la tinción con el anticuerpo secundario y la lectura a una intensidad de barrido de 5 (rojo). Los péptidos de control HA y Flag que enmarcaban las matrices de péptidos se tiñeron finalmente como un control de calidad interno, para confirmar la calidad del ensayo y la integridad de la micromatriz de péptidos (intensidades de barrido rojo/verde: 5/7).

La cuantificación de las intensidades de los puntos y la anotación de los péptidos se realizaron con el analizador PepSlide®. Un algoritmo de programa informático descompone las intensidades de fluorescencia de cada punto para dar las señales sin procesar, la de primer plano y la de fondo, y calcula la desviación típica de las medianas de las intensidades de primer plano. Basándose en las medianas de las intensidades de primer plano promediadas, se generaron mapas de intensidad y se destacaron las interacciones en los mapas de péptidos mediante un código de intensidad de color, con rojo para alto y blanco para intensidades de punto bajas.

Los inventores representaron adicionalmente las intensidades de los punto promediadas de todos los ensayos con las muestras de anticuerpos frente a la secuencia del antígeno desde el extremo N hasta el extremo C, para visualizar las intensidades globales de los puntos y las proporciones de la señal con respecto al ruido. Los gráficos de intensidad se correlacionaron con mapas de péptidos e intensidad, así como con la inspección visual de los barridos de las micromatrices, para identificar los péptidos y epítomos que fueron reconocidos por las muestras de anticuerpos. En caso de que no fuese claro si un determinado aminoácido contribuía a la unión del anticuerpo.

Después de 15 min de prehinchamiento en tampón de lavado y 30 min en tampón de bloqueo, una de las micromatrices de péptidos se incubó inicialmente con el anticuerpo secundario de cabra anti IgG de ratón (H+L) DyLight680 a una dilución de 1:5000 durante 30 min, a temperatura ambiente, para analizar las interacciones de fondo con los péptidos procedentes del antígeno. A una intensidad de escaneo de 5, los inventores no observaron ningún fondo debido a la unión no específica del anticuerpo secundario. La cuantificación de los datos con el analizador PepSlide® no fue posible ni necesaria, dado que la ausencia de un patrón de puntos obstaculizó la alineación de la rejilla de la micromatriz.

Las micromatrices peptídicas se incubaron con el anticuerpo monoclonal de ratón 12A7 a concentraciones de 1 µg/ml y 10 µg/ml (parte superior derecha). Después de cada incubación, la tinción con el anticuerpo secundario de cabra anti IgG de ratón (H+L) DyLight680 se siguió de la lectura a una intensidad de barrido de 5. Los inventores observaron un patrón de puntos de tipo epítomo fuerte y bien definido, formado por una fila de péptidos adyacentes con un motivo consenso con excelentes proporciones de la señal con respecto al ruido.

La tinción final de los péptidos de control de HA y Flag que enmarcaban la micromatriz de péptidos dio lugar al patrón de puntos esperado y bien definido, y validó la integridad global de la micromatriz de péptidos.

La cuantificación de los datos se siguió de la generación de mapas de péptidos y de intensidad, así como de gráficos de intensidad para los ensayos con el anticuerpo monoclonal de ratón 12A7 a concentraciones de 1 µg/ml y 10 µg/ml; el gráfico de intensidad de este último se niveló para proporcionar una visión de conjunto más clara de los datos. Las señales se basaron en el patrón de puntos de tipo epítomo observado en el barrido de la micromatriz y se atribuyeron a péptidos con el motivo consenso WDETKGE.

Las micromatrices de péptidos se incubaron con el anticuerpo monoclonal de ratón 4B4 a concentraciones de 1 µg/ml) y 10 µg/ml. Después de cada incubación, la tinción con el anticuerpo secundario de cabra anti IgG de ratón (H+L) DyLight680 se siguió de la lectura a una intensidad de barrido de 5. Los inventores observaron dos patrones de puntos de tipo epítomo fuertes y bien definidos, formados por una fila de péptidos adyacentes con motivos consenso con excelentes proporciones de la señal con respecto al ruido. A una concentración de anticuerpo de 10 µg/ml, las intensidades sin procesar del patrón de puntos de tipo epítomo fueron similares, pero las interacciones de fondo aumentaron ligeramente indicando una saturación de señal del anticuerpo en el intervalo de concentración de 1-10 µg/ml. La tinción final de los péptidos de control de HA y Flag que enmarcaban la micromatriz de péptidos dio lugar al patrón de puntos esperado y bien definido, y validó la integridad global de la micromatriz de péptidos.

La cuantificación de los datos se siguió de la generación de mapas de péptidos y de intensidad, así como de gráficos de intensidad para los ensayos con el anticuerpo monoclonal de ratón 4B4 a concentraciones de 1 µg/ml y 10 µg/ml; el gráfico de intensidad de este último se niveló para proporcionar una visión de conjunto más clara de los datos. A una concentración de anticuerpo de 10 µg/ml, las intensidades sin procesar del patrón de puntos de tipo epítomo fueron similares, pero las interacciones de fondo aumentaron ligeramente, conduciendo a intensidades de señal normalizadas reducidas. Las señales se basaron en los patrones de puntos de tipo epítomo observados en el barrido

de la micromatriz y se atribuyeron a péptidos con los motivos consenso DDRVAIH y WDETKGE.

Listado de secuencias

5 SEQ ID NO: 1
WDETKGE
SEQ ID NO: 2
DDRVAIH
SEQ ID NO: 3
10 QNLVQSNGNTY
SEQ ID NO: 4
CAGAACCTTGACAAAGTAATGGAAACACCTATTTA
SEQ ID NO: 5
KVS
15 SEQ ID NO: 6:
AAGTTTCCAA
SEQ ID NO: 7:
SQSTRVPYT
SEQ ID NO: 8:
20 TCTCAAAGTACACGTGTTCCGTACACA
SEQ ID NO: 9:
GFSLSTSGMG
SEQ ID NO: 10:
GGGTTTTCACTGAGCACTTCTGGTATGGGT
25 SEQ ID NO: 11:
IFWDDDK
SEQ ID NO: 12:
ATTTTCTGGGATGATGACAAG
SEQ ID NO: 13:
30 ARRSYNYYSMDY
SEQ ID NO: 14:
GCGCGGCGAAGTGACTACAATTACTACTCTATGGACTAC
SEQ ID NO: 15:
QDIGSS
35 SEQ ID NO: 16:
CAGGACATTGGTAGTAGC
SEQ ID NO: 17:
ATS
SEQ ID NO: 18:
40 GCCACATCC
SEQ ID NO: 19:
LQYASSPPT
SEQ ID NO: 20:
CTACAATATGCTAGTTCTCCTCCGACG
45 SEQ ID NO: 21:
GFTFSNYA
SEQ ID NO: 22:
GGATTCACITTCAGTAACTATGCC
SEQ ID NO: 23:
50 ISRGGSYT
SEQ ID NO: 24:
ATTAGTCGTGGTGGTAGTTACACC
SEQ ID NO: 25:
ARHGNYDDGAWFAN
55 SEQ ID NO: 26:
GCAAGACATGGATATAATTACGACGACGGGGCCTGGTTTGCTAAC
SEQ ID NO: 27:

DIMLTDQSPLSLSVTLGDQASISCRSSQNLVQSNGNTYLTWYLQKPGQSPKVLINKVSNRFY
GVPDRFSGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGIYFCSQSTRVPYTFGGGTKLEIRR
60
SEQ ID NO: 28:

GATATCATGCTGACCCAATCTCCACTCTCCCTGTCTGTCACTCTTGGAGATCAGGCCTC
CATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAACCTTGTACAAAAGTAATGGAAACACCTATTTAACTT
GGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGGTCCTGATCAACAAAGTTTCCAACCG
ATTTTATGGGGTCCCAGACAGGTTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTCACTC
AGGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAATTTATTTCTGCTCTCAAAGTACAC
GTGTTCCGTACACATTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAGACG

SEQ ID NO: 29:

QQDLQQSGPILQPTQLSLTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQSSNMGLEWLAHIFWDDDKRY
NPSLRSLTLSKDTSSSQVFLMITSVSTADSATYYCARRSDYNYYSMIDYWGQGTAVTVSS

5

SEQ ID NO: 30:

CAGCAAGATCTGCAGCAGTCTGGCCCTGGGATATTGCAGCCCACCCAGACCCTCAGTC
TGACTTGTCTTTCTCTGGGTTTTCACTGAGCACTTCTGGTATGGGTGTGAGTTGGATT
GTCAATCTTCAAATATGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTTTCTGGGATGATGACAA
GCGCTATAATCCCTCCCTGAGGAGCCGACTCACGCTCTCCAAGGATACCTCCAGTAGC
CAGGTATTTCTCATGATCACCAGTGTGAGTACTGCAGATTCTGCCACATACTACTGTGC
GCGGCGAAGTGACTACAATTACTACTCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCGCAGTC
ACCGTCTCTCA

SEQ ID NO: 31:

DIMLTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQDIGSSLNWLQQEPDGTIKRLIYATSSLDSGVPKRFS
GSRSGSDYSLTISSLESEDFVDYYCLQYASSPPTFGGGTKLEIK

10

SEQ ID NO: 32:

GATATCATGCTGACCCAATCTCCATCCTCCTTATCTGCCTCTCTGGGAGAAAGAGTCAG
TCTCACTTGTGCGGCAAGTCAGGACATTGGTAGTAGCTTAAACTGGCTTCAACAGGAA
CCAGATGGAACATTAACGCCTAATCTACGCCACATCCAGTTTAGATTCTGGTGTCCC
CAAAGGTTTCAAGTGGCAGTAGGTCTGGGTGAGATTATTCTCTCACCATCAGCAGCCTT
GAGTCTGAAGATTTTGTAGACTATTACTGTCTACAATATGCTAGTTCTCCTCCGACGTT
CGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAAC

15

SEQ ID NO: 33:

VKLQESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSNYAMSWVRQNPEKRLEWVATISRGGSYTY
PDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRSEDAMYFCARHGYNYYDDGAWFANWGQGLV
TVSA

SEQ ID NO: 34:

TAGGTGAAACTGCAGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAA
CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAACTATGCCATGTCTTGGGTTCCGCA
GAATCCGGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTGCAACCATTAGTCGTGGTGGTAGTTACAC
CTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGTCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAAC

20

ACCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTTCTGTG
CAAGACATGGATATAATTACGACGACGGGGCCTGGTTTGCTAACTGGGGCCAAGGGA
CTCTGGTCACTGTCTCTGCA

SEQ ID NO: 35:

ES 2 678 049 T3

10 20 30 40 50 60
MSGFDDPGIF YSDFGGDAQ ADEGQARKSQ LQRRFKEFLR QYRVGTDRTG
FTFKYRDELK

70 80 90 100 110 120
RHYNLGEYWI EVEMEDLASF DEDLADYLYK QPAEHLQLLE EAAKEVADEV
TRPRPSGEEV

130 140 150 160 170 180
LQDIQVMLKS DASPSSIRSL KSDMMSHLVK IPGIIAASA VRAKATRISI QCRSCRNTLT

190 200 210 220 230 240
NIAMRPGLEG YALPRKCNTD QAGRPKCPLD PYFIMPDKCK CVDFQTLKLQ
ELPDAVPHGE

250 260 270 280 290 300
MPRHMQLYCD RYLCDKVVPV NRVTIMGIYS IKKFGLTTSR GRDRVGVGIR
SSYIRVLGIQ

310 320 330 340 350 360
VDTDGSGRSF AGAVSPQEEE EFRRLAALPN VYEVISKISIA PSIFGGTDMK KAIACLLFGG

370 380 390 400 410 420
SRKRLPDGLT RRGDINLLML GDPGTAKSQL LKFVEKCSPI GVYTSKGKSS
AAGLTASVMR

430 440 450 460 470 480
DPSSRNFINE GGAMVLADGG VVCIDEFDKM REDDRVAIHE AMEQQTISIA
KAGITTTLNS

490 500 510 520 530 540
RCSVLAAANS VFGRWDETKG EDNIDFMPTI LSRFDMIFIV KDEHNEERDV
MLAKHVITLH

550 560 570 580 590 600
VSALTQTQAV EGEIDLAKLK KFIAYCRVKC GPRLSAEAAE KLKNRYIIMR
SGARQHERDS

610 620 630 640 650 660
DRRSSIPITV RQLEAIVRIA EALSKMKLQP FATEADVEEA LRLFQVSTLD AALSGTLSGV

670 680 690 700 710 720
EGFTSQEDQpE MLRIEKQLK RRAIGSQVS EHSIIKDFTK QKYPEHAIHK
VLQLMLRRGE

730
IQHRMQRKVL YRLK

SEQ ID NO:36

Componente 5 del complejo de mantenimiento de micromosomas (MCM5) de *Homo sapiens*, Secuencia de referencia del NCBI del ARNm: NM_006739.3

5

1 ggaaaaccag aggcgcagtc atgtcgggat tcgacgatcc tggcatttc tacagcgaca
 61 gcttcggggg cgacgcccag gccgacgagg ggcaggcccg caaatcgag ctgcagagggc
 121 gcttcaagga gttcctgagg cggtagcagg tggcaccga ccgacgggc ttcacttca
 181 aatacaggga tgaactcaag cggcattaca acctggggga gtactggatt gaggtggaga
 241 tggagatct ggcagcttt gatgaggacc tggccgacta cttgtacaag cagccagccg
 301 agcacctgca gctgctggag gaagctgcca agggagtagc tgatgaggtg acccgggccc
 361 ggcttctgg ggaggagggtg ctccaggaca tccaggtcat gctcaagtcg gacgccagcc
 421 cttccagcat tegtgcctg aagtcggaca tgatgcaca cctggfgaag atccctggca
 481 tcatcatcgc gccctctgag gtcctgcca aggccaccg catctctatc cagtggcga
 541 gctgccgcaa caccctcacc aacattgcca tgcgccctgg cctcaggggc tatgccctgc
 601 ccaggaaagt caacacagat caggctgggc gcccaaatg cccattggac ccgtacttca
 661 tcatccccga caaatgcaa tgcgtggact tccagacct gaagctgcag gagctgcctg
 721 atgcagfcc ccacggggag atcccagac acatgcagct ctactcgac aggtacctgt
 781 gtgacaaggt cgtccctggg aacagggtta ccatcatggg catctactcc atcaagaagt
 841 ttggcctgac taccagcagg ggcctgaca ggggtggcgt gggcatccga agctctaca
 901 tccgtgtct gggcatccag gtggacacag atggctctgg ccgagcttt gctggggccc
 961 tgagccccc ggaggaggag gattccgtc gcctggctgc cctcccaat gtctatgagg
 1021 tcatctcaa gagcatgcc cctccatct ttggggcac agacatgaag aaggccattg
 1081 cctgctct ctttggggc tcccgaaga ggctccctga tggacttact cggcaggag
 1141 acatcaacct gctgatgta ggggaccctg ggacagcaa gtcccagct ctgaagtgtg
 1201 tggagaagt tctccatt ggggtatata cgtctggaa aggcagcagc gcagctggac
 1261 tgacgcctc ggtgatgagg gaccctcgt cccggaatt catcatggag ggcggagcca
 1321 tggcctggc cgatgggtgg gtcgtctgta ttgacgagt tgacaagatg cgagaagatg
 1381 accgtgtggc aatccacgaa gccatggagc agcagacct ctctatgcc aaggctggga
 1441 taccaccac cctgaactc cgtgctccg tctggctgc tgccaactca gtgtcggcc
 1501 gctgggatga gacgaagggg gaggacaaca ttgacttcat gccaccatc ttgtcgcgt
 1561 tgacatgat ctctatgac aaggatgagc acaatgagga gagggatgtg atgctggcca
 1621 agcatgtcat cactctgac gtgagcgac tgacacagac acaggctgtg gagggcgaga
 1681 ttgacctggc caagctgaag aagttattg cctactgccg agtgaagtgt ggccccggc
 1741 tgcagcaga gctgcagag aactgaaga accgctacat catcatcgg agcggggccc
 1801 gtcagcaga gagggacagt gaccgctc cagcatccc catcactgtg cggcagctgg
 1861 aggcattgt gcgcatcgc gaagcctca gcaagatgaa gctgcagccc ttcgccag
 1921 aggcagatgt ggaggaggcc ctgctgctc tcaagtgtc cacgttggat gctgcttgt
 1981 ccgtaccct gtcaggggtg gagggcttca ccagccagga ggaccaggag atgctgagcc
 2041 gcatcgagaa gcagctcaag cgcgctttg ccattggctc ccaggtgtct gagcacagca
 2101 tcatcaagga cttaccaag cagaaatacc cggagcagc catccacaag gtgtgcagc
 2161 tcatgctgc gcgaggcag atccagcatc gcatgcagc caaggttctc taccgctca
 2221 agtgagtcg gccgctcac tggactcatg gactgcccc cgctcgcce ctctgccc
 2281 tgctgcat tgacaatgt gctgggacct ctgctccc actgcagccc tgaacttc
 2341 caggaccct ctttctgcc ccagaggaag gagctgtagt gctctgctc ctctggcgc
 2401 ccgctctag cgcggtctg ggaagtgtc tttggcatc cgttaataa aaagccagc
 2461 tgtgtcagg taaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa aaaaaaaaa
 2521 aaaaaaaaa aaaa

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Arquer Diagnostics Ltd
- <120> ENSAYO DE MCM5
- <130> N403141WO
- 10 <140> tbc
- <141> tbc
- <150> tbc

ES 2 678 049 T3

<151> tbc
<160> 36
5 <170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 7
<212> PRT
10 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Epítipo al que se une el anticuerpo 12A7
15 <400> 1
Trp Asp Glu Thr Lys Gly Glu
1 5
<210> 2
<211> 7
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Epítipo al que se une el anticuerpo 4B4
25 <400> 2
Asp Asp Arg Val Ala Ile His
1 5
30 <210> 3
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
35 <220>
<223> Secuencia polipeptídica de la CDR 1 de la cadena ligera de 12A7
40 <400> 3
Gln Asn Leu Val Gln Ser Asn Gly Asn Thr Tyr
1 5 10
<210> 4
<211> 36
45 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia nucleotídica de la CDR 1 de la cadena ligera de 12A7
50 <400> 4
cagaaccttg tacaagtaa tggaaacacc tatta 36
55 <210> 5
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>

ES 2 678 049 T3

<223> Secuencia polipeptídica de la CDR 2 de la cadena ligera de 12A7

<220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 5

Lys Val Ser Xaa
1

10

<210> 6
 <211> 10
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia nucleotídica de la CDR 2 de la cadena ligera de 12A7

20 <400> 6
 Aagtttcaa 10

<210> 7
 <211> 9
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia polipeptídica de la CDR 3 de la cadena ligera de 12A7

30 <400> 7

Ser Gln Ser Thr Arg Val Pro Tyr Thr
1 5

35 <210> 8
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Secuencia nucleotídica de la CDR 3 de la cadena ligera de 12A7

<400> 8
 45 tctcaaagta cacgtgtcc gtacaca 27

<210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Secuencia polipeptídica de la CDR 1 de la cadena pesada de 12A7

<400> 9

55

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly
1 5 10

<210> 10
 <211> 30
 60 <212> ADN

ES 2 678 049 T3

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia nucleotídica de la CDR 1 de la cadena pesada de 12A7

5
<400> 10
gggtttcac tgagcacttc tggatgggt 30

<210> 11
10 <211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
15 <223> Secuencia polipeptídica de la CDR 2 de la cadena pesada de 12A7

<400> 11

Ile Phe Trp Asp Asp Asp Lys
1 5

20
<210> 12
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25
<220>
<223> Secuencia nucleotídica de la CDR 2 de la cadena pesada de 12A7

<400> 12
30 attttctggg atgatgacaa g 21

<210> 13
<211> 13
<212> PRT
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia polipeptídica de la CDR 3 de la cadena pesada de 12A7

40 <400> 13

Ala Arg Arg Ser Asp Tyr Asn Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr
1 5 10

45
<210> 14
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
50 <223> Secuencia nucleotídica de la CDR 3 de la cadena pesada de 12A7

<400> 14
gcgcgcgcaa gtgactacaa ttactactct atggactac 39

55
<210> 15
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

60
<220>
<223> Secuencia polipeptídica de la CDR 1 de la cadena ligera de 4B4

<400> 15

ES 2 678 049 T3

Gln Asp Ile Gly Ser Ser
1 5

5 <210> 16
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Secuencia nucleotídica de la CDR 1 de la cadena ligera de 4B4
<400> 16
caggacattg gtagtagc 18

15 <210> 17
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Secuencia polipeptídica de la CDR 2 de la cadena ligera de 4B4
<220>

25 <221> misc_feature
<222> (4)..(4)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
<400> 17

30 Ala Thr Ser Xaa
1

<210> 18
<211> 10

35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Secuencia nucleotídica de la CDR 2 de la cadena ligera de 4B4

40 <220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(10)
<223> n es a, c, g o t

45 <400> 18
gccacatccn 10

50 <210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Secuencia polipeptídica de la CDR 3 de la cadena ligera de 4B4
<400> 19

Leu Gln Tyr Ala Ser Ser Pro Pro Thr
1 5

60 <210> 20
<211> 27

ES 2 678 049 T3

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
5 <223> Secuencia nucleotídica de la CDR 3 de la cadena ligera de 4B4

<400> 20
ctacaatatg ctagtctcc tccgacg 27

10 <210> 21
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Secuencia polipeptídica de la CDR 1 de la cadena pesada de 4B4

<400> 21

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala
1 5

20

<210> 22
<211> 24
<212> ADN
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia nucleotídica de la CDR 1 de la cadena pesada de 4B4

30 <400> 22
ggattcactt tcagtaacta tgcc 24

<210> 23
<211> 8
35 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia polipeptídica de la CDR 2 de la cadena pesada de 4B4

40 <400> 23

Ile Ser Arg Gly Gly Ser Tyr Thr
1 5

45 <210> 24
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Secuencia nucleotídica de la CDR 2 de la cadena pesada de 4B4

<400> 24
55 attagtcgtg gtggtagta cacc 24

<210> 25
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

60 <220>

ES 2 678 049 T3

<223> Secuencia polipeptídica de la CDR 3 de la cadena pesada de 4B4

<400> 25

5 Ala Arg His Gly Tyr Asn Tyr Asp Asp Gly Ala Trp Phe Ala Asn
1 5 10 15

<210> 26

<211> 45

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia nucleotídica de la CDR 3 de la cadena pesada de 4B4

15 <400> 26
gcaagacatg gatataatta cgacgacggg gcctggttg ctaac 45

<210> 27

<211> 113

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia completa de la cadena ligera variable de 12A7 (polipeptídica)

25 <400> 27

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

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

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Thr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Val Leu Ile Asn Lys Val Ser Asn Arg Phe Tyr Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Arg Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
85 90 95

Thr Arg Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Arg
100 105 110

Arg

30 <210> 28

<211> 338

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 678 049 T3

<220>

<223> Secuencia completa de la cadena ligera variable de 12A7 (nucleotídica)

<400> 28

5 gatatcatgc tgaccaatc tccactctcc ctgtctgtca ctcttggaga tcaggcctcc 60
 atctcttgca gatctagtca gaaccttgta caaagtaatg gaaacaccta ttttaacttgg 120
 tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag gtcttgatca acaaagtffc caaccgattt 180
 tatgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaggatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tctgggaatt tatttctgct ctcaaagtac acgtgttccg 300
 tacacattcg gagggggggac caagctggaa ataagacg 338

<210> 29

<211> 121

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia completa de la cadena pesada variable de 12A7 (polipeptídica)

15

<400> 29

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

20 <210> 30

<211> 363

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25 <220>

ES 2 678 049 T3

<223> Secuencia completa de la cadena pesada variable de 12A7 (nucleotídica)

<400> 30

```

cagcaagatc tgcagcagtc tggccctggg atattgcagc ccaccagac cctcagtctg      60
acttgttctt tctctggggtt ttcactgagc acttctggta tgggtgtgag ttggattcgt      120
caatcttcaa atatgggtct ggagtggctg gcacacattt tctgggatga tgacaagcgc      180
tataatccct ccctgaggag cgcactcacg ctctccaagg atacctcag tagccaggta      240
tttctcatga tcaccagtgt gagtactgca gattctgcca catactactg tgcgcggcga      300
agtgactaca attactactc tatggactac tggggtaag gaaccgcagt caccgtctcc      360
5   tca                                                                    363

```

<210>31

<211> 107

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia completa de la cadena ligera variable de 4B4 (polipeptídica)

15 <400> 31

```

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

Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly Ser Ser
                20           25           30

Leu Asn Trp Leu Gln Gln Glu Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile
            35           40           45

Tyr Ala Thr Ser Ser Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly
            50           55           60

Ser Arg Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
65           70           75           80

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100           105

```

<210> 32

20 <211> 322

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Secuencia completa de la cadena ligera variable de 4B4 (nucleotídica)

<400> 32

ES 2 678 049 T3

gatatcatgc tgaccaatc tccatcctcc ttatctgcct ctctgggaga aagagtcagt 60
ctcacttgtc gggcaagtca ggacattggt agtagcttaa actggcttca acaggaacca 120
gatggaacta ttaaacgcct aatctacgcc acatccagtt tagattctgg tgtccccaaa 180
aggttcagtg gcagtaggtc tgggtcagat tattctctca ccatcagcag ccttgagtct 240
gaagattttg tagactatta ctgtctacaa tatgctagtt ctctccgac gttcgggtgga 300
ggcaccaagc tggaaatcaa ac 322

5 <210> 33
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Secuencia completa de la cadena pesada variable de 4B4 (polipeptídica)

<400> 33

Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly Ser
1 5 10 15

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

Met Ser Trp Val Arg Gln Asn Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala
35 40 45

Thr Ile Ser Arg Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Ala
85 90 95

Arg His Gly Tyr Asn Tyr Asp Asp Gly Ala Trp Phe Ala Asn Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

15 <210> 34
<211> 366
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia completa de la cadena pesada variable de 4B4 (nucleotídica)

<400> 34

ES 2 678 049 T3

tagtgaaac tgcaggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60
tctgtgagc cctctggatt cactttcagt aactatgcca tgtcttgggt tcgccagaat 120
ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtcgtg gtggtagtta cacctactat 180
ccagacagtg tgaaggtcgc attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtat 240
ctgcaaatga acagtctgag gtctgaggac acggccatgt atttctgtgc aagacatgga 300
tataattacg acgacggggc ctggtttgct aactggggcc aagggactct ggtcactgtc 360
tctgca 366

5 <210> 35
<211> 734
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <220>
<223> Mcm5 (polipéptido)
<400> 35

ES 2 678 049 T3

Met Ser Gly Phe Asp Asp Pro Gly Ile Phe Tyr Ser Asp Ser Phe Gly
 1 5 10 15

Gly Asp Ala Gln Ala Asp Glu Gly Gln Ala Arg Lys Ser Gln Leu Gln
 20 25 30

Arg Arg Phe Lys Glu Phe Leu Arg Gln Tyr Arg Val Gly Thr Asp Arg
 35 40 45

Thr Gly Phe Thr Phe Lys Tyr Arg Asp Glu Leu Lys Arg His Tyr Asn
 50 55 60

Leu Gly Glu Tyr Trp Ile Glu Val Glu Met Glu Asp Leu Ala Ser Phe
 65 70 75 80

Asp Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Leu Tyr Lys Gln Pro Ala Glu His Leu
 85 90 95

Gln Leu Leu Glu Glu Ala Ala Lys Glu Val Ala Asp Glu Val Thr Arg
 100 105 110

Pro Arg Pro Ser Gly Glu Glu Val Leu Gln Asp Ile Gln Val Met Leu
 115 120 125

Lys Ser Asp Ala Ser Pro Ser Ser Ile Arg Ser Leu Lys Ser Asp Met
 130 135 140

Met Ser His Leu Val Lys Ile Pro Gly Ile Ile Ile Ala Ala Ser Ala
 145 150 155 160

Val Arg Ala Lys Ala Thr Arg Ile Ser Ile Gln Cys Arg Ser Cys Arg
 165 170 175

Asn Thr Leu Thr Asn Ile Ala Met Arg Pro Gly Leu Glu Gly Tyr Ala
 180 185 190

Leu Pro Arg Lys Cys Asn Thr Asp Gln Ala Gly Arg Pro Lys Cys Pro
 195 200 205

ES 2 678 049 T3

Leu Asp Pro Tyr Phe Ile Met Pro Asp Lys Cys Lys Cys Val Asp Phe
 210 215 220
 Gln Thr Leu Lys Leu Gln Glu Leu Pro Asp Ala Val Pro His Gly Glu
 225 230 235 240
 Met Pro Arg His Met Gln Leu Tyr Cys Asp Arg Tyr Leu Cys Asp Lys
 245 250 255
 Val Val Pro Gly Asn Arg Val Thr Ile Met Gly Ile Tyr Ser Ile Lys
 260 265 270
 Lys Phe Gly Leu Thr Thr Ser Arg Gly Arg Asp Arg Val Gly Val Gly
 275 280 285
 Ile Arg Ser Ser Tyr Ile Arg Val Leu Gly Ile Gln Val Asp Thr Asp
 290 295 300
 Gly Ser Gly Arg Ser Phe Ala Gly Ala Val Ser Pro Gln Glu Glu Glu
 305 310 315 320
 Glu Phe Arg Arg Leu Ala Ala Leu Pro Asn Val Tyr Glu Val Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ser Ile Ala Pro Ser Ile Phe Gly Gly Thr Asp Met Lys Lys Ala
 340 345 350
 Ile Ala Cys Leu Leu Phe Gly Gly Ser Arg Lys Arg Leu Pro Asp Gly
 355 360 365
 Leu Thr Arg Arg Gly Asp Ile Asn Leu Leu Met Leu Gly Asp Pro Gly
 370 375 380
 Thr Ala Lys Ser Gln Leu Leu Lys Phe Val Glu Lys Cys Ser Pro Ile
 385 390 395 400
 Gly Val Tyr Thr Ser Gly Lys Gly Ser Ser Ala Ala Gly Leu Thr Ala
 405 410 415
 Ser Val Met Arg Asp Pro Ser Ser Arg Asn Phe Ile Met Glu Gly Gly
 420 425 430
 Ala Met Val Leu Ala Asp Gly Gly Val Val Cys Ile Asp Glu Phe Asp
 435 440 445
 Lys Met Arg Glu Asp Asp Arg Val Ala Ile His Glu Ala Met Glu Gln
 450 455 460

ES 2 678 049 T3

Gln Thr Ile Ser Ile Ala Lys Ala Gly Ile Thr Thr Thr Leu Asn Ser
465 470 475 480

Arg Cys Ser Val Leu Ala Ala Ala Asn Ser Val Phe Gly Arg Trp Asp
485 490 495

Glu Thr Lys Gly Glu Asp Asn Ile Asp Phe Met Pro Thr Ile Leu Ser
500 505 510

Arg Phe Asp Met Ile Phe Ile Val Lys Asp Glu His Asn Glu Glu Arg
515 520 525

Asp Val Met Leu Ala Lys His Val Ile Thr Leu His Val Ser Ala Leu
530 535 540

Thr Gln Thr Gln Ala Val Glu Gly Glu Ile Asp Leu Ala Lys Leu Lys
545 550 555 560

Lys Phe Ile Ala Tyr Cys Arg Val Lys Cys Gly Pro Arg Leu Ser Ala
565 570 575

Glu Ala Ala Glu Lys Leu Lys Asn Arg Tyr Ile Ile Met Arg Ser Gly
580 585 590

Ala Arg Gln His Glu Arg Asp Ser Asp Arg Arg Ser Ser Ile Pro Ile
595 600 605

Thr Val Arg Gln Leu Glu Ala Ile Val Arg Ile Ala Glu Ala Leu Ser
610 615 620

Lys Met Lys Leu Gln Pro Phe Ala Thr Glu Ala Asp Val Glu Glu Ala
625 630 635 640

Leu Arg Leu Phe Gln Val Ser Thr Leu Asp Ala Ala Leu Ser Gly Thr
645 650 655

Leu Ser Gly Val Glu Gly Phe Thr Ser Gln Glu Asp Gln Glu Met Leu
660 665 670

Ser Arg Ile Glu Lys Gln Leu Lys Arg Arg Phe Ala Ile Gly Ser Gln
675 680 685

Val Ser Glu His Ser Ile Ile Lys Asp Phe Thr Lys Gln Lys Tyr Pro
690 695 700

Glu His Ala Ile His Lys Val Leu Gln Leu Met Leu Arg Arg Gly Glu

ES 2 678 049 T3

705 710 715 720

Ile Gln His Arg Met Gln Arg Lys Val Leu Tyr Arg Leu Lys
 725 730

<210> 36
 <211> 2534
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> Mcm5 (ARNm)

<400> 36

ggaaaaccag aggcgcagtc atgtcgggat tgcacgatcc tggcattttc tacagcgaca 60
 gcttcggggg cgacgcccag gccgacgagg ggcaggcccg caaatcgag ctgcagagggc 120
 gcttcaagga gttcctgcgg cggtagcgag tgggcaccga ccgcacgggc ttcaccttca 180
 aatacagggg tgaactcaag cggcattaca acctggggga gtactggatt gaggtggaga 240
 tggaggatct ggccagcttt gatgaggacc tggccgacta cttgtacaag cagccagccg 300
 agcacctgca gctgctggag gaagctgcc aaggagtagc tgatgaggtg acccggcccc 360
 ggccctctgg ggaggaggtg ctccaggaca tccaggtcat gctcaagtgc gacgccagcc 420
 cttccagcat tcgtagcctg aagtcggaca tgatgtcaca cctggtgaag atccctggca 480
 tcatcatcgc ggcctctgcg gtccgtgcc aaggccaccg catctctatc cagtgcgcga 540
 gctgcccga caccctcacc aacattgcc tgcgccctgg cctcgagggc tatgccctgc 600
 ccaggaagtg caacacagat caggctgggc gcccctaatg ccattggac ccgtacttca 660
 tcatgcccga caaatgcaaa tgcgtggact tccagaccct gaagctgcag gagctgcctg 720
 atgcagtccc ccacggggag atgccagac acatgcagct ctactgcgac aggtacctgt 780
 gtgacaaggt cgtccctggg aacaggggta ccatcatggg catctactcc atcaagaagt 840
 ttggcctgac taccagcagg ggccgtgaca gggggtggcgt gggcatccga agctcctaca 900
 tccgtgtcct gggcatccag gtggacacag atggctctgg ccgcagcttt gctggggccg 960
 tgagccccca ggaggaggag gagttccgtc gcctggctgc cctcccaaat gtctatgagg 1020
 tcatctccaa gagcatcgcc cctccatct ttggggggcac agacatgaag aaggccattg 1080
 cctgcctgct ctttgggggc tcccgaaga ggctccctga tggacttact cgccgaggag 1140
 acatcaacct gctgatgcta ggggaccctg ggacagccaa gtcccagctt ctgaagtttg 1200
 tggagaagtg ttctccatt ggggtataca cgtctgggaa aggcagcagc gcagctggac 1260
 tgacagcctc ggtgatgagg gacccttcgt cccggaattt catcatggag ggcggagcca 1320
 tggctcctggc cgatgggtggg gtcgtctgta ttgacgagtt tgacaagatg cgagaagatg 1380
 accgtgtggc aatccacgaa gccatggagc agcagaccat ctctatcgcc aaggctggga 1440

ES 2 678 049 T3

| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------|
| tcaccaccac | cctgaactcc | cgctgctccg | tcctggctgc | tgccaactca | gtgttcggcc | 1500 |
| gctgggatga | gacgaagggg | gaggacaaca | ttgacttcat | gcccaccatc | ttgtcgcgct | 1560 |
| tcgacatgat | cttcatcgtc | aaggatgagc | acaatgagga | gagggatgtg | atgctggcca | 1620 |
| agcatgtcat | cactctgcac | gtgagcgcac | tgacacagac | acaggctgtg | gagggcgaga | 1680 |
| ttgacctggc | caagctgaag | aagtttattg | cctactgccg | agtgaagtgt | ggcccccggc | 1740 |
| tgtcagcaga | ggctgcagag | aaactgaaga | accgctacat | catcatgcgg | agcggggccc | 1800 |
| gtcagcacga | gagggacagt | gaccgccgct | ccagcatccc | catcactgtg | cggcagctgg | 1860 |
| aggccattgt | gcgcatcgcg | gaagccctca | gcaagatgaa | gctgcagccc | ttcgccacag | 1920 |
| aggcagatgt | ggaggaggcc | ctgcggctct | tccaagtgtc | cacgttggat | gctgccttgt | 1980 |
| ccggtaccct | gtcaggggtg | gagggcttca | ccagccagga | ggaccaggag | atgctgagcc | 2040 |
| gcatcgagaa | gcagctcaag | cgccgctttg | ccattggctc | ccaggtgtct | gagcacagca | 2100 |
| tcatcaagga | cttcaccaag | cagaaatacc | cggagcacgc | catccacaag | gtgctgcagc | 2160 |
| tcatgctgcg | gcgcggcgag | atccagcatc | gcatgcagcg | caaggttctc | taccgcctca | 2220 |
| agtgagtgcg | gccgcctcac | tggactcatg | gactcgccca | cgctcgccc | ctcctgccgc | 2280 |
| tgctgccat | tgacaatggt | gctgggacct | ctgcctcccc | actgcagccc | tcgaacttcc | 2340 |
| caggcaccct | cctttctgcc | ccagaggaag | gagctgtagt | gtcctgctgc | ctctgggcgc | 2400 |
| ccgcctctag | cgcggttctg | ggaagtgtgc | ttttggcatc | cgtaataat | aaagccacgg | 2460 |
| tgtgttcagg | taaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | aaaaaaaaa | 2520 |
| aaaaaaaaa | aaaa | | | | | 2534 |

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a Mcm5, que se une a un epítipo que tiene una secuencia de aminoácidos de
- 5 (i) la SEQ ID NO: 2; o
(ii) la SEQ ID NO: 1.
2. Un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a Mcm5, que comprende la CDRH1 de 4B4 que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 21, la CDRH2 de 4B4 que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 23, la CDRH3 de 4B4 que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 25, la CDRL1 de 4B4 que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 15, la CDRL2 de 4B4 que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 17 y la CDRL3 de 4B4 que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 19.
- 10 3. Un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a Mcm5, que comprende la CDRH1 de 12A7 que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 9, la CDRH2 de 12A7 que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 11, la CDRH3 de 12A7 que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 13, la CDRL1 de 12A7 que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 3, la CDRL2 de 12A7 que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 5 y la CDRL3 de 12A7 que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 7.
- 15 20 4. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que tiene una afinidad por Mcm5 en el intervalo de 1-10 nM.
- 25 5. El anticuerpo de la reivindicación 1 (ii) o la reivindicación 3, en donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia al menos el 98 % idéntica a la SEQ ID NO: 29, y el anticuerpo comprende una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia al menos el 98 % idéntica a la SEQ ID NO: 27.
- 30 6. El anticuerpo de la reivindicación 1 (i) o la reivindicación 2, en donde el anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada que tiene una secuencia al menos el 98 % idéntica a la SEQ ID NO: 33, y el anticuerpo comprende una región variable de la cadena ligera que tiene una secuencia al menos el 98 % idéntica a la SEQ ID NO: 31.
- 35 7. Una composición que comprende el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
8. Una composición que comprende:
- 40 (i) una secuencia de ácido nucleico al menos el 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 28 y una secuencia de ácido nucleico al menos el 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 30; o
(ii) una secuencia de ácido nucleico al menos el 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 32 y una secuencia de ácido nucleico al menos el 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 34; o
(iii) una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 28 y una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 30; o
(iv) una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 32 y una secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 34.
- 45 9. Una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 8, de forma opcional, en donde la célula hospedadora es una célula CHO o una célula *E.coli*.
- 50 10. Un método de fabricación de un anticuerpo que comprende:
- (i) cultivar una célula hospedadora de la reivindicación 9; y
(ii) aislar un anticuerpo a partir de la célula hospedadora.
- 55 11. El método de la reivindicación 10:
- (i) que comprende adicionalmente una etapa de marcaje del anticuerpo conjugando el anticuerpo con un radiomarcador; o
(ii) que comprende adicionalmente una etapa de inmovilización del anticuerpo a un soporte sólido.
- 60 12. Un kit que comprende:
- (i) una composición que comprende un primer anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 (i), 2 o 6; y
(ii) una composición que comprende un segundo anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 (ii), 3 o 5.
- 65

13. Un método de determinación de la concentración o cantidad de Mcm5 en una muestra que comprende las siguientes etapas:

- 5 (i) proporcionar un primer anticuerpo inmovilizado, que es un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 inmovilizado en un soporte sólido;
- (ii) exponer la muestra al primer anticuerpo inmovilizado, de forma que la Mcm5 en la muestra se pueda unir al anticuerpo inmovilizado para proporcionar la Mcm5 inmovilizada;
- 10 (iii) proporcionar un segundo anticuerpo marcado, que es un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 conjugado con un marcador;
- (iv) exponer la Mcm5 inmovilizada al segundo anticuerpo marcado, de forma que el segundo anticuerpo marcado se pueda unir a la Mcm5; y
- (v) detectar la concentración del segundo anticuerpo marcado;

15 en donde tanto el primer anticuerpo como el segundo anticuerpo se unen a Mcm5, pero el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo se unen a distintos epítomos de Mcm5.

14. El kit de reivindicación 12 o el método de la reivindicación 13, en donde tanto el primer anticuerpo como el segundo anticuerpo se unen a Mcm5, pero el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo se unen a distintos epítomos de Mcm5; y

20 (a)

- (i) el primer anticuerpo se une a la SEQ ID NO: 1 y el segundo anticuerpo se une a la SEQ ID NO: 2; o
- (ii) el primer anticuerpo se une a la SEQ ID NO: 2 y el segundo anticuerpo se une a la SEQ ID NO: 1; y/o

- 25 (b) el primer anticuerpo está inmovilizado en una placa de ELISA; y/o
- (c) el segundo anticuerpo está inmovilizado en una placa de ELISA; y/o
- (d) el segundo anticuerpo está conjugado con un marcador radioactivo, de forma opcional, en donde el marcador radioactivo es Europio ³⁺; y/o
- 30 (e) el primer anticuerpo está conjugado con un marcador radioactivo, de forma opcional, en donde el marcador radioactivo es Europio ³⁺.

15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 13-14, en donde la etapa de detección de la concentración del segundo anticuerpo marcado comprende la detección inmunofluorescente de Eu³⁺.