

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 694 296**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.06.2014** **E 14305925 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018** **EP 2957571**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales anti-pVHL y usos de los mismos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.12.2018

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS) (50.0%)
3, rue Michel-Ange
75794 Paris Cedex 16, FR y
UNIVERSITÉ DE RENNES 1 (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ARLOT-BONNEMAINS, YANNICK;
CHESNEL, FRANCK;
LE GOFF, XAVIER;
HASCOET, PAULINE y
COUTURIER, ANNE**

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 694 296 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 anti-pVHL y usos de los mismos

5 Estado de la técnica

La Organización Mundial de la Salud enumera más de 50 tipos diferentes de cáncer de riñón. El carcinoma de células renales (CCR), es el tipo más común de cáncer de riñón en adultos y representa hasta el 90 % de todos los tumores renales malignos. El CCR se caracteriza por la falta de signos de alerta temprana, diversas manifestaciones clínicas y resistencia a la quimioterapia y la radiación. Más del 50 % de los pacientes con CCR en fase temprana están curados. En determinadas circunstancias, la nefrectomía radical también está indicada para tratar el CCR localmente avanzado y la enfermedad metastásica después de la nefrectomía (Koul *et al.*, Am. J. Cancer Res., 2011, 1(2): 240-254). Sin embargo, el pronóstico del CCR avanzado es malo. Se estima que en todo el mundo se diagnostican más de 200.000 casos nuevos y más de 100.000 mueren de CCR cada año. Tanto la incidencia como la mortalidad del CCR están aumentando en todo el mundo. La incidencia específica por edad muestra un máximo en la primera infancia, luego sigue el patrón más habitual de un aumento pronunciado hasta la edad adulta y la incidencia de la enfermedad es de dos a tres veces mayor en los hombres. Determinadas afecciones genéticas, como el síndrome de von Hippel-Lindau (VHL), se asocian con una mayor incidencia de CCR.

El síndrome de VHL es una afección genética autosómica dominante y rara que predispone a los individuos a tumores benignos y malignos altamente vascularizados. Los tumores más comunes que se encuentran en la VHL son el carcinoma de células renales del tipo de células claras (CCRcc), hemangioblastoma (HB) y feocromocitoma (tumor en las glándulas suprarrenales). Los tumores VHL menos frecuentes incluyen los del páncreas (quistes pancreáticos, cistoadenoma seroso y tumores neuroendocrinos pancreáticos), oídos internos (tumor del saco endolinfático) y testículos (cistoadenomas del epidídimo). El síndrome VHL resulta de una mutación en el gen VHL, y más del 70 % de los CCRcc se caracterizan por mutaciones somáticas o hipermetilación de VHL (Banks *et al.*, Cancer Res., 2006, 66:2000-2011; Herman *et al.*, PNAS EE.UU., 1994, 91:9700-9704).

El gen VHL pertenece a la familia de genes supresores de tumores, ya que las mutaciones bialélicas del gen dan como resultado el desarrollo de tumores malignos. Sin embargo, los mecanismos moleculares y celulares por los cuales este gen actúa como un supresor de tumores solo son poco conocidos. Los estudios comparativos que usan diferentes organismos modelo han proporcionado información sobre las numerosas funciones de pVHL, la proteína codificada por el gen VHL (Hsu, Oncogene, 2012, 31:2247-2257). La función canónica de pVHL es su papel como la subunidad de unión al sustrato de una ubiquitina ligasa E3. El objetivo de degradación más conocido de la ligasa E3 que contiene VHL es la subunidad α del factor inducible por hipoxia (HIF- α) en condiciones fisiológicas normales. En condiciones normóxicas (es decir, a nivel de oxígeno normal), HIF- α se hidroxila en los restos de prolina dentro de un dominio dependiente de oxígeno. El HIF- α proil-hidroxilado se reconoce por pVHL, lo que lleva a la poliubiquitinación y degradación. La reacción de hidroxilación está mediada por las proteínas del dominio proil-hidroxilasa, que solo son activas en condiciones normóxicas normales. En condiciones hipóxicas o cuando pVHL es defectuoso, no hay interacción entre pVHL e HIF- α . HIF- α , luego puede experimentar una dimerización con el envío β (HIF- β) y el heterodímero formado se traslada al núcleo celular donde funciona como un factor de transcripción, que regula los genes que codifican las proteínas de la glucólisis (p. ej., fosfoglicerato quinasa), transporte de glucosa (Glut-1), angiogénesis (VEGF) y eritropoyesis (eritropoetina), es decir, proteínas que median la respuesta celular y la adaptación a condiciones hipóxicas. pVHL tiene otras funciones que no son canónicas e independientes de HIF- α , como en el conjunto de matriz de fibronectina (Ohh *et al.*, Mol. Cell., 1998, 1:959-568) y en la estabilidad de los microtúbulos (Thoma *et al.*, Nature Cell Biol., 2009, 11:994-1001). Sin embargo, a diferencia de la función canónica de pVHL, estas otras funciones son menos conocidas. La función canónica de pVHL sola no puede explicar la formación de tumores CCRcc después de la mutación del gen VHL. De hecho, los estudios han demostrado que la desregulación de HIF- α no es suficiente para inducir la formación de tumores en un modelo de ratón (Elson *et al.*, Genes Dev., 2001, 15: 2520-2532) y en seres humanos (Percy *et al.*, N. Engl. J. Med., 2008, 358:162-168). Por lo tanto, es posible que las funciones no canónicas refuerzan la función supresora de tumores de pVHL. Sin embargo, el vínculo entre las funciones no canónicas de pVHL y el cáncer aún no se ha establecido.

La complejidad del papel de pVHL no solo se debe a su aspecto multifuncional, sino también a que existen dos ARNm de VHL diferentes (ARN mensajeros) que codifican tres isoformas de la proteína VHL (Gnarra *et al.*, Nature Genet., 1994, 7:85-90; Richards *et al.*, Human Mol. Genet., 1996, 5:639-644). El primer ARNm codifica las isoformas pVHL213 y pVHL160 y el segundo ARNm codifica la isoforma pVHL172 (véase la Figura 1). pVHL213 tiene una longitud de 213 aminoácidos y comprende un dominio ácido N-terminal, un dominio β central, que es el sitio de unión para HIF- α , y un dominio α C-terminal, que es el sitio de unión para los miembros del complejo E3 ubiquitina-proteína ligasa (elonginas B y C). pVHL160 tiene una longitud de 160 aminoácidos y es idéntico a pVHL213, excepto que no comprende el dominio ácido N-terminal. La tercera isoforma, pVHL172, contiene 172 restos de aminoácidos y es idéntica a pVHL213, excepto que la parte C terminal del dominio β central está truncada. Se ha demostrado que las isoformas difieren en su localización subcelular, lo que puede implicar posibles diferencias funcionales (Shraml *et al.*, Am. J. Pathol., 2003, 163:1013-1020; Hergovich *et al.*, Nature Cell Biol., 2003, 5:64-70). El documento WO 97/35978, que se refiere al gen de la enfermedad VHL y su ADNc correspondiente, menciona la generación de anticuerpos contra regiones específicas de pVHL humana y Ferchichi *et al.* (Biologica, 2012, 67:1026-1030) divulgan

el uso de anticuerpos anti-pVHL disponibles en el mercado. Sin embargo, hasta el día de hoy, los científicos no han podido detectar las tres isoformas y, más específicamente, detectar pVHL172, y estudiar sus funciones respectivas en la tumorigénesis de CCRcc debido a la falta de herramientas adecuadas.

- 5 Por lo tanto, aún existe una necesidad en la técnica de herramientas que permitan detectar las tres isoformas pVHL.

Objeto de la invención

10 La presente invención se refiere a herramientas, reactivos y métodos para detectar las tres isoformas de la proteína pVHL humana, incluida la isoforma pVHL172. Más específicamente, los presentes solicitantes han generado anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente pVHL172, pVHL213 y pVHL160 humanas. Para el conocimiento de los solicitantes y basándose en pruebas experimentales realizadas con anticuerpos anti-pVHL disponibles en el mercado (datos no mostrados), estos son los primeros anticuerpos monoclonales capaces de unirse específicamente a pVHL172 humana (además de pVHL213 humana y pVHL160 humana).

15 En consecuencia, la presente invención proporciona una línea celular de hibridoma depositada por los presentes solicitantes en el CNCM (Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos, Instituto Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15) el 18 de abril de 2014 con el número de acceso CNCM 1-4857.

20 La presente invención también proporciona un anticuerpo monoclonal secretado por la línea celular de hibridoma depositada, o un fragmento biológicamente activo del mismo que reconoce específicamente las tres isoformas de pVHL humana, *es decir*, que reconoce específicamente pVHL172 humana, además de pVHL160 humana y pVHL213.

25 Preferentemente, el anticuerpo monoclonal, o fragmento biológicamente activo del mismo, reconoce específicamente una región de pVHL172 humana en el interdominio entre el dominio ácido y el dominio β de pVHL172 humana, en el que dicha región de pVHL172 humana comprende, o consiste en, la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:4 (EAGRPRPVL), o comprende, o consiste en, la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:5 (AGRPR).

30 En determinadas realizaciones, el anticuerpo monoclonal, o fragmento biológicamente activo del mismo, está humanizado, desimmunizado o quimérico. Por ejemplo, dicho anticuerpo monoclonal, o fragmento biológicamente activo del mismo, puede comprender las seis regiones determinantes complementarias (RDC) del anticuerpo monoclonal secretado descrito anteriormente.

35 El anticuerpo monoclonal, o fragmento biológicamente activo del mismo, puede inmovilizarse sobre un soporte sólido. Por ejemplo, el soporte sólido puede ser una perla, una partícula, un pocillo de microplaca, una matriz, una cubeta, un tubo, una membrana, un gel, una resina y similares.

40 La presente invención también proporciona un conjugado que comprende un anticuerpo monoclonal, o un fragmento biológicamente activo del mismo, de acuerdo con la invención, que está unido (por ejemplo, que está unido covalentemente) a un resto detectable.

45 En otro aspecto, la presente invención proporciona un kit para detectar la presencia de pVHL humana en una muestra biológica o para cuantificar el nivel de expresión de pVHL humana en una muestra biológica o para aislar pVHL humana de una muestra biológica, comprendiendo el kit un anticuerpo monoclonal, o un fragmento biológicamente activo del mismo, de acuerdo con la invención, o un conjugado de acuerdo con la presente invención.

50 En determinadas realizaciones, el anticuerpo monoclonal, o un fragmento biológicamente activo del mismo, o el conjugado comprendido en el kit se inmovilizan en un soporte sólido.

El kit para detectar o cuantificar pVHL humana se puede usar para detectar o cuantificar pVHL172 humana, pVHL213 humana, pVHL160 humana o cualquier combinación de las mismas.

55 En determinadas realizaciones, el kit comprende además un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente pVHL213 humana y/o pVHL160 humana. Opcionalmente, el anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente pVHL213 humana y/o pVHL160 humana está unido (por ejemplo, está unido covalentemente) a un resto detectable. En determinadas realizaciones, el kit comprende además una IgG antihumana opcionalmente unida (por ejemplo, está unida covalentemente) a un resto detectable.

60 En otro aspecto más, la presente invención proporciona un método para detectar la presencia de pVHL humana en una muestra biológica o para cuantificar el nivel de expresión de pVHL humana en una muestra biológica, comprendiendo el método una etapa de poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo monoclonal, o un fragmento biológicamente activo del mismo, de acuerdo con la invención, o con un conjugado de acuerdo con la invención.

65

El método para detectar la presencia de pVHL humana en una muestra biológica o para cuantificar el nivel de expresión de pVHL humana se puede usar para detectar o cuantificar pVHL172 humana, pVHL213 humana, pVHL160 humana o cualquier combinación de las mismas.

5 En determinadas realizaciones, la etapa de poner en contacto la muestra biológica se realiza durante un tiempo y en condiciones que permiten que se forme un complejo entre la pVHL humana presente en la muestra biológica y el anticuerpo monoclonal, o su fragmento biológicamente activo, o el conjugado. En determinadas realizaciones, el método comprende además una etapa de detección de cualquier complejo formado o cuantificación de cualquier complejo formado.

10 El método se puede usar para detectar específicamente pVHL213 humana y/o pVHL160 en la muestra biológica y/o cuantificar el nivel de expresión de pVHL213 humana en la muestra biológica y/o el nivel de expresión de pVHL160 humana en la muestra biológica.

15 La muestra biológica usada en el método puede obtenerse de un paciente, por ejemplo, de un paciente con cáncer (p. ej., de un paciente que padece carcinoma de células renales claras o de otro tumor asociado con el síndrome VHL).

20 La presente invención también proporciona un método para aislar pVHL humana de una muestra biológica, comprendiendo el método una etapa de poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo monoclonal, o un fragmento biológicamente activo del mismo, de acuerdo con la invención, o con un conjugado de acuerdo con la invención.

25 El método para aislar pVHL humana de una muestra biológica se puede usar para aislar pVHL172 humana, pVHL213 humana, pVHL160 humana o cualquier combinación de las mismas de una muestra biológica.

30 En determinadas realizaciones, la etapa de poner en contacto la muestra biológica se realiza durante un tiempo y en condiciones que permiten que se forme un complejo entre la pVHL humana presente en la muestra biológica y el anticuerpo monoclonal, o su fragmento biológicamente activo, o el conjugado.

35 En determinadas realizaciones, el anticuerpo monoclonal, o fragmento biológicamente activo del mismo, o el conjugado se inmoviliza en un soporte sólido, y el método comprende además una etapa de liberación del pVHL unido al anticuerpo monoclonal, o su fragmento biológicamente activo, o el conjugado, que se inmoviliza en el soporte sólido.

Este y otros objetivos, ventajas y características de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica que hayan leído la siguiente descripción detallada de las realizaciones preferentes.

Descripción de las figuras

40 **Figura 1.** Diagramas esquemáticos de la proteína pVHL: dominios funcionales y comparación de secuencia de aminoácidos de las tres isoformas pVHL diferentes.

45 **Figura 2.** Expresión de ARNm de VHL en HUVEC R-305, HeLa, MCF-7 y líneas celulares. Los ARN totales se extrajeron de extractos celulares y se transcribieron de forma inversa. La cantidad de expresión de variantes de ARNm de VHL se analizó mediante PCR usando cebadores de VHL específicos que producen un amplicón de 308 pb (variante 1 de ARNm de VHL (exón1-exón2-exón3)) y un segundo amplicón de 185 pb correspondiente a la variante 2 de ARNm de VHL (exón1- exón3).

50 **Figura 3.** Inmunodetección de isoformas pVHL recombinantes con diferentes anticuerpos anti-pVHL **(A, B)** e inmunodetección de isoformas pVHL sobreexpresadas en células HeLa **(C)**. **(A)** Las proteínas pVHL recombinantes se analizaron mediante tinción con plata y mediante transferencia Western usando un anticuerpo anti-T7 como control de carga. **(B)** La inmunodetección para las proteínas recombinantes se realizó con un anticuerpo policlonal anti-VHL: VHL-6030 (1:500), un anticuerpo policlonal anti-VHL comercial (Santa Cruz) (1:500) y el anticuerpo monoclonal VHL de la invención: VHL-1956 (1:100). Las reacciones inmunológicas se detectaron usando el kit de detección de CLE de Pierce. **(C)** las células HeLa se transfectaron transitoriamente con plásmidos de ADNpc que codifican pVHL213, pVHL172 y pVHL160. Las proteínas totales se analizaron mediante transferencia Western usando un anticuerpo anti-Flag y un anticuerpo policlonal anti-VHL comercial (1:500), el VHL-6030 (1:500) y los anticuerpos VHL-1956 de la invención (1:10).

60 **Figura 4.** Inmunodetección de isoformas pVHL endógenas en líneas celulares. Se analizaron cuarenta (40) microgramos de proteína total extraída de células HeLa y líneas de células renales: células HeLa, 786-O, R-180 y R-305 Caki-1, RCC4+ y HEK 293T mediante transferencia de Western usando tres anticuerpos VHL diferentes: un anticuerpo comercial anti-VHL (1:500), el anticuerpo VHL-6030 (1:1500) y el anticuerpo monoclonal VHL-1956 (1:10) de la invención. Se usó β -tubulina como control de carga. La reacción inmunológica se detectó mediante quimioluminiscencia con el kit CLE de Pierce.

65

Figura 5. Caracterización del anticuerpo monoclonal VHL-1956 de la invención.

(A) Especificidad del anticuerpo. Los extractos de proteínas totales de las células HeLa se analizaron mediante transferencia Western usando el anticuerpo monoclonal de la invención VHL-1956 (calle izquierda) o usando el anticuerpo monoclonal de la invención VHL-1956 incubado previamente durante 30 minutos a 4 °C con un exceso de proteína pVHL213 recombinante (calle derecha).

(B) Disminución de la expresión de isoformas pVHL en células HeLa. Las células HeLa se transfectaron con ARNsi (60 pmol) dirigidos a las tres isoformas pVHL o solo a la isoforma pVHL172. Las células se recogieron 24 horas después de la transfección y la cantidad de las diferentes isoformas de pVHL se evaluó mediante transferencia Western usando anticuerpos VHL y VHL-1956 (1:10). Se usaron células HeLa no transfectadas para analizar las formas endógenas de las isoformas pVHL. (C) Se transfectaron células HeLa usando cantidades crecientes de ARNsi dirigidos a la isoforma pVHL172 (20 pmol a 150 pmol) durante 30 horas y luego se evaluó la expresión de las isoformas pVHL mediante inmunotransferencia usando el anticuerpo VHL-1956 de la invención (1:10). Se usaron células HeLa no transfectadas y células HeLa transfectadas con ARNsi mezclado (20 pmol) para analizar la expresión de isoformas pVHL endógenas. Todas las reacciones inmunológicas se detectaron mediante quimioluminiscencia con el kit CLE de Pierce.

Figura 6. Detección de pVHL usando el anticuerpo VHL-1956 de la invención en tejidos tumorales. Análisis de transferencia Western de extractos de proteína de muestras de tejido CCRcc. Las proteínas totales se extrajeron de tejidos de pacientes con CCRcc usando el tampón RIPA y se analizaron mediante transferencia Western usando el anticuerpo monoclonal VHL-1956 de la invención (1:10). Se usó β -tubulina como control de carga. La expresión de isoformas pVHL endógenas en células HeLa se añadió en el panel izquierdo como control de migración de las tres isoformas pVHL.

Figura 7. Las diferentes líneas celulares 786-0 (a), 786-0 pVHL213 (b) y 786-0 pVHL172 (c) se cultivaron en cubreobjetos, se fijaron y procesaron para la detección inmunorreactiva de pVHL en presencia del anticuerpo JD-1956 (dilución 1:50). El tamizado inmunológico se realizó usando el kit OmniMap DAB anti-conejo (sistema "libre de biotina") usando la tecnología multimer OmniMap anti-ratón HRP y ChromoMap DAB con antígeno retrieval pH8. El control sin anticuerpo primario siempre se usó al mismo tiempo, se incubó con diluciones de anticuerpos. Se usó el mismo protocolo con tejido renal humano. (d) Análisis inmunohistoquímico de la expresión de VHL en muestras de tejido CCRcc con el anticuerpo VHL-1956 de la invención. Las muestras de tejido analizadas previamente mediante transferencia Western se prepararon para inmunohistoquímica y se analizaron usando el anticuerpo monoclonal VHL-1956. Las microfotografías se adquirieron con un microscopio LEICA y las imágenes se analizaron con el software de visualización NDP.

Definiciones

A lo largo de la memoria descriptiva, se emplean varios términos que se definen en los párrafos siguientes.

El término "**pVHL humana**" se refiere a la proteína supresora de tumores Von Hippel-Lindau que está codificada por el gen VHL, que se encuentra en el brazo corto del cromosoma 3 (3p25-26). Los términos "**pVHL213humana**", "**pVHL160 humana**" y "**pVHL172 humana**" se refieren a la isoforma 1 supresora de tumores de Von Hippel-Lindau, isoforma 2 e isoforma 3, respectivamente. Más específicamente, los términos "**pVHL213humano**" y "**pVHL172 humana**" se refieren a proteínas que tienen, respectivamente, la secuencia que se muestra en el número de acceso GenBank NP_000542.1 o cualquier variante de origen natural de la misma, y la secuencia que se muestra en el número de acceso GenBank NP_937799.1 o cualquier variante de origen natural de la misma, respectivamente.

El término "**anticuerpo**", como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une inmunoespecíficamente a un antígeno. Como tal, el término "anticuerpo" abarca no solo moléculas de anticuerpo completas, sino también fragmentos de anticuerpos así como variantes (incluyendo derivados) de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos. Un anticuerpo de origen natural es una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Hay dos tipos de cadena ligera, lambda (λ) y kappa (κ). Existen cinco clases principales de cadena pesada (o isotipos) que determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. Las cadenas pesadas se clasifican como γ , m, α , δ o ϵ , que a su vez definen las clases de inmunoglobulina, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (V_H) y una región constante de cadena pesada (C_H). La región constante de la cadena pesada está compuesta por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable ligera (V_L) y una región constante de cadena ligera (C_L). Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes complementarias (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada V_H y V_L está compuesta por tres CDR y cuatro FR dispuestas desde el extremo N al extremo C en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del huésped, incluidas diversas células del sistema inmunitario (p. ej., células efectoras) y el primer componente del sistema del

complemento clásico. El término "anticuerpo" abarca anticuerpos monoclonales (que muestran una única especificidad y afinidad de unión para un epítipo particular) y anticuerpos policlonales (es decir, una colección de moléculas de inmunoglobulina que reaccionan contra un antígeno específico, identificando cada una un epítipo diferente). Los anticuerpos de acuerdo con la invención pueden ser anticuerpos humanizados o anticuerpos quiméricos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "**anticuerpo quimérico**" se refiere a una molécula de inmunoglobulina en la que (a) la región constante, o una porción de la misma, se altera, reemplaza o intercambia de manera que el sitio de unión del anticuerpo (región variable) está unido a una región constante de una clase diferente o alterada, función efectora y/o especie, o una molécula completamente diferente que transmite nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, *p. ej.*, una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, fármaco, etc., o (b) la región variable, o una porción de la misma, se altera, reemplaza o intercambia con una región variable, o una porción de la misma, que tiene una especificidad de antígeno diferente o alterada, o con las secuencias correspondientes de otra especie o de otra clase o subclase de anticuerpos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "**anticuerpo humanizado**" se refiere a una molécula de inmunoglobulina en la que las CDR de un anticuerpo donante se injertan en secuencias marco humanas. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos de origen donante en las secuencias marco. El anticuerpo humanizado también puede comprender al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos humanizados también pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor ni en las CDR o secuencias marco.

Como se usa en el presente documento, la expresión "**fragmento o derivado de anticuerpo**" se refiere a cualquier derivado de un anticuerpo que sea menor que la longitud completa. En general, un fragmento de anticuerpo conserva al menos una porción significativa de la capacidad de unión específica del anticuerpo de longitud completa. Un fragmento de anticuerpo puede producirse por cualquier medio. Si bien diversos fragmentos de anticuerpos se definen en términos de la digestión enzimática de un anticuerpo intacto, un experto apreciará que los fragmentos se pueden sintetizar de *novo* ya sea químicamente o utilizando metodología de ADN recombinante. Por lo tanto, la expresión "fragmento o derivado de anticuerpo", como se usa en el presente documento, incluye fragmentos de anticuerpo producidos por la modificación de anticuerpos completos o sintetizados usando otras metodologías, como las metodologías de ADN recombinante. Un fragmento o derivado de anticuerpo puede comprender opcionalmente un fragmento de anticuerpo de cadena única. Como alternativa o además, un fragmento o derivado de anticuerpo puede comprender múltiples cadenas que están unidas entre sí, por ejemplo, mediante enlaces disulfuro. Un fragmento o derivado de anticuerpo puede comprender opcionalmente un complejo multimolecular. Un fragmento o derivado de anticuerpo funcional comprende típicamente al menos aproximadamente 200 aminoácidos y más típicamente comprende al menos aproximadamente 200 aminoácidos. Existe un número de fragmentos o derivados de anticuerpo bien caracterizados que conservan la unión específica, que incluyen, pero sin limitación, Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, Fv, diacuerpo de dsFv y fragmentos Fd. Por lo tanto, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo C-terminal de los enlaces disulfuro en la región de bisagra para producir F(ab)₂, un dímero de Fab que en sí mismo es una cadena ligera unida a V_H-C_{H1} mediante un enlace disulfuro. El F(ab)₂ se puede reducir en condiciones suaves para romper el enlace disulfuro en la región de bisagra, convirtiendo por tanto el dímero F(ab)₂ en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente un Fab con parte de la región bisagra. Los fragmentos de anticuerpo incluyen dímeros V_H-V_L. Un fragmento Fv es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene un sitio de reconocimiento y unión al antígeno completo, el cual consiste en un dominio V_H y un dominio V_L en estrecha asociación no covalente. Un polipéptido Fv de cadena sencilla ("scFv") es un heterodímero V_H-V_L unido covalentemente que se expresa generalmente a partir de una fusión de genes incluyendo genes que codifican V_H y V_L unidos por un enlazador que codifica el péptido. Un fragmento Fv estabilizado por disulfuro ("dsFv") es un heterodímero V_H-V_L estabilizado por un enlace disulfuro. Los fragmentos de anticuerpos divalentes y multivalentes pueden formarse espontáneamente por asociación de scFvs monovalentes, o pueden generarse por acoplamiento de scFv monovalentes por un enlazador peptídico, tal como sc(Fv)₂ divalente. Un fragmento Fd consiste en los dominios V_H y C_{H1}. Un fragmento dAb (Ward *et al.*, Nature, 1989, 341:544-546) es el dominio variable de una cadena pesada de anticuerpo (dominio V_H) o el dominio variable de una cadena ligera de anticuerpo (dominio V_L). Por lo tanto, cada Dab contiene de 3 a 6 CDR de origen natural de un anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo también pueden incorporarse en dominios de un solo dominio, maxicuerpos, minicuerpos, intracuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR y bis-scFv (véasep. ej., Hollinger y Hudson, Nature Biotechnology, 2005, 23:1126-1136). Los fragmentos de anticuerpos se pueden incorporar en moléculas de cadena sencilla que comprenden un par de segmentos tándem Fv (V_H-C_{H1}-V_H-C_{H1}) que, junto con polipéptidos de cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de unión a antígeno (Zapata *et al.*, Protein Eng., 1995, 8:1057-1062; la Patente de EE.UU n.º 5.641.870).

Se dice que un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo o derivado del mismo, "**reconoce**" un polipéptido diana (o, de manera más general, una molécula diana) si encuentra e interactúa con (p. ej., se une a) el polipéptido diana (o molécula diana). Por lo tanto, el "reconocimiento" implica la reacción de unión del anticuerpo con el polipéptido diana. La expresión "**específicamente**" (o selectivamente) "**reconoce**", cuando se usa en referencia a un anticuerpo, o un fragmento o derivado de anticuerpo, se refiere a un anticuerpo, o fragmento o derivado, que se une inmunoespecíficamente a un antígeno predeterminado. Típicamente, el anticuerpo se une con una afinidad de al

menos $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, y se une al antígeno predeterminado con una afinidad que es al menos dos veces mayor que la afinidad para unirse a un antígeno no específico (p. ej., BSA, HSA, caseína). En particular, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo o derivado descrito en el presente documento específicamente (o selectivamente) reconoce (es decir, se une específicamente o selectivamente a) pVHL172 humana. Las expresiones **"reconoce específicamente o selectivamente las tres isoformas de pVHL humana"** y **"se une específicamente o selectivamente a las tres isoformas de pVHL humana"** se usan en el presente documento de manera intercambiable y se refieren a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo o derivado que se une a pVHL172 humana, a pVHL213 humana y a pVHL160 humana, pero no se une a ningún antígeno no específico.

El término **"aislado"**, como se usa en el presente documento en referencia a una proteína o polipéptido (p. ej., un anticuerpo monoclonal o un fragmento o derivado del mismo), significa una proteína o polipéptido, que en virtud de su origen o manipulación se separa de al menos algunos de los componentes con los que está naturalmente asociado o con los que está asociado cuando se obtiene inicialmente. Por "aislado", se entiende como alternativa o además que la proteína o polipéptido de interés se produce o sintetiza de la mano del hombre.

El término **"marcado"**, y las expresiones **"unido a un agente detectable"** y **"unido a un resto detectable"** se usan en el presente documento de manera intercambiable. Estos términos y expresiones se usan para especificar que una entidad (p. ej., un anticuerpo) puede visualizarse, por ejemplo, después de unirse a otra entidad (p. ej., un antígeno). Preferentemente, un agente o resto detectable se selecciona de manera que genere una señal que pueda medirse y cuya intensidad esté relacionada con la cantidad de entidad unida. Los métodos para marcar proteínas y polipéptidos, incluidos los anticuerpos, son bien conocidos en la técnica. Los polipéptidos marcados pueden prepararse mediante la incorporación, o conjugación con, un marcador que sea directa o indirectamente detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inorgánicos, eléctricos, ópticos o químicos, o cualquier otro medio adecuado. Los agentes detectables adecuados incluyen, pero sin limitación, diversos ligandos, radionúclidos, colorantes fluorescentes, agentes quimioluminiscentes, micropartículas, enzimas, marcadores colorimétricos, marcadores magnéticos y haptenos.

Los términos **"proteína"**, **"polipéptido"** y **"péptido"** se usan en el presente documento de manera intercambiable, y se refieren a secuencias de aminoácidos de una diversidad de longitudes, ya sea en sus formas neutras (no cargadas) o como sales, y no modificadas o modificadas por glicosilación, oxidación de cadenas laterales o fosforilación. En determinadas realizaciones, la secuencia de aminoácidos es una proteína nativa de longitud completa. En otras realizaciones, la secuencia de aminoácidos es un fragmento más pequeño de la proteína de longitud completa. En aún otras realizaciones, la secuencia de aminoácidos se modifica mediante sustituyentes adicionales unidos a las cadenas laterales de aminoácidos, tales como unidades glicosílicas, lípidos o iones inorgánicos tales como fosfatos, así como modificaciones relacionadas con las conversiones químicas de las cadenas tales como oxidación de grupos sulfidrilos. Por lo tanto, el término "proteína" (o sus términos equivalentes) pretende incluir la secuencia de aminoácidos de la proteína nativa de longitud completa, o un fragmento de la misma, sujeto a aquellas modificaciones que no cambien significativamente sus propiedades específicas. En particular, el término "proteína" abarca isoformas de proteínas, es decir, las variantes que están codificadas por el mismo gen, pero que difieren en su pl o PM, o ambos. Dichas isoformas pueden diferir en su secuencia de aminoácidos (p. ej., como resultado de la variación alélica, el corte y empalme alternativo o la proteólisis limitada) o, como alternativa, pueden surgir de una modificación postraducciona diferencial (p. ej., glicosilación, acilación, fosforilación). Las proteínas o polipéptidos pueden ser anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, un fragmento biológicamente activo de los mismos y/o porciones características de los mismos.

La expresión **"análogo de proteína"**, como se usa en el presente documento en referencia a una proteína, se refiere a un polipéptido que posee una función similar o idéntica a la proteína pero no necesariamente comprende una secuencia de aminoácidos que sea similar o idéntica a la secuencia de aminoácidos de la proteína o una estructura que es similar o idéntica a la de la proteína. Preferentemente, un análogo de proteína tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 30 %, más preferentemente, al menos aproximadamente 35 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 45 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 55 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 65 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 % o al menos aproximadamente 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la proteína.

Los términos **"fragmento"** y **"porción"**, como se usan en el presente documento de manera intercambiable con referencia a una proteína, se refieren a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de al menos 5 restos de aminoácidos consecutivos (preferentemente, al menos aproximadamente: 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 250 o más restos de aminoácidos) de la secuencia de aminoácidos de una proteína. El fragmento de una proteína puede o no poseer una actividad funcional de la proteína.

La expresión **"biológicamente activo"**, como se usa en el presente documento para caracterizar una variante de proteína (p. ej., un anticuerpo), un fragmento de proteína o un derivado de proteína, se refiere a una molécula que comparte suficiente identidad de secuencia de aminoácidos u homología con la proteína para mostrar propiedades similares o idénticas a la proteína. Por ejemplo, en muchas realizaciones de la presente invención, un fragmento

biológicamente activo de un anticuerpo monoclonal de la invención es un fragmento que conserva la capacidad del anticuerpo monoclonal para reconocer las tres isoformas de pVHL humana, incluyendo pVHL172 humana.

El término "**homólogo**" (u "**homología**"), como se usa en el presente documento, es sinónimo del término "**identidad**" y se refiere a la similitud de secuencia entre dos moléculas de polipéptido o entre dos moléculas de ácido nucleico. Cuando una posición en ambas secuencias comparadas está ocupada por la misma base o el mismo resto de aminoácido, las moléculas respectivas son entonces homólogas en esa posición. El porcentaje de homología entre dos secuencias corresponde al número de posiciones coincidentes u homólogas compartidas por las dos secuencias divididas por el número de posiciones comparadas y multiplicadas por 100. En general, se hace una comparación cuando dos secuencias se alinean para proporcionar la máxima homología. Las secuencias de aminoácidos homólogas comparten secuencias de aminoácidos idénticas o similares. Los restos similares son sustituciones conservativas, o "mutaciones puntuales permitidas" de los correspondientes restos de aminoácidos en una secuencia de referencia. "Sustituciones conservativas" de un resto en una secuencia de referencia son sustituciones que son físicamente o funcionalmente similares al correspondiente resto de referencia, p. ej., que tienen un tamaño, forma, carga eléctrica, propiedades químicas similares, incluida la capacidad de formar enlaces covalentes o de hidrógeno, o similares. Las sustituciones conservativas particularmente preferentes son aquellas que satisfacen los criterios definidos para una "mutación puntual aceptada" como se describe por Dayhoff *et al.* ("Atlas of Protein Sequence and Structure", 1978, Nat. Biomed. Res. Foundation, Washington, DC, Suppl. 3, 22:354-352).

Como se usa en el presente documento, el término "**sujeto**" se refiere a un ser humano u otro mamífero (p. ej., primate, ratón, rata, conejo y similares). En muchas realizaciones de la presente invención, el sujeto es un ser humano. En dichas realizaciones, a menudo se denomina al sujeto "**individuo**" o "**paciente**". Los términos "individuo" y "paciente" no indican ninguna edad en particular. Un "paciente" generalmente se ve afectado con una enfermedad, trastorno y/o afección médica (p. ej., se le ha diagnosticado una enfermedad, trastorno y/o afección médica, y/o muestra uno o más síntomas de la enfermedad, trastorno y/o afección médica).

La expresión "**muestra biológica**" se usa en el presente documento en su sentido más amplio. Una muestra biológica se obtiene generalmente de un sujeto. Una muestra puede ser de cualquier tejido biológico o líquido que exprese la proteína VHL. Frecuentemente, una muestra será una "muestra clínica", es decir, una muestra procedente de un paciente. Dichas muestras incluyen, pero sin limitación, líquidos corporales que pueden o no contener células, p. ej., sangre (sangre total, suero o plasma), orina o saliva, muestras de biopsia de tejido o aguja fina y muestras de archivo con diagnóstico, tratamiento y/o historial de resultados conocidos. Las muestras biológicas también pueden incluir secciones de tejidos, como secciones congeladas tomadas con fines histológicos. La expresión "muestra biológica" también abarca cualquier material procedente u obtenido al procesar la muestra biológica. Los materiales derivados incluyen, pero sin limitación, células (o su progenie) aisladas de la muestra, proteínas o moléculas de ácido nucleico extraídas de la muestra. El procesamiento de una muestra biológica puede implicar uno o más de: filtración, destilación, extracción, concentración, inactivación de componentes interferentes, adición de reactivos y similares.

Como se usa en el presente documento, el término "**sustancialmente**" se refiere a la condición cualitativa de mostrar la extensión o el grado total o casi total de una característica o propiedad de interés. Un experto en la técnica entenderá que los fenómenos biológicos y químicos rara vez, o nunca, llegan a completarse y/o se completan o logran o evitan un resultado absoluto. Por lo tanto, el término "sustancialmente" se usa en el presente documento para capturar la posible falta de integridad inherente en muchos fenómenos biológicos y químicos.

Los términos "**aproximadamente**" y "**alrededor de**", como se usa en el presente documento con referencia a un número, generalmente incluyen números que pertenecen a un intervalo del 10 % en cualquier dirección del número (mayor o menor que el número) a menos que se indique otra cosa o de otro modo sea evidente a partir del contexto (excepto cuando dicho número exceda el 100 % de un valor posible).

Descripción detallada de la invención

Como se ha mencionado anteriormente, la presente invención proporciona moléculas de anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente pVHL172 humana (junto con las otras dos isoformas de pVHL, es decir, pVHL213 humana y pVHL1460 humana), y una línea celular de hibridoma que secreta dichos anticuerpos monoclonales.

I- Hibridomas y anticuerpos anti-pVHL172

Como se muestra en la sección de ejemplos a continuación, los presentes solicitantes han usado la inmunización genética de ratones y los métodos de detección para generar una línea celular de hibridoma que secreta anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente las tres isoformas de pVHL humana, incluyendo pVHL172 humana. Las expresiones "anticuerpo monoclonal anti-pVHL172" y "anticuerpo monoclonal anti-pVHL" se usan en el presente documento de manera intercambiable y se refieren a un anticuerpo monoclonal que se une a las tres isoformas de pVHL humana.

A. Línea celular de hibridoma y anticuerpos monoclonales anti-pVHL172

En consecuencia, la presente invención proporciona una línea celular de hibridoma que secreta anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente las tres isoformas de pVHL humana. Más específicamente, los anticuerpos monoclonales secretados por la línea celular de hibridoma de la presente invención reconocen específicamente pVHL172 humana así como pVHL213 humana y pVHL160 humana. En determinadas realizaciones preferentes, la pVHL213 humana tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:1 (número de acceso de GenBank NP_000542.1) o una secuencia homóloga de la misma que resulta de la degeneración del código genético, la pVHL160 humana tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:2 o una secuencia homóloga de la misma que resulta de la degeneración del código genético, y pVHL172 humana tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:3 (número de acceso de GenBank NP_937799.1) o una secuencia homóloga de la misma que resulta de la degeneración del código genético, en la que:

SEQ ID NO: 1:

```
MPRRAENWDE AEVGAAEEAGV EEYGPEEDGG EESGAEESGP EESGPEELGA
EEEMEAGRPR PVLRSVNSRE PSQVIFCNRS PRVVLPVWLN FDGEPQPYPT
LPPGTGRRIH SYRGHLWLF R DAGTHDGLLV NQTELFVPSL NVDGQPIFAN
ITLTPVYTLKE RCLQVVRSLV KPENYRRLDI VRSLYEDLED HPNVQKDLER
LTQERIAHQ R MGD
```

SEQ ID NO: 2:

```
MEAGRPRPVL RSVNSREPSQ VIFCNRSRPR VLPVWLNFDG EPQPYPTLPP
GTGRRIHSYR GHLWLF RDAG THDGLLVNQT ELFVPSLNVD GQPIFANITL
PVYTLKERCL QVVRSLVKPE NYRRLDIVRS LYEDLEDHPN VQKDLERLTQ
ERIAHQRMGD
```

SEQ ID NO: 3:

```
MPRRAENWDE AEVGAAEEAGV EEYGPEEDGG EESGAEESGP EESGPEELGA
EEEMEAGRPR PVLRSVNSRE PSQVIFCNRS PRVVLPVWLN FDGEPQPYPT
LPPGTGRRIH SYRVYTLKER CLQVVRSLVK PENYRRLDIV RSLYEDLEDH
PNVQKDLERL TQERIAHQ R MGD
```

Más específicamente, la presente invención proporciona una línea de células de hibridoma que secreta anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente una región de pVHL172 humana en la porción N-terminal de pVHL172. Esta región es común a la pVHL213 humana y a la pVHL160 humana. La región de pVHL172 humana en la porción N-terminal de pVHL172 está en el interdominio entre el dominio ácido y el dominio β de pVHL172 (véase la Figura 1).

En particular, la línea celular de hibridoma de la presente invención secreta anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente una región de pVHL172 humana en el interdominio entre el dominio ácido y el dominio β de pVHL172, en el que dicha región de pVHL172 humana comprende, o consiste en, la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:4 (EAGRPRPVL). En particular, la línea celular de hibridoma de la presente invención secreta anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente una región de VHL172 humana que consiste en la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:5 (AGRPR).

Más específicamente, la presente invención proporciona una línea celular de hibridoma, que se generó mediante inmunización genética como se describe en la sección de ejemplos y que secreta anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente las tres isoformas de pVHL humana, incluyendo pVHL172 humana. Esta línea celular de hibridoma, que se llama JD1956 o VHL-1956, fue depositada por los solicitantes el 18 de abril de 2014 en la CNCM (Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos, Instituto Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15) con el número de acceso CNCM 1-4857.

La presente invención también proporciona anticuerpos monoclonales secretados por esta línea celular de hibridoma que reconocen específicamente pVHL172, pVHL213 y pVHL160, las tres isoformas de pVHL humana. Los métodos para la producción y el aislamiento de anticuerpos monoclonales a partir de cultivos de hibridoma son bien conocidos en la técnica. Las células de hibridoma se cultivan utilizando métodos convencionales, en medios de cultivo adecuados tales como, por ejemplo, medio D-MEM y RPMI-1640. Un anticuerpo monoclonal anti-pVHL puede recuperarse y purificarse a partir de cultivos celulares de hibridoma mediante purificación de proteína A, precipitación

con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, tal como columna de proteína A, cromatografía de hidroxilapatita, cromatografía de lectina, o cualquier combinación adecuada de estos métodos. La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) también se puede emplear para la purificación.

5 Los anticuerpos monoclonales de la presente invención generalmente comprenden cualquier anticuerpo monoclonal que es secretado por la línea celular de hibridoma de la invención (o una línea celular derivada) y que reconoce específicamente las tres isoformas de pVHL humana, incluyendo pVHL172 humana, y en particular una región en el interdominio entre el dominio ácido y el dominio β de pVHL172 humana. La invención también abarca cualquier
10 fragmento biológicamente activo de dicho anticuerpo monoclonal que conserva la capacidad de reconocer específicamente las tres isoformas de pVHL humana, incluyendo pVHL172 humana, y en particular una región en el interdominio entre el dominio ácido y el dominio β de pVHL172 humana. En determinadas realizaciones preferentes, un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la invención, o un fragmento biológicamente activo del mismo, reconoce específicamente una región de pVHL172 humana que comprende, o consiste en, la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:4. En otras realizaciones preferentes, un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la invención, o un fragmento biológicamente activo del mismo, reconoce específicamente una región de pVHL172 humana que comprende, o consiste en, la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:5.

20 En lugar de usar la línea celular de hibridoma descrita en el presente documento como fuente para los anticuerpos, los anticuerpos monoclonales pueden prepararse mediante cualquier otro método adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti-pVHL de la invención puede prepararse mediante métodos de ADN recombinante. Estos métodos generalmente implican el aislamiento del gen que codifica el anticuerpo deseado, la transferencia del gen a un vector adecuado y la expresión en masa en un sistema de cultivo celular. El gen o ADN que codifica el anticuerpo monoclonal deseado puede aislarse y secuenciarse fácilmente usando procedimientos
25 convencionales (p. ej., mediante el uso de sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente a los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos murinos). La línea celular de hibridoma proporcionada en el presente documento sirve como una fuente preferente de dicho ADN. Las células huésped adecuadas para la producción recombinante de anticuerpos monoclonales incluyen, pero sin limitación, células huésped de mamíferos adecuadas, tales como CHO, HeLa o CV1. Los plásmidos de expresión adecuados incluyen, sin limitación, pcDNA3.1 Zeo, pIND (SP1), pREP8 (todos disponibles en el mercado de Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.), y similares. Los genes de anticuerpos pueden expresarse a través de vectores virales o retrovirales, que incluyen vectores basados en MLV, vectores basados en virus vaccinia y similares. Los anticuerpos de la presente invención pueden expresarse como anticuerpos de cadena única. El aislamiento y la purificación de anticuerpos monoclonales producidos de forma recombinante se pueden realizar como se describe anteriormente.

35 **B. Fragmentos de anticuerpo**

En determinadas realizaciones, un anticuerpo monoclonal de la invención se usa en su forma nativa. En otras realizaciones, se puede trincar (p. ej., a través de escisión enzimática u otro método adecuado) para proporcionar
40 fragmentos o porciones de inmunoglobulina, en particular, fragmentos o porciones que son biológicamente activos. Los fragmentos o porciones biológicamente activos de un anticuerpo monoclonal de la invención incluyen fragmentos o porciones que conservan la capacidad del anticuerpo monoclonal para reconocer específicamente las tres isoformas de pVHL humana, incluyendo pVHL172 humana. En particular, los fragmentos o porciones biológicamente activos de un anticuerpo monoclonal de la invención conservan la capacidad del anticuerpo monoclonal para reconocer específicamente una región en el interdominio entre el dominio ácido y el dominio β de la pVHL172 humana. En particular, un fragmento o porción biológicamente activo de un anticuerpo monoclonal de la invención reconoce específicamente una región de pVHL172 humana que comprende, o consiste en, la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:4. En otras realizaciones preferentes, un fragmento o porción biológicamente activo de un anticuerpo monoclonal de la invención reconoce específicamente una región de pVHL172 humana que comprende, o consiste en, la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:5. Los fragmentos o porciones biológicamente activos de anticuerpos monoclonales de la invención descritos en el presente documento se abarcan en la presente invención.

55 Un fragmento o porción biológicamente activo de un anticuerpo monoclonal de la invención puede ser un fragmento o porción Fab, un fragmento o porción $F(ab')_2$, un dominio variable o una o más CDR (regiones determinantes complementarias) del anticuerpo. Como alternativa, un fragmento o porción biológicamente activo de un anticuerpo monoclonal de la invención se puede obtener de la porción o extremo carboxilo de la proteína del anticuerpo y puede comprender un fragmento Fc, un fragmento Fd o un fragmento Fv.

60 Los fragmentos de anticuerpos de la presente invención pueden producirse por cualquier método adecuado conocido en la técnica, que incluye, pero sin limitación, escisión enzimática (p. ej., digestión proteolítica de anticuerpos intactos) o mediante técnicas sintéticas o recombinantes. Los fragmentos de anticuerpo $F(ab')_2$, Fab, Fv y ScFv (cadena simple Fv), pueden, por ejemplo, expresarse y secretarse a partir de células huésped de mamíferos o de *E. coli*. Los anticuerpos también pueden producirse en una diversidad de formas truncadas usando genes de anticuerpos en los que se han introducido uno o más codones de terminación corriente arriba del sitio de terminación natural. Las diversas porciones de estos anticuerpos se pueden unir químicamente mediante técnicas

convencionales o se pueden preparar como una proteína contigua usando técnicas de ingeniería genética.

C. Proteínas de fusión y derivados de anticuerpo

5 Los anticuerpos monoclonales (o fragmentos de los mismos), como se describe en el presente documento, se pueden producir en una forma modificada, como una proteína de fusión (es decir, una molécula o porción de inmunoglobulina unida a una entidad polipeptídica). Las proteínas de fusión descritas en el presente documento conservan la capacidad de unión del anticuerpo monoclonal hacia una región en el interdominio entre el dominio ácido y el dominio β del pVHL172 humana (p. ej., una región de la pVHL172 humana que comprende, o que consiste en, la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:4 y/o una región de pVHL172 humana que comprende, o que consiste en, la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:5). Una entidad polipeptídica a fusionar con un anticuerpo monoclonal de la invención, o un fragmento del mismo, puede seleccionarse para conferir cualquiera de una serie de propiedades ventajosas a la proteína de fusión resultante. Por ejemplo, la entidad polipeptídica puede seleccionarse para proporcionar una expresión incrementada de la proteína de fusión recombinante. Como alternativa o además, la entidad polipeptídica puede facilitar la purificación de la proteína de fusión, por ejemplo, actuando como un ligando en la purificación por afinidad. Se puede añadir un sitio de escisión proteolítica a la proteína recombinante de modo que la secuencia deseada pueda en última instancia separarse de la entidad polipeptídica después de la purificación. La entidad polipeptídica también puede seleccionarse para conferir una estabilidad mejorada a la proteína de fusión, cuando la estabilidad es un objetivo. Ejemplos de entidades polipeptídicas adecuadas incluyen, pero sin limitación, etiquetas de polihistidina, que permiten la fácil purificación de la proteína de fusión resultante en una columna quelante de níquel. La glutatión-S-transferasa (GST), la proteína de unión a la maltosa B, o proteína A son otros ejemplos de entidades polipeptídicas adecuadas.

25 Dependiendo del uso previsto, una molécula de anticuerpo descrita en el presente documento puede ser rediseñada por ingeniería para optimizar la estabilidad, solubilidad, semivida *in vivo*, o la capacidad de enlazar objetivos adicionales. Los enfoques de ingeniería genética, así como las modificaciones químicas para lograr cualquiera o todos estos cambios en las propiedades son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se sabe que la adición, eliminación y/o modificación de las regiones constantes de un anticuerpo desempeñan un papel particularmente importante en la biodisponibilidad, distribución y semivida de los anticuerpos administrados. La clase y subclase de anticuerpos, determinada por la Fc o región constante del anticuerpo (que media las funciones efectoras), cuando está presente, transmite importantes propiedades adicionales. Por lo tanto, se describen anticuerpos anti-pVHL que contienen dominios constantes reconfigurados, rediseñados o alterados de otra manera.

35 Se pueden generar proteínas de fusión adicionales a través de las técnicas de barajado de ADN bien conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n.º 5.605.793; 5.811.238; 5.830.721; 5.834.252; y 5.837.458). El barajado de ADN se puede emplear para modular la actividad de anticuerpos, o fragmentos de los mismos, por ejemplo, para obtener anticuerpos con mayor afinidad y menores velocidades de disociación. En dichos métodos, los polinucleótidos que codifican anticuerpos pueden alterarse a través de mutagénesis aleatoria mediante PCR propensa a error, inserción de nucleótidos aleatorios u otros métodos previos a la recombinación. Como alternativa, una o más porciones de un polinucleótido que codifica un anticuerpo descrito en el presente documento pueden recombinarse con uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc. de una o más moléculas heterólogas.

45 Como alternativa, un anticuerpo descrito en el presente documento puede unirse a otro anticuerpo, p. ej., para producir un anticuerpo biespecífico o multiespecífico. Los métodos para producir anticuerpos biespecíficos y multiespecíficos son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, síntesis química que implica reticulación a través de enlaces disulfuro reducibles o enlaces tioéter no reducibles, y métodos recombinantes.

D. Anticuerpos quiméricos/humanizados o desinmunizados

50 Los anticuerpos monoclonales anti-pVHL de la presente invención también pueden ser "humanizados": las diferencias de secuencia entre los anticuerpos de roedores y las secuencias humanas pueden minimizarse reemplazando los restos que difieren de los de las secuencias humanas por mutagénesis dirigida al sitio de restos individuales o por injerto de regiones enteras o por síntesis química. Los anticuerpos humanizados también pueden producirse usando métodos recombinantes. En la forma humanizada del anticuerpo, algunos, la mayoría o todos los aminoácidos fuera de las regiones CDR se reemplazan con aminoácidos de moléculas de inmunoglobulina humana, mientras que algunos, la mayoría o todos los aminoácidos dentro de una o más regiones CDR no cambian. Pequeñas adiciones, supresiones, inserciones, sustituciones o modificaciones de aminoácidos son permisibles siempre que no anulen la capacidad del anticuerpo resultante para reconocer específicamente las tres isoformas de pVHL humana, incluyendo pVHL172 humana, en particular una región en el interdominio entre el dominio ácido y el dominio β de la pVHL172 humana (p. ej., una región de pVHL172 humana que comprende, o que consiste en, la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:4 y/o una región de pVHL172 humana que comprende, o que consiste en, la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:5). Las moléculas de inmunoglobulina humana de "reemplazo" adecuadas incluyen moléculas de IgG1, IgG2, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4, IgA, IgM, IgD o IgE, y fragmentos de las mismas. Como alternativa, los epítomos de células T presentes en los anticuerpos de roedores pueden modificarse por mutación (desinmunización) para generar anticuerpos de roedores no inmunogénicos que pueden aplicarse con

finés terapéuticos en seres humanos (véase, por ejemplo, el sitio web de Accuro Biologics).

La humanización se puede realizar usando métodos conocidos en la técnica (p. ej., Jones *et al.*, Nature, 1986, 321:522-525; Riechmann *et al.*, Nature, 1988, 332:323-327; Verhoeyen *et al.*, Science, 1988, 239:1534-1536; Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 1992, 2:593-596; la patente de EE.UU n.º 4.816.567), que incluyen técnicas como los anticuerpos "sobrehumanizantes" (Tan *et al.*, J. Immunol., 2002, 169:1119) y los anticuerpos "resurgentes" (p. ej., Staelens *et al.*, Mol. Immunol., 2006, 43: 1243; y Roguska *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 1994, 91:969).

E. Conjugados de anticuerpos

Un anticuerpo monoclonal de la invención, o un fragmento biológicamente activo del mismo, puede estar unido funcionalmente (p. ej., mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o más entidades moleculares diferentes. Los métodos para la preparación de dichos anticuerpos modificados (o anticuerpos conjugados) son conocidos en la técnica. (véase, por ejemplo, "Affinity Techniques. Enzyme Purification: Part B", Methods in Enzymol., 1974, vol. 34, W.B. Jakoby y M. Wilneck (Eds.), Academic Press: Nueva York, NY; y M. Wilchek y E.A. Bayer, Anal. Biochem., 1988, 171:1-32). Preferentemente, las entidades moleculares están unidas en posiciones en la molécula de anticuerpo que no interfieren con las propiedades de reconocimiento del conjugado resultante, *es decir*, las posiciones que no participan en la unión específica del anticuerpo a pVHL humana, y más particularmente las posiciones que no participan en la unión específica del anticuerpo a una región en el interdominio entre el dominio ácido y el dominio β de la pVHL172 humana (p. ej., una región de pVHL172 humana que comprende, o que consiste en, la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:4 y/o una región de pVHL172 humana que comprende, o que consiste en, la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:5).

En determinadas realizaciones, la molécula de anticuerpo y la entidad molecular están unidas covalentemente directamente entre sí. La unión covalente directa puede ser a través de un enlace tal como un enlace carbono-carbono, disulfuro, amida, éster, carbamato, éter, tioéter, urea, amino o carbonato. La unión covalente se puede lograr aprovechando los grupos funcionales presentes en el anticuerpo y la entidad molecular. Se puede usar un agente activador, como una carbodiimida, para formar un enlace directo. En otras realizaciones, la molécula de anticuerpo y la entidad molecular están unidas covalentemente entre sí a través de un grupo enlazador. Esto se puede lograr mediante el uso de cualquiera de una amplia diversidad de agentes bifuncionales estables bien conocidos en la técnica, incluidos los enlazadores homofuncionales y heterofuncionales.

Un anticuerpo de la presente invención (o un fragmento biológicamente activo del mismo) puede conjugarse con un agente o resto detectable. En la práctica de la presente invención se puede usar cualquiera de una amplia diversidad de agentes detectables, incluyendo, sin limitación, diversos ligandos, radionúclidos (p. ej., ^3H , ^{125}I , ^{131}I y similares), tintes fluorescentes (p. ej., isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofocianina, o-ftalaldehído y fluorescamina), agentes de quimioluminiscencia (p. ej., luciferina, luciferasa y aequorina), micropartículas (como, por ejemplo, puntos cuánticos, nanocristales, fósforos y similares), enzimas (como, por ejemplo, las usadas en un ELISA, *es decir*, peroxidasa de rábano picante, beta-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), marcadores colorimétricos, marcadores magnéticos y biotina, dioxigenina u otros haptenos y proteínas para los cuales están disponibles antisueros o anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos detectables resultantes se pueden usar en métodos de detección (véase a continuación).

Otras entidades moleculares que pueden conjugarse con un anticuerpo de la presente invención (o un fragmento biológicamente activo del mismo) incluyen, pero sin limitación, grupos poliméricos hidrófilos lineales o ramificados, grupos de ácidos grasos o grupos de ésteres grasos.

Por lo tanto, además de los anticuerpos monoclonales anti-pVHL secretados por la línea celular de hibridoma descrita en el presente documento, y cualquier fragmento biológicamente activo de los mismos, también se describen en el presente documento anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y moléculas procedentes de anticuerpos que comprenden al menos una región determinante complementaria (CDR) de una región variable de cadena pesada o cadena ligera de un anticuerpo monoclonal anti-pVHL secretado, incluidas moléculas tales como fragmentos Fab, fragmentos F(ab')_2 , fragmentos Fd, fragmentos Fabc, anticuerpos Sc (anticuerpos monocatenarios), diacuerpos, cadenas individuales ligeras de anticuerpos individuales, cadenas pesadas de anticuerpos individuales, fusiones quiméricas entre cadenas de anticuerpos y otras moléculas, y conjugados de anticuerpos, como anticuerpos conjugados con un agente de diagnóstico o terapéutico, que son todos los derivados de anticuerpos. Todos estos anticuerpos y moléculas relacionadas con anticuerpos descritos en el presente documento reconocen específicamente las tres isoformas de pVHL humana, incluyendo pVHL172 humana, en particular una región en el interdominio entre el dominio ácido y el dominio β de pVHL172 humana (p. ej., una región de pVHL172 humana que comprende, o que consiste en, la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:4 y/o una región de pVHL172 humana que comprende, o que consiste en, la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:5).

F. Actividad y especificidad de los anticuerpos monoclonales de la invención y moléculas relacionadas

Los anticuerpos, fragmentos y derivados de los mismos pueden ensayarse para determinar la unión específica por cualquier método conocido en la técnica. Se pueden usar muchos formatos de ensayo de unión competitiva

diferentes para la unión de especificidad. Los ensayos inmunológicos que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, sistemas de ensayo competitivos que usan técnicas tales como transferencias Western, ensayos radioinmunológicos, ELISA, inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de precipitación inmunológica, ensayos de precipitina, ensayos de precipitina de difusión en gel, ensayos de radiometría inmunológica, ensayos inmunológicos fluorescentes, ensayos inmunológicos de proteína A, y ensayos de fijación de complemento. Dichos ensayos son habituales y bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, eds, Current Protocols in Molecular Biology, 1994, vol. 1, John Wiley & sons, Inc., Nueva York y "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane, 1988).

Estos métodos pueden usarse para probar sobrenadantes de hibridomas que producen anticuerpos, para probar la actividad de anticuerpos monoclonales aislados/purificados, y/o para probar la actividad de anticuerpos modificados (p. ej., fragmentos biológicamente activos de los mismos, derivados de los mismos, conjugados de los mismos, etc.). La prueba de especificidad de unión se puede realizar usando el anticuerpo monoclonal o la molécula relacionada con el anticuerpo monoclonal contra un panel de células, p. ej., células humanas, incluidas líneas de células renales (como, por ejemplo, células 293 de riñón embrionario humano o células 293 HEK, líneas de células de carcinoma renal humano como células 769-P, células 786-O, células A-498, líneas de células de adenocarcinoma como células A-407 o células ACHN, líneas celulares de carcinoma de células claras de riñón humano tales como células CaKi-1 o CaKi-2, RCC-ER, RCC-GF1, RCC-FG2, RCC-GH, RCC-GS, RCC-HB; RCC-JF, RCC-JW, RCC-KL, RCC-KP, RCC-LR, RCC-MF, RCC-MH, RCC-OF1, RCC-PR o RCC-WK, líneas de células de riñón humano como células RC-124, o líneas de células de riñón humano (tumor de Wilm) como células SK-NEP1 o células WT-CLS1). El análisis de citometría de flujo puede poner de manifiesto la especificidad de unión del anticuerpo monoclonal o molécula relacionada con el anticuerpo monoclonal para las tres isoformas de pVHL humana, incluyendo pVHL172 humana, en diversos tipos de células.

II. Usos de los anticuerpos monoclonales anti-pVHL

Los anticuerpos (es decir, anticuerpos monoclonales anti-pVHL excretados por la línea celular de hibridoma descrita en el presente documento) y anticuerpos modificados (fragmentos biológicamente activos o derivados de anticuerpos monoclonales anti-pVHL excretados por la línea celular de hibridoma descrita en el presente documento y otras moléculas relacionadas con anticuerpos, p. ej., anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, etc. descritos en el presente documento pueden emplearse como herramientas de investigación y en una diversidad de aplicaciones, tales como purificación y métodos de detección/diagnóstico.

A. Métodos de purificación

Los anticuerpos monoclonales y las moléculas relacionadas con anticuerpos descritos en el presente documento pueden usarse como agentes de purificación por afinidad. En esta solicitud, un anticuerpo monoclonal o una molécula relacionada con el anticuerpo se inmoviliza en una fase sólida como la resina de Sephadex o papel de filtro, usando métodos bien conocidos en la técnica. El anticuerpo inmovilizado se pone en contacto con una muestra que contiene pVHL172 humana (o pVHL213 humana o pVHL160 humana o una combinación de los mismos) para purificar, y, posteriormente, el soporte se lava con un primer disolvente adecuado que eliminará sustancialmente todo el material de la muestra, excepto la proteína pVHL172 humana (o pVHL213 humana o pVHL160 humana o una combinación de las mismas), que está unida al anticuerpo inmovilizado. Finalmente, el soporte se lava con otro disolvente adecuado que liberará la proteína pVHL172 humana (o pVHL213 humana o pVHL160 humana o una combinación de las mismas) del anticuerpo. Está dentro de la capacidad de un experto en la técnica seleccionar el primer disolvente adecuado y el segundo disolvente adecuado para lograr el aislamiento/purificación deseado de pVHL172 humana (o pVHL213 humana o pVHL160 humana o una combinación de los mismos) de la muestra de partida. De este modo, se aísla/purifica pVHL172 humana (o pVHL213 humana o pVHL160 humana o una combinación de los mismos) de la muestra.

B. Métodos de detección/diagnóstico

Los anticuerpos monoclonales y las moléculas relacionadas con anticuerpos descritos en el presente documento se pueden usar en ensayos para detectar la presencia de pVHL humana (incluyendo pVHL172 humana) *in vitro* o *in vivo* y/o para cuantificar el nivel de expresión de pVHL humana (incluyendo pVHL172 humana) en tejidos biológicos específicos, líquidos o células.

Los ensayos de detección descritos en el presente documento generalmente comprenden poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo monoclonal anti-pVHL de la invención (o un fragmento biológicamente activo del mismo o un derivado del mismo) durante un tiempo y en condiciones que permitan que se forme un complejo entre el anticuerpo monoclonal anti-pVHL (o fragmento o derivado del mismo) y pVHL humana presente en la muestra biológica; y detectar la presencia o ausencia del complejo formado y/o determinar el nivel del complejo formado.

Muestras biológicas

Los métodos pueden aplicarse al estudio de cualquier tipo de muestras biológicas que permitan analizar la pVHL

humana. Ejemplos de muestras biológicas adecuadas incluyen, pero sin limitación, muestras de sangre (es decir, sangre total, suero o plasma), orina, saliva, líquido sinovial, líquido seminal, líquido linfático, líquido cefalorraquídeo, líquido peritoneal, así como endocervical, muestras uretrales, rectales y vaginales. Las muestras biológicas pueden incluir secciones de tejido (p. ej., muestras de biopsia de riñón), secciones congeladas y muestras de archivo con diagnóstico, tratamiento y/o historial de resultados conocidos. Las muestras biológicas también pueden ser células (o su progenie) o contenido celular aislado de dichos tejidos o líquidos. Las muestras biológicas pueden recogerse por cualquier medio no invasivo (p. ej., aspiración con aguja fina o biopsia) u obtenerse por medios quirúrgicos (p. ej., nefrectomía).

10 Los métodos pueden realizarse en la propia muestra biológica sin, o con un procesamiento limitado de la muestra.

Sin embargo, como alternativa, los métodos pueden realizarse en un extracto de proteína preparado a partir de la muestra biológica. En este caso, el extracto de proteína contiene preferentemente el contenido de proteína total. Los métodos de extracción de proteínas son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, "Protein Methods", D.M. Bollag *et al.*, 2ª Ed., 1996, Wiley-Liss; "Protein Purification Methods: A Practical Approach", E.L. Harris y S. Angal (Eds.), 1989; "Protein Purification Techniques: A Practical Approach", S. Roe, 2ª Ed., 2001, Oxford University Press; "Principles and Reactions of Protein Extraction, Purification, and Characterization", H. Ahmed, 2005, CRC Press: Boca Raton, FL). Se pueden usar diversos kits para extraer proteínas de líquidos corporales y tejidos. Dichos kits están disponibles en el mercado, por ejemplo, de BioRad Laboratories (Hercules, CA), BD Biosciences Clontech (Mountain View, CA), Chemicon International, Inc. (Temecula, CA), Calbiochem (San Diego, CA), Pierce Biotechnology (Rockford, IL) e Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA). Las guías del usuario que describen con gran detalle el protocolo a seguir se incluyen generalmente en todos estos kits. La sensibilidad, el tiempo de procesamiento y los costos pueden ser diferentes de un kit a otro. Un experto en la técnica puede seleccionar fácilmente el (los) kit(s) más adecuado(s) para una situación particular.

25

Detección de complejos anticuerpo-pVHL

Los métodos descritos en el presente documento generalmente implican la detección de al menos un complejo formado entre el anticuerpo monoclonal anti-pVHL (o fragmento o derivado del mismo) añadido a la muestra biológica y pVHL humana (incluyendo pVHL172 humana) presente en la muestra biológica. La detección de dicho complejo puede realizarse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica (véase, por ejemplo, E. Harlow y A. Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual", 1988, Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY).

30 Por ejemplo, la detección de un complejo de anticuerpo-pVHL se puede realizar usando un ensayo inmunológico. Se puede usar un amplio intervalo de técnicas de ensayo inmunológicas, que incluyen ensayos radioinmunológicos, ensayos inmunológicos enzimáticos (EIA), ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima (ELISA) y precipitación inmunológica por inmunofluorescencia. Los ensayos inmunológicos son bien conocidos en la técnica. Los métodos para realizar dichos ensayos, así como las aplicaciones prácticas y los procedimientos, se resumen en los libros de texto. Ejemplos de dichos libros de texto incluyen P. Tijssen, en: Practice and theory of enzyme immunoassays, eds. R.H. Burdon y v. P.H. Knippenberg, Elsevier, Amsterdam (1990), p. 221-278 y diversos volúmenes de Methods in Enzymology, eds. S.P. Colowick *et al.*, Academic Press, que tratan los métodos de detección inmunológica, especialmente los volúmenes 70, 73, 74, 84, 92 y 121. Los ensayos inmunológicos pueden ser competitivos o no competitivos.

45

Por ejemplo, se puede usar cualquiera de una serie de variaciones de la técnica de ensayo en sándwich para realizar un ensayo inmunológico. En resumen, en un ensayo sándwich típico aplicado a la detección de pVHL humana de acuerdo con la presente invención, se inmoviliza un anticuerpo monoclonal anti-pVHL no marcado (o fragmento biológicamente activo del mismo) sobre un sustrato sólido y la muestra a analizar se pone en contacto con el anticuerpo unido durante un tiempo y en condiciones que permiten la formación de un complejo de anticuerpo-pVHL. Después de la incubación, un anticuerpo secundario que está marcado con un resto detectable y que reconoce específicamente los anticuerpos humanos (p. ej., una IgG antihumana) se añade y se incuba en condiciones que permiten la formación de un complejo ternario entre cualquier complejo de anticuerpo-pVHL formado y el anticuerpo secundario marcado. Cualquier material no unido se elimina por lavado y la presencia de cualquier pVHL en la muestra biológica se determina observando la señal directa o indirectamente producida por el resto detectable. Las variaciones en este ensayo incluyen un ensayo en el que tanto la muestra biológica como el anticuerpo secundario marcado se añaden simultáneamente al anticuerpo monoclonal anti-pVHL inmovilizado (o su fragmento biológicamente activo).

60 El anticuerpo secundario puede marcarse con cualquier resto detectable adecuado, es decir, cualquier entidad que, por su naturaleza química, proporcione una señal analítica identificable que permita la detección del complejo ternario y, en consecuencia, la detección del complejo anticuerpo-pVHL.

65 El anticuerpo monoclonal (o fragmento biológicamente activo o derivado del mismo) puede inmovilizarse uniéndose covalentemente o no covalentemente a la superficie de un portador o soporte sólido. El soporte sólido puede ser cualquier soporte sólido conocido en la técnica al que se pueda fijar operativamente el anticuerpo. "Fijado

operativamente" se refiere al anticuerpo que se fija de una manera que permite la formación de un complejo entre el anticuerpo fijado y la pVHL humana presente en la muestra biológica analizada. Ejemplos de portadores o materiales de soporte adecuados incluyen, pero sin limitación, agarosa, celulosa, nitrocelulosa, dextrano, Sefadex, Sefarosa, carboximetilcelulosa, poli(acrilamida)s, poliestireno, cloruro de polivinilo, polipropileno, gabs, resina magnética de intercambio iónico, vidrio, copolímero de poliamina-metil vinil éter-ácido maleico, copolímero de aminoácido, copolímero de etileno-ácido maleico, nailon, seda y similares. La inmovilización de un anticuerpo en la superficie de un portador o soporte sólido puede implicar reticulación, unión covalente o adsorción física, usando métodos bien conocidos en la técnica. Como alternativa, el portador o soporte sólido puede estar en forma de una perla, una partícula, un pocillo de microplaca, una matriz, una cubeta, un tubo, una membrana o cualquier otra forma adecuada para condicionar un ensayo inmunológico. La inmovilización de un anticuerpo (o fragmento biológicamente activo o derivado del mismo) a un portador o soporte sólido incluye electroforesis en gel seguida de transferencia a una membrana (típicamente nitrocelulosa o PVDF) en un proceso llamado transferencia de Western (o inmunotransferencia) bien conocido en la técnica.

La detección del complejo formado puede ser cualitativa o cuantitativa. Los métodos para marcar moléculas biológicas tales como anticuerpos son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, "Affinity Techniques. Enzyme Purification: Part B", *Methods in Enzymol.*, 1974, vol. 34, W.B. Jakoby y M. Wilneck (Eds.), Academic Press: Nueva York, NY; y M. Wilchek y E.A. Bayer, *Anal. Biochem.*, 1988, 171:1-32).

Los restos detectables de uso más común en los ensayos inmunológicos son las enzimas y los fluoróforos. En el caso de un ensayo inmunológico enzimático (EIA), una enzima como la peroxidasa de rábano picante, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, fosfatasa alcalina y similares, se conjuga con el segundo anticuerpo, generalmente mediante glutaraldehído o peryodato. El sustrato a usar con las enzimas específicas se elige generalmente para la producción de un cambio de color detectable, mediante la hidrólisis de la enzima correspondiente. En el caso de la inmunofluorescencia, el segundo anticuerpo está acoplado químicamente a un resto fluorescente sin alteración de su capacidad de unión. Después de la unión del anticuerpo marcado con fluorescencia al complejo anticuerpo-pVHL y la eliminación de cualquier material no unido, se detecta la señal fluorescente generada por el resto fluorescente, y opcionalmente se cuantifica. Como alternativa, el segundo anticuerpo puede marcarse con un radioisótopo, un resto quimioluminiscente o un resto bioluminiscente.

En determinadas realizaciones, la presencia de pVHL humana o una cantidad de la misma en una muestra biológica obtenida de un paciente se puede usar como un indicio de la presencia de una condición dada (p. ej., cáncer de riñón, como CCRc, hemangioblastoma o feocromocitoma u otros tumores asociados) con el síndrome de VHL). En determinados métodos, la cantidad de complejo anticuerpo-pVHL medida en la muestra biológica analizada se compara con la cantidad de complejo anticuerpo-pVHL formado en las mismas condiciones en una muestra biológica obtenida de un sujeto sano (o de una serie de muestras biológicas obtenidas de un número significativo de sujetos sanos).

III- Kits

En otro aspecto, la presente invención proporciona kits que comprenden materiales útiles para llevar a cabo los métodos de separación o los métodos de detección/cuantificación/diagnóstico de la invención. Los métodos descritos en el presente documento pueden realizarse por laboratorios de diagnóstico o análisis, laboratorios de investigación o facultativos. La invención proporciona kits que se pueden usar en estas diferentes configuraciones.

Los materiales y reactivos para detectar o cuantificar pVHL humana (incluyendo pVHL172 humana) en muestras biológicas o para aislar/separar pVHL humana de muestras biológicas de acuerdo con un método de la invención se pueden ensamblar juntos en un kit. Un kit de la invención generalmente comprende un anticuerpo monoclonal anti-pVHL de la invención, o un fragmento biológicamente activo del mismo. La cantidad de anticuerpo monoclonal anti-pVHL, o fragmento biológicamente activo del mismo, en un kit puede variar para permitir la separación, detección y/o cuantificación de pVHL humana en un número dado de muestras biológicas, por ejemplo, una muestra biológica, o más de una muestra biológica, por ejemplo 2, 5, 10, 25, 50, 75, 100 o más muestras biológicas. El anticuerpo monoclonal anti-pVHL, o fragmento biológicamente activo del mismo, puede o no inmovilizarse en una superficie de sustrato (p. ej., perlas, matrices, sorbentes, resinas y similares).

En determinadas realizaciones, un kit de acuerdo con la presente invención comprende además un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente pVHL213 humana y/o un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente pVHL160 humana. Según el conocimiento de los solicitantes, los anticuerpos actualmente disponibles en el mercado reconocen de manera no específica pVHL213 y/o pVHL160. Estos anticuerpos se comercializan, por ejemplo, por Lifespan Biosciences, Thermo Fisher Scientific, Pierce Antibodies, Epitomics Abcam, BD Pharmingen, Sigma, Novus Biological y Origene.

En determinadas realizaciones, un kit de acuerdo con la presente invención comprende además una IgG antihumana, que puede o no marcarse con un resto detectable.

Dependiendo del procedimiento y/o la naturaleza de la muestra biológica, el kit puede comprender además uno o

más de tampón y/o reactivos de extracción, tampón y/o reactivos de fijación, tampón y/o reactivos de lisis, tampón y/o reactivos de separación, disolvente y/o reactivos de elución, tampón y/o reactivos de etiquetado, etc. Los protocolos para el uso de estos tampones y reactivos para realizar diferentes etapas del procedimiento pueden incluirse en el kit.

5 Un kit de la invención puede comprender además, pVHL172 humana pura, pVHL213 humana pura y/o pVHL160 humana pura aisladas como un patrón para establecer una curva estándar.

10 El anticuerpo monoclonal anti-pVHL, o fragmento biológicamente activo del mismo, y todos los demás reactivos pueden suministrarse en forma sólida (p. ej., liofilizada) o líquida. Los kits de la presente invención pueden comprender diferentes recipientes (p. ej., viales, ampollas, tubos de ensayo, matraces o frascos) para cada tampón y/o reactivo individual. Cada componente será generalmente adecuado como alícuotas en su recipiente respectivo o se proporcionará en forma concentrada. También se pueden proporcionar otros recipientes adecuados para realizar determinadas etapas de los métodos divulgados. Los recipientes individuales del kit se mantienen preferentemente en confinamiento cercano para la venta comercial.

15 Un kit puede comprender además instrucciones de uso del kit de acuerdo con un método de la invención. Dichas instrucciones pueden comprender instrucciones para procesar la muestra biológica obtenida y/o para realizar la prueba, instrucciones para interpretar los resultados, así como un aviso en el formulario prescrito por una agencia gubernamental (p. ej., la FDA y/o la Agencia Europea de Medicamentos) que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos.

20 Un identificador, p. ej., un código de barras, radiofrecuencia, etiquetas de ID, etc., puede estar presente en o sobre el empaque del kit. El identificador se puede usar, por ejemplo, para identificar de forma particular el kit con fines de control de calidad, control de inventario, seguimiento del movimiento entre estaciones de trabajo, etc.

Ejemplos

30 Los siguientes ejemplos describen algunos de los modos preferentes para hacer y practicar la presente invención. Sin embargo, debe entenderse que los ejemplos son solo para fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención. Además, a menos que la descripción en un ejemplo se presente en tiempo pasado, el texto, como el resto de la memoria descriptiva, no pretende sugerir que los experimentos se realizaron realmente o que los datos se obtienen realmente.

35 Materiales y métodos

Análisis PCR en tiempo real. La PCR en tiempo real se realizó en el ARN total extraído de muestras de tumores usando el kit de ARN total Qiagen Qiamap, de la siguiente manera: 5 microgramos de ARN total se transcribieron de forma inversa usando cebadores oligo-dT y transcriptasa inversa M-MLV. Los ADNc resultantes se usaron luego como moldes para las posteriores amplificaciones por PCR de Aurora-A y GAPDH usadas como controles internos. Los cebadores diseñados a partir de secuencias de ADNc humano fueron: 5'-CCCGTATGGCTCAACTTCG-3' (SEQ ID NO:6) (directa) y 5'-TCAGGTCGCTCTACGAAGATCT-3' (inversa) (SEQ ID NO:7) para la variante 1 de VHL (308 pb), 5' CCCGTATGGCTCAACTTCG-3' (directa) (SEQ ID NO:8) y 5'-TCAGGTCGCTCTACGAAGATCT-3' (inversa) (SEQ ID NO:9) para la variante 2 de VHL (185 pb). Los ensayos se realizaron por triplicado, usando el instrumento RotorGene 3000 (Corbett Research, Biolabo, Archamps, Francia) con la mezcla maestra SYBR Green I (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Para evitar la formación de artefactos de dímero de cebador, se controló la fluorescencia a una temperatura por encima del punto de fusión del dímero de cebador pero por debajo del punto de fusión del producto de PCR específico. Para cada muestra, las cantidades relativas de transcripciones VHL y GAPDH se calcularon a partir de estas curvas estándar usando el software RotorGene.

50 **Purificación de proteínas.** Todas las proteínas recombinantes se prepararon a partir de la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS inducida para sobreexpresar las proteínas VHL213(His)₆, VHL172(His)₆ y VHL160 (His)₆. Las bacterias se lisaron en el tampón IMAC 5 (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5; NaCl 500 mM; glicerina al 10 % e imidazol 5 mM) con 1 mg/ml de lisozima y PMSF 1 mM durante 1 hora a 4 °C. Los lisados de bacterias se centrifugaron luego durante 30 minutos a 12.000 g a 4 °C (rotor JA-20, Beckman) y se filtraron los sobrenadantes. Las proteínas se purificaron luego mediante cromatografía de afinidad Ni-NTA-agarosa siguiendo las instrucciones del fabricante (Qiagen SA). Las perlas se lavaron dos veces con 10 volúmenes de IMAC 5 y luego se incubaron en BSA al 5 % en IMAC 5 durante 1 hora a 4 °C. Los sobrenadantes se incubaron con las perlas durante 3 horas a 4 °C y las perlas se lavaron dos veces con 10 volúmenes de IMAC 5 y tres veces con 10 volúmenes de IMAC20 (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5; NaCl 500 mM; glicerol al 10 %; imidazol 20 mM). Las proteínas marcadas con His se eluyeron con IMAC 250 (IMAC-imidazol 250 mM). Las fracciones eluidas se controlaron en concentración mediante análisis de Bradford y la pureza por electroforesis en un gel SDS al 12,5 % (Bradford, Anal. Biochem., 1976, 72:248-254).

65 **Anticuerpos.** Los anticuerpos policlonales contra VHL se obtuvieron en el laboratorio (Martin *et al.*, PLOs One, 2013, 8 (6) e67071), el anticuerpo de actina se adquirió en Sigma (EE. UU.). El anticuerpo monoclonal contra VHL se produjo en el laboratorio de los solicitantes (CNRS-EFS). El anticuerpo comercial contra VHL era de Santa Cruz.

Los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante eran de Jackson Immuno-Research Laboratories (Baltimore, MD).

5 **Técnica ELISA.** Cincuenta microlitros de VHL213, VHL172 o proteína irrelevante (2 µg/ml) se diluyeron en tampón de carbonato (50 mM, pH 9,6) y se recubrieron en una placa ELISA de 96 pocillos (Medisorp, Nunc). Las placas se incubaron a 2-8 °C durante una noche. Después de lavar tres veces con PBST (10 mM de tampón fosfato pH 7,2, Tween-20 al 0,05 %) se realizó el bloqueo de sitios de unión no específicos con PBST-albúmina de suero bovino al 5 %.

10 Después de la incubación de 1 hora a 2 horas a temperatura ambiente, las placas se voltearon y luego se añadieron 50 µl de sobrenadante de células de hibridoma a cada pocillo. La placa se incubó adicionalmente durante 1 a 3 horas a 37 °C y se lavó 3 veces con PBST. Se añadieron cincuenta microlitros de una IgG anti-ratón de cabra conjugada con peroxidasa de rábano picante (Sigma) diluida 1/5000 en PBS-BSA al 0,1 %-Tween20 al 0,01 % y la placa se incubó adicionalmente durante 1 hora a 37 °C. La revelación se realizó después de 3 lavados y la adición de 50 µl de solución de sustrato por pocillo (1 mg/ml) de ABTS en tampón de citrato de fosfato 0,05 M, pH 5,0. La absorbancia se midió a 405 nm después de 10 a 30 minutos de incubación usando un lector de absorbancia de microplaca fotométrica Thermo Scientific Multiskan EX con el software Ascent v2.6 (Thermo LabSystems).

15

Análisis de transferencia Western. Los tejidos congelados con extracto de proteína se suspendieron en tampón RIPA (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, NP-40 al 1 %, desoxicolato de sodio al 0,5 %, cloruro de sodio 150 mM, EDTA 1 mM, fluoruro de sodio 1 mM, AEBSF 1 mM, 10 µg/ml de aprotinina, 10 µg/ml de leupeptina, orovanadato de sodio 1 mM) y se centrifugaron a 9000 g durante 10 minutos. Se realizaron ensayos de Bradford para determinar las concentraciones de proteína en los sobrenadantes. Cincuenta µg de proteínas totales de cada extracto se sometieron a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 15 % y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Las membranas lavadas con TBST se saturaron con leche baja en grasa al 5 % en TBST durante 2 horas a temperatura ambiente, luego se incubaron con anticuerpos primarios en leche baja en grasa al 2,5 % en TBST a 4 °C durante una noche, seguido de una incubación con anticuerpos IgG anti-conejo o anti-ratón conjugados con peroxidasa de rábano picante (1:15.000 en TBST-BSA al 2,5 % durante 1 hora a temperatura ambiente). Las cargas de las muestras en las diferentes transferencias de Western se controlaron con anticuerpos policlonales de antiactina (1:500). Las transferencias Western se pusieron de manifiesto mediante quimioluminiscencia usando el kit Super Signal (Pierce, Rockford, IL).

20

25

30

Muestras de tejido. Se obtuvieron muestras de tejido tumoral y tejido normal equivalente de pacientes con CCRcc que se sometieron a una nefrectomía parcial o total de 2002 a 2005. El Comité de ética humana de la escuela de medicina y el hospital de la universidad de Rennes aprobó este estudio prospectivo y todos los pacientes firmaron los consentimientos informados. Tras la recolección, las muestras de tejido se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C en el Centre de Ressources Biologiques (CRB, Rennes, Francia) y se fijaron con formalina y se incrustaron en parafina. Con el fin de determinar las mutaciones del gen VHL en las muestras recolectadas, se llevó a cabo una cromatografía líquida desnaturalizante de alto rendimiento (DHPLC) en un sistema de análisis de fragmentos de ácido nucleico WAVE (Transgenomic, Glasgow, R.U.) con una columna DNasep (Patard *et al.*, Eur. Urol., 2009, 56(5): 794-795). Los máximos aberrantes se analizaron adicionalmente mediante secuenciación directa usando procedimientos convencionales. Todas las mutaciones fueron confirmadas en una segunda PCR y reacción de secuenciación. La amplificación de sonda dependiente de la ligación multiplex (MLPA), como se describió anteriormente (Patard, 2009), permitió el análisis de supresión de VHL.

35

40

Cultivo celular. Las células humanas (Hela, 786-0, RCC4) se mantuvieron en medio DMEN suplementado con suero fetal bovino al 10 % y antibióticos y se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada con 5 % de CO₂. Las dos líneas celulares primarias (R-180 y R-305) se cultivaron en RPMI-1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado con suero de ternera fetal al 10 % (Sigma-Aldrich, EE.UU.), penicilina al 1 %/estreptomycin (Sigma-Aldrich, EE.UU.) y 10 mM de tampón HEPES 1M. Las células HeLa se transfectaron usando JetPRIME™ según lo recomendado por el fabricante (PolyPlus, Ozyme). Para sobreexpresar VHL y células, los solicitantes usaron respectivamente los vectores pCMV-VHL213 y pCMV-VHL172 y pCMV-VHL160 producidos en el laboratorio de los solicitantes.

45

50

Inmunohistoquímica. Se transfirieron secciones de cinco µm de tejidos incrustados en parafina fijados con formalina a portaobjetos de vidrio antes del análisis inmunohistoquímico. Las muestras se incubaron en TBST en presencia de BSA al 5 %. La reactividad contra los anticuerpos y VHL (JD-1956, dilución 1:100) se puso de manifiesto con el sistema de detección de biotina-estreptavidina (Dako, Glostrup, Dinamarca) usando diaminobenzidina como cromógeno (Sigma-Aldrich, Francia). Los análisis se realizaron usando un microscopio Leica™ DMRXA equipado con una cámara CoolSnapHQ (Photometrics™).

55

El software Leica (Confocal Software 3D) se usó para el pilotaje de microscopios y la adquisición de imágenes antes del análisis de imágenes por parte de ImageJ (Instituto Nacional de la Salud).

60

Preparación de anticuerpos. Se inmunizaron seis ratones con la proteína recombinante VHL172(His)₆. Después de tres meses, se recogió sangre para cada ratón y se probó la capacidad inmunorreactiva de las diferentes muestras de sangre. El ratón n.º 28 fue sacrificado y los esplenocitos fueron recolectados. La fusión celular se llevó a cabo con células inmortalizadas. Se realizó una primera selección de células fusionadas usando una prueba ELISA. La prueba se realizó con la proteína recombinante VHL213(His)₆, VHL172(His)₆ y Aurora-(His)₆ con el fin de discriminar las

65

células que producen anticuerpos contra la etiqueta de histidina. Entre las células analizadas, se seleccionaron y analizaron treinta muestras más.

Los 30 clones fueron analizados mediante análisis de transferencia puntual. Veinte µg de cada proteína recombinante, VHL213(His)₆, VHL172(His)₆ y Aurora-A, se cargaron en un gel de poliacrilamida y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Se realizaron transferencias Western con cada clon. Entre los clones probados, los solicitantes observaron 25 clones, que eran inmunorreactivos contra las proteínas VHL. A continuación, los clones positivos se analizaron para determinar su inmunorreactividad en extractos de proteínas de células que expresan proteínas VHL exógenas.

Resultados

Identificación de las dos variantes de VHL en diferentes líneas celulares. El gen *vhl* codificó dos variantes de ARNm, variante 1 (V1) compuesta por los tres exones, 1, 2 y 3, y variante 2 (V2) compuesta por los exones 1 y 3. Se realizó una PCR en tiempo real sobre el ARN total extraído de diferentes líneas celulares humanas, con el fin de detectar la presencia de las dos variantes en estas líneas celulares (véase los resultados presentados en la Figura 2). Como se observa en la Figura 2, se detectaron dos bandas en el tamaño molecular de 308 pb para la variante 1 y 185 pb para la variante 2 en todas las células analizadas. Sin embargo, la proporción de las dos variantes varió de una línea celular a otra (V2/V1). La forma más grande se detecta ampliamente en las células Hela y las células renales R305 en comparación con la forma más pequeña (V2). Curiosamente, las células endoteliales (HUVEC) y las células de cáncer de mama (MCF7) mostraron bandas correspondientes a la variante 1 y la variante 2, pero la relación V2/V1 aumentó en estas células.

Inmunodetección de las tres proteínas VHL. Como la mayoría de los anticuerpos que se han desarrollado hasta ahora para reconocer las proteínas VHL son poco específicos e ineficientes para reconocer las proteínas endógenas, en particular pVHL172, los solicitantes diseñaron y desarrollaron un nuevo anticuerpo monoclonal contra VHL humana. Los solicitantes electroforizaron y electrotransfirieron las tres proteínas recombinantes pVHL213, pVHL172 y pVHL160 que estaban marcadas con His y T7. La cantidad de proteínas cargadas se controló mediante tinción con plata (Figura 3A). El anticuerpo anti-T7 puso de manifiesto la presencia de las tres proteínas. La membrana se sometió luego a inmunotransferencia con los diferentes anticuerpos contra VHL (Figura 3B: panel izquierdo: el anticuerpo policlonal VHL-6030, panel central el anticuerpo comercial (Sc), panel derecho el anticuerpo monoclonal VHL-1956). Todos los anticuerpos fueron capaces de inmuno-detectar la forma más alta de pVHL (VHL213). Las dos formas VHL172 y VHL160 fueron inmunológicamente puestas de manifiesto diferencialmente por los anticuerpos probados. Los anticuerpos VHL-6030 y VHL-1956 detectaron principalmente la pVHL172 mientras que el anticuerpo comercial no presentó una señal detectable en la reacción inmunológica. De una manera muy interesante, el anticuerpo VHL-1956 reconoció eficientemente las tres proteínas (Figura 3B) sin bandas no específicas según lo observado con el anticuerpo comercial.

La siguiente pregunta fue determinar si las proteínas expresadas en células fueron detectadas por el anticuerpo VHL-1956. Las células Hela se transfectaron con plásmidos que expresaban las diferentes formas de pVHL (Figura 3C). Las construcciones se marcaron con un Flag, como se muestra en esa figura, las tres proteínas se expresaron e inmunodetectaron en células Hela (Figura 3C, panel izquierdo). Los mismos extractos fueron inmunotransferidos con los anticuerpos contra VHL (véase: materiales y métodos). Los tres anticuerpos contra VHL detectaron las proteínas pVHL213 y pVHL172. Por el contrario, la pVHL160 solo se detectó usando el anticuerpo comercial (Sc) y el anticuerpo monoclonal VHL (VHL-1956). Sin embargo, debe notarse que no se observaron bandas no específicas en la membrana inmunotransferida con el anticuerpo VHL-1956, mientras que se observaron bandas no específicas en la inmunotransferencia realizada con el anticuerpo comercial (Figura 3C, panel derecho).

El reconocimiento de la proteína pVHL recombinante y las proteínas expresadas en las células llevó a los solicitantes a investigar la capacidad del anticuerpo VHL-1956 para reconocer las proteínas expresadas endógenas. Seleccionaron diferentes líneas celulares (Hela y células renales) y realizaron la transferencia Western con los tres anticuerpos VHL (Figura 4). La cantidad de proteínas cargadas en el gel se controló mediante detección de tubulina. La transferencia Western realizada con el anticuerpo comercial puso de manifiesto fuertemente solo un tamaño molecular de 23 kDa en todas las líneas celulares (Figura 4, panel superior). Se detectaron dos bandas más pequeñas en las células R-305 y RCC4+ que no se ajustaron al peso molecular teórico de una de las formas más bajas de proteínas pVHL (Figura 4, panel superior). Los dos anticuerpos VHL-6030 y VHL-1956 reconocieron bandas que migraron en el peso molecular estimado de las proteínas pVHL. Entre estos dos anticuerpos, el anticuerpo VHL-6030 detectó muy ligeramente las bandas (pVHL213*, pVHL172** y pVHL160***), en la mayoría de los extractos celulares, la proteína pVHL172 no fue detectada por el anticuerpo VHL-6030 (Figura 4, panel central). Por el contrario, el anticuerpo VHL-1956 detectó fuertemente las tres bandas (pVHL213*, pVHL172** y pVHL160***) en extractos celulares como Hela, RCC4+ y HEK-293T. Como era de esperar, no se detectaron bandas en las células 786-0 para las que se observa un codón de parada al comienzo de la secuencia del ARNm (Figura 4, panel inferior).

Todos los resultados contribuyen a la alta capacidad del anticuerpo VHL-1956 para reconocer las proteínas recombinantes, diferentes formas de pVHL expresadas *in vivo* y también las proteínas endógenas.

Caracterización de la especificidad del anticuerpo. Como el anticuerpo VHL-1956 distinguió las proteínas nativas y no nativas, los solicitantes se preguntaron si estas bandas detectadas con el anticuerpo correspondían estrictamente a las proteínas VHL. Los solicitantes realizaron un conjunto de diferentes experimentos para mejorar la especificidad de este anticuerpo. En un primer experimento, los solicitantes incubaron previamente el anticuerpo con un exceso de proteína recombinante pVHL213 (His) 6. A continuación realizaron una transferencia Western con extractos de células Hela (Figura 5A). Observaron que el anticuerpo preincubado ya no era capaz de detectar la proteína endógena (calle izquierda) en comparación con el extracto de células Hela tratado con el anticuerpo no bloqueado.

En una segunda ronda de experimentos, los solicitantes se han dirigido al ARNm que codifica las proteínas VHL mediante una estrategia de ARNsi. Diseñaron dos ARNsi diferentes que se dirigían a las tres proteínas pVHL (ARNsi VHL-213) o solo a la proteína pVHL172 (ARNsiVHL-172-variante 2). La Figura 5B muestra la transferencia de Western realizada en extractos de células Hela que se transfectaron con los dos ARNsi distintos. Las tres bandas inmunorreactivas se detectaron en las células Hela (Figura 5B, calle izquierda). A medida que el ARNsiVHL se transfirió en células Hela, las señales correspondientes a las tres bandas disminuyeron fuertemente (Figura 5B, calle derecha). La transfección de las células Hela con el ARNsiVHL-172 indujo una disminución específica de la banda correspondiente a la pVHL172 cuando el extracto celular (*) se analizó mediante transferencia de Western. Se realizó otro tipo de experimento para confirmar el reconocimiento específico del anticuerpo (Figura 5 C). Se realizó un ensayo de ARNsi con una cantidad creciente de ARNsiVHL-172 que enfatizó la desaparición de la banda inmune detectada correspondiente a la pVHL172. Como se muestra en la figura, el cifrado de ARNsi no tiene ningún efecto sobre la detección de las tres bandas inmunorreactivas.

Identificación de la proteína VHL en extractos de tejidos tumorales. Los resultados anteriores confirmaron que el anticuerpo reconocía las tres formas de pVHL, ya sea exógenas o endógenas en las células. El anticuerpo permitió la detección de las tres proteínas pVHL en las células. Los solicitantes finalmente probaron el anticuerpo en extractos de tejido tumoral con el fin de examinar la supuesta expresión de las proteínas en un paciente. Los tejidos tumorales se seleccionaron de una biblioteca de CRB-riñón y se trataron con el fin de realizar reacciones de transferencia Western (Figura 6). El análisis se realizó en paralelo con un extracto de células Hela. Las inmunotransferencias pusieron de manifiesto bandas, que migraron en peso molecular, cerradas a las proteínas detectadas en las células Hela. Aunque la señal no era tan fuerte como en un extracto celular, los solicitantes observaron que las señales correspondientes a las diferentes bandas pVHL213*, pVHL172** y pVHL160*** eran detectables en los tejidos. La cantidad de cada una de las proteínas varía de un paciente a otro, lo que puede sugerir una relación entre las diferentes isoformas pVHL y la enfermedad. Por ejemplo, los solicitantes observaron una relación equivalente entre las tres formas (*, **, ***) en el extracto tumoral del paciente 9, mientras que esta relación se estaba equilibrando a favor de la forma más baja para el paciente 3.

Identificación del sitio antigénico. Las inmunotransferencias se realizaron usando el anticuerpo VHL-1956 en una membrana de mapa peptídico, que llevaba péptidos de 20-meros que recuperaron la totalidad de las secuencias de VHL. La mancha de transferencia puso de manifiesto puntos inmunorreactivos en el péptido -5, -10 y -15, calle 3. A continuación se determinaron los aminoácidos antigénicos y los solicitantes identificaron la secuencia "AGPR" como la secuencia del inmunógeno. Además, el isotipo del anticuerpo era IgG2b-k.

Inmunotinción de líneas celulares y de tejidos biológicos. La inmunotinción de diferentes líneas celulares (786-0 pVHL213, panel (b) y 786-0 pVHL172 (c) de la Figura 7) puso de manifiesto un marcado positivo de las células que expresan las diferentes formas de pVHL mientras que no se detectó ningún marcado en la línea celular 786-0 (panel (a) de la Figura 7). El marcado también se observó en tejido renal humano (panel (d) de la Figura 7)

Otras realizaciones

Otras realizaciones de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de una consideración de la memoria descriptiva o práctica de la invención divulgada en el presente documento. Se pretende que la memoria descriptiva y los ejemplos se consideren solo de manera ejemplar, estando indicado el alcance real de la invención en las siguientes reivindicaciones.

55 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad de Rennes ARLLOT-BONNEMAINS, Yannick

<120> Anticuerpos monoclonales anti-pVHL y usos de los mismos

<130> BEP130403EP

<160> 9

<170> PatentIn versión 3.5

ES 2 694 296 T3

<210> 1
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 1

Met Pro Arg Arg Ala Glu Asn Trp Asp Glu Ala Glu Val Gly Ala Glu
 1 5 10 15

Glu Ala Gly Val Glu Glu Tyr Gly Pro Glu Glu Asp Gly Gly Glu Glu
 20 25 30

Ser Gly Ala Glu Glu Ser Gly Pro Glu Glu Ser Gly Pro Glu Glu Leu
 35 40 45

Gly Ala Glu Glu Glu Met Glu Ala Gly Arg Pro Arg Pro Val Leu Arg
 50 55 60

Ser Val Asn Ser Arg Glu Pro Ser Gln Val Ile Phe Cys Asn Arg Ser
 65 70 75 80

Pro Arg Val Val Leu Pro Val Trp Leu Asn Phe Asp Gly Glu Pro Gln
 85 90 95

Pro Tyr Pro Thr Leu Pro Pro Gly Thr Gly Arg Arg Ile His Ser Tyr
 100 105 110

Arg Gly His Leu Trp Leu Phe Arg Asp Ala Gly Thr His Asp Gly Leu
 115 120 125

Leu Val Asn Gln Thr Glu Leu Phe Val Pro Ser Leu Asn Val Asp Gly
 130 135 140

Gln Pro Ile Phe Ala Asn Ile Thr Leu Pro Val Tyr Thr Leu Lys Glu
 145 150 155 160

Arg Cys Leu Gln Val Val Arg Ser Leu Val Lys Pro Glu Asn Tyr Arg
 165 170 175

Arg Leu Asp Ile Val Arg Ser Leu Tyr Glu Asp Leu Glu Asp His Pro
 180 185 190

Asn Val Gln Lys Asp Leu Glu Arg Leu Thr Gln Glu Arg Ile Ala His
 195 200 205

Gln Arg Met Gly Asp
 210

ES 2 694 296 T3

<210> 2
 <211> 160
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 2

Met	Glu	Ala	Gly	Arg	Pro	Arg	Pro	Val	Leu	Arg	Ser	Val	Asn	Ser	Arg
1				5					10					15	
Glu	Pro	Ser	Gln	Val	Ile	Phe	Cys	Asn	Arg	Ser	Pro	Arg	Val	Val	Leu
			20					25					30		
Pro	Val	Trp	Leu	Asn	Phe	Asp	Gly	Glu	Pro	Gln	Pro	Tyr	Pro	Thr	Leu
		35					40					45			
Pro	Pro	Gly	Thr	Gly	Arg	Arg	Ile	His	Ser	Tyr	Arg	Gly	His	Leu	Trp
	50					55					60				
Leu	Phe	Arg	Asp	Ala	Gly	Thr	His	Asp	Gly	Leu	Leu	Val	Asn	Gln	Thr
65					70					75					80
Glu	Leu	Phe	Val	Pro	Ser	Leu	Asn	Val	Asp	Gly	Gln	Pro	Ile	Phe	Ala
				85					90					95	
Asn	Ile	Thr	Leu	Pro	Val	Tyr	Thr	Leu	Lys	Glu	Arg	Cys	Leu	Gln	Val
			100					105					110		
Val	Arg	Ser	Leu	Val	Lys	Pro	Glu	Asn	Tyr	Arg	Arg	Leu	Asp	Ile	Val
		115					120					125			
Arg	Ser	Leu	Tyr	Glu	Asp	Leu	Glu	Asp	His	Pro	Asn	Val	Gln	Lys	Asp
	130					135					140				
Leu	Glu	Arg	Leu	Thr	Gln	Glu	Arg	Ile	Ala	His	Gln	Arg	Met	Gly	Asp
145					150					155					160

10 <210> 3
 <211> 172
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 3

ES 2 694 296 T3

Met Pro Arg Arg Ala Glu Asn Trp Asp Glu Ala Glu Val Gly Ala Glu
 1 5 10 15

Glu Ala Gly Val Glu Glu Tyr Gly Pro Glu Glu Asp Gly Gly Glu Glu
 20 25 30

Ser Gly Ala Glu Glu Ser Gly Pro Glu Glu Ser Gly Pro Glu Glu Leu
 35 40 45

Gly Ala Glu Glu Glu Met Glu Ala Gly Arg Pro Arg Pro Val Leu Arg
 50 55 60

Ser Val Asn Ser Arg Glu Pro Ser Gln Val Ile Phe Cys Asn Arg Ser
 65 70 75 80

Pro Arg Val Val Leu Pro Val Trp Leu Asn Phe Asp Gly Glu Pro Gln
 85 90 95

Pro Tyr Pro Thr Leu Pro Pro Gly Thr Gly Arg Arg Ile His Ser Tyr
 100 105 110

Arg Val Tyr Thr Leu Lys Glu Arg Cys Leu Gln Val Val Arg Ser Leu
 115 120 125

Val Lys Pro Glu Asn Tyr Arg Arg Leu Asp Ile Val Arg Ser Leu Tyr
 130 135 140

Glu Asp Leu Glu Asp His Pro Asn Val Gln Lys Asp Leu Glu Arg Leu
 145 150 155 160

Thr Gln Glu Arg Ile Ala His Gln Arg Met Gly Asp
 165 170

5 <210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

10 Glu Ala Gly Arg Pro Arg Pro Val Leu
 1 5

15 <210> 5
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 5

ES 2 694 296 T3

Ala Gly Arg Pro Arg
1 5

5 <210> 6
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador directo para la variante 1 de VHL

<400> 6
cccgtatggc tcaactcg 19

15 <210> 7
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Cebador inverso para la variante 1 de VHL

<400> 7
tcaggtcgct ctacgaagat ct 22

25 <210> 8
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Cebador directo para la variante 2 de VHL

35 <400> 8
cccgtatggc tcaactcg 19

40 <210> 9
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador inverso para la variante 2 de VHL

45 <400> 9
tcaggtcgct ctacgaagat ct 22

REIVINDICACIONES

1. Una línea celular de hibridoma depositada en el CNCM el 18 de abril de 2014 con el número de acceso CNCM 1-4857.
2. Un anticuerpo monoclonal secretado por la línea celular de hibridoma de acuerdo con la reivindicación 1, o un fragmento biológicamente activo del mismo, que reconoce específicamente pVHL172, pVHL213 y pVHL160, las tres isoformas de pVHL humana.
3. El anticuerpo monoclonal, o fragmento biológicamente activo del mismo, de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el anticuerpo monoclonal, o fragmento biológicamente activo del mismo, reconoce específicamente una región de pVHL172 humana en el interdominio entre el dominio ácido y el dominio β de pVHL172 humana, en el que dicha región de pVHL172 humana comprende, o consiste en, la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:4 (EAGRPRPVL), o comprende, o consiste en, la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:5 (AGRPR).
4. El anticuerpo monoclonal, o fragmento biológicamente activo del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-3, en el que el anticuerpo monoclonal está humanizado, desimmunizado o quimérico.
5. El anticuerpo monoclonal, o fragmento biológicamente activo del mismo de acuerdo con la reivindicación 4, en el que el anticuerpo monoclonal humanizado, desimmunizado o quimérico comprende las seis regiones determinantes complementarias (CDR) del anticuerpo monoclonal secretado de acuerdo con la reivindicación 2.
6. Un conjugado que comprende un anticuerpo monoclonal, o fragmento biológicamente activo del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-5, en el que el anticuerpo monoclonal, o fragmento biológicamente activo del mismo, está unido a un resto detectable.
7. Un kit para detectar la presencia de pVHL humana en una muestra biológica o para cuantificar el nivel de expresión de pVHL humana en una muestra biológica o para aislar pVHL humana de una muestra biológica, que comprende un anticuerpo monoclonal, o un fragmento biológicamente activo del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-5, o un conjugado de acuerdo con la reivindicación 6.
8. El kit de acuerdo con la reivindicación 7 que comprende además un anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente pVHL213 y/o pVHL160 humana, en el que el anticuerpo monoclonal que reconoce específicamente pVHL213 y/o pVHL160 humana está unido opcionalmente a un resto detectable.
9. El kit de acuerdo con la reivindicación 7 o la reivindicación 8 que comprende además una IgG anti-humana unida opcionalmente a un resto detectable.
10. El kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que el anticuerpo monoclonal, fragmento biológicamente activo del mismo o conjugado se inmovilizan en un soporte sólido.
11. Un método para detectar la presencia de pVHL humana en una muestra biológica o para cuantificar el nivel de expresión de pVHL humana en una muestra biológica o para aislar pVHL humana de una muestra biológica, comprendiendo el método una etapa de poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo monoclonal, o un fragmento biológicamente activo del mismo, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2-5, o con un conjugado de acuerdo con la reivindicación 6.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que la etapa de poner en contacto la muestra biológica se realiza durante un tiempo y en condiciones que permiten que se forme un complejo entre la pVHL humana presente en la muestra biológica y el anticuerpo monoclonal, o fragmento biológicamente activo del mismo, o el conjugado.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, que comprende además una etapa de detección del complejo formado o una etapa de cuantificación del complejo formado.
14. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en el que el anticuerpo monoclonal, o fragmento biológicamente activo del mismo, está unido a un soporte sólido y el método comprende además una etapa de liberación de la proteína pVHL del complejo.
15. El kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7-10, o el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11-14, en el que la pVHL humana es pVHL172 humana, pVHL213 humana pVHL160 o cualquier combinación de los mismos.

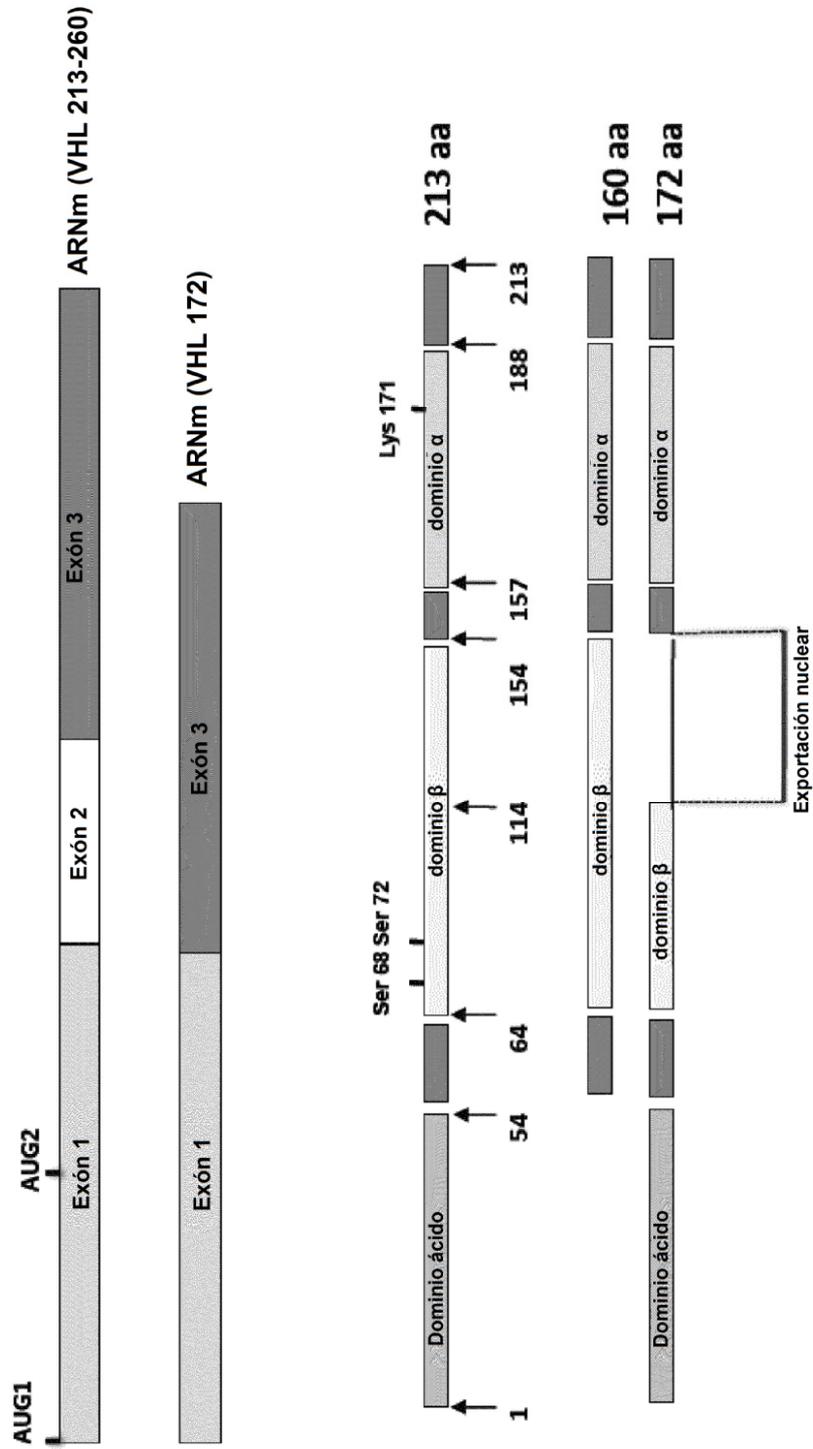


Figura 1

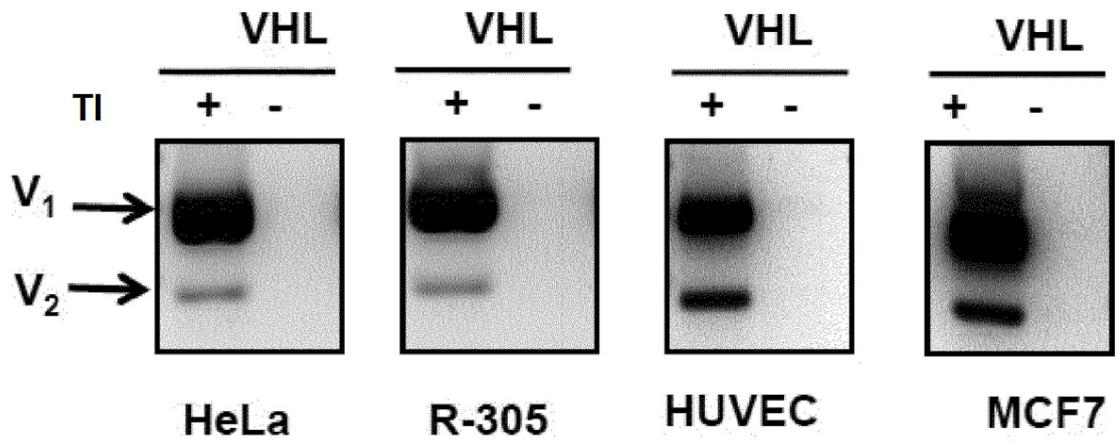


Figura 2

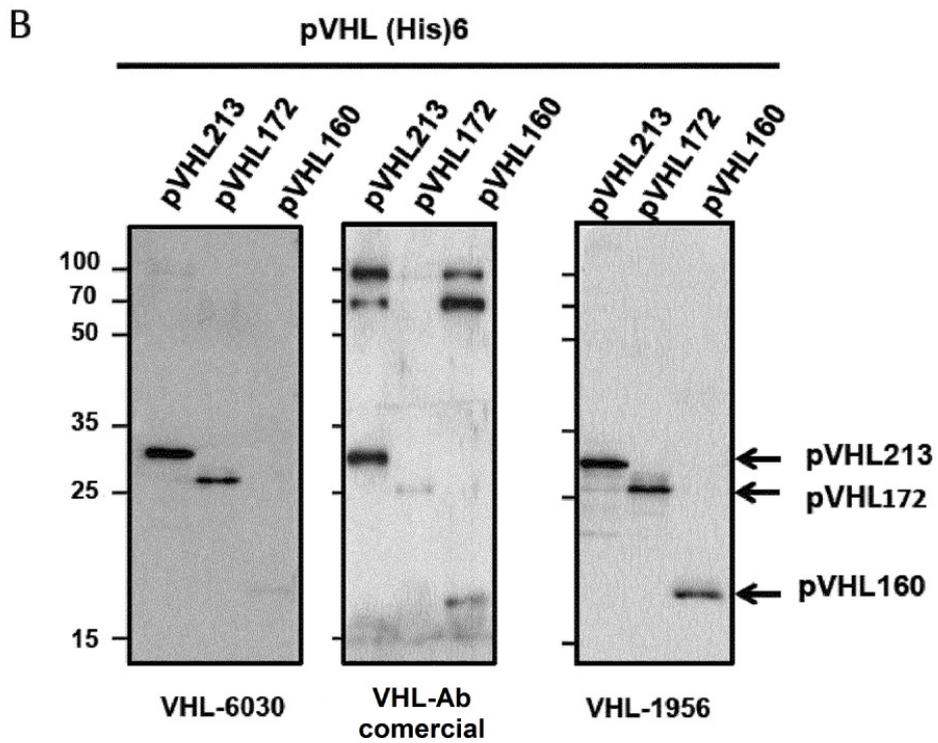
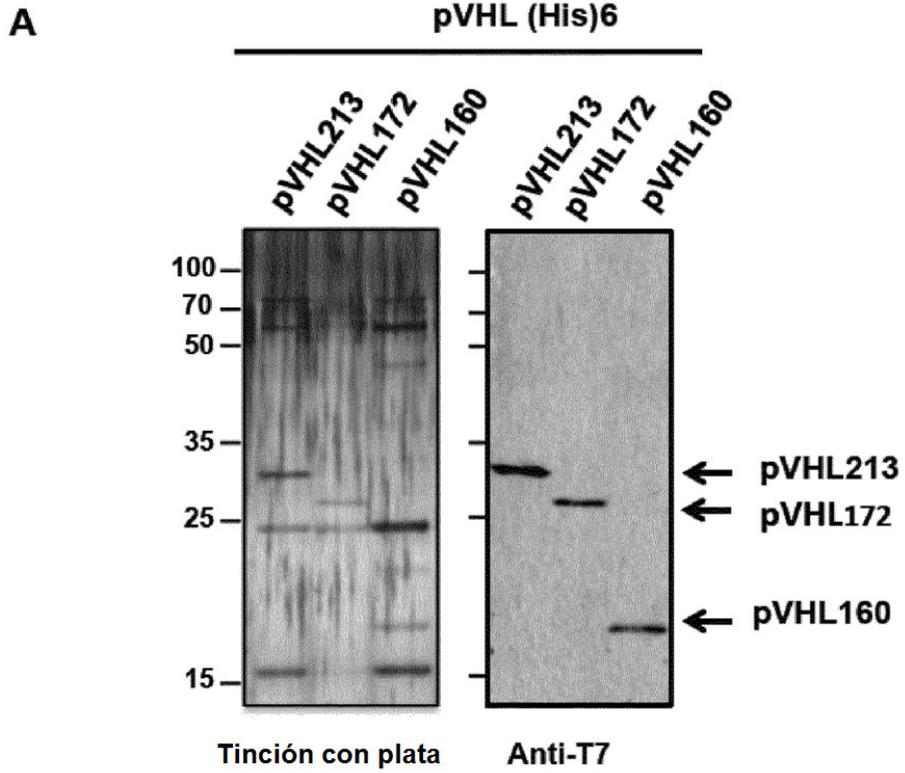


Figura 3(A-B)

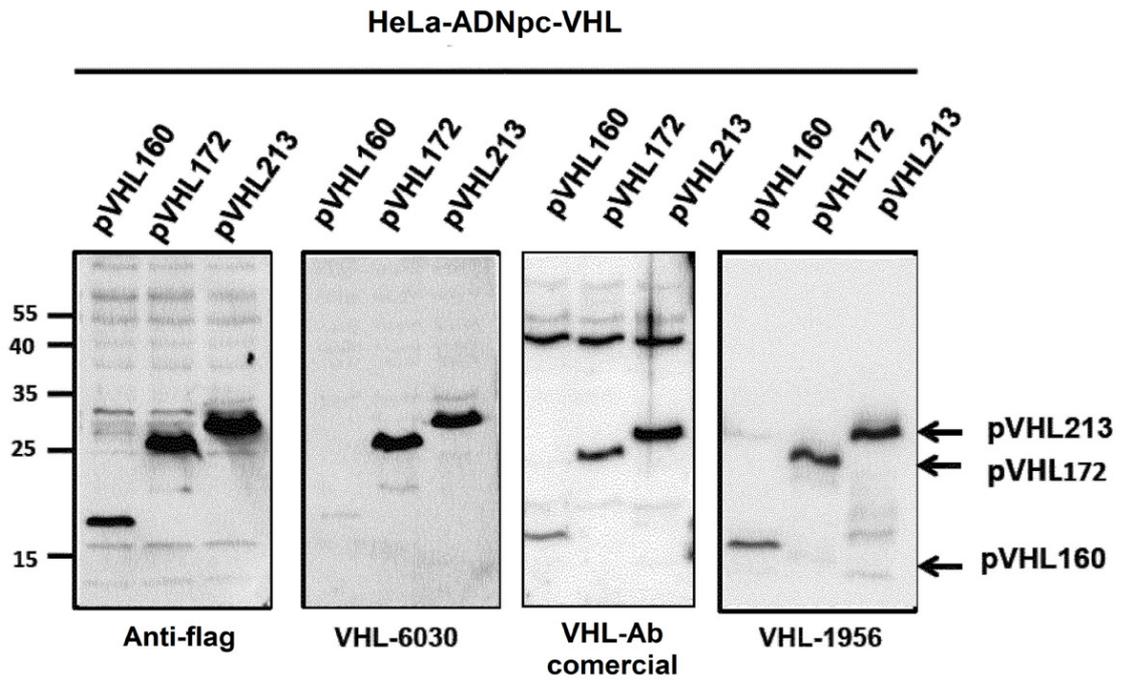


Figura 3(C)

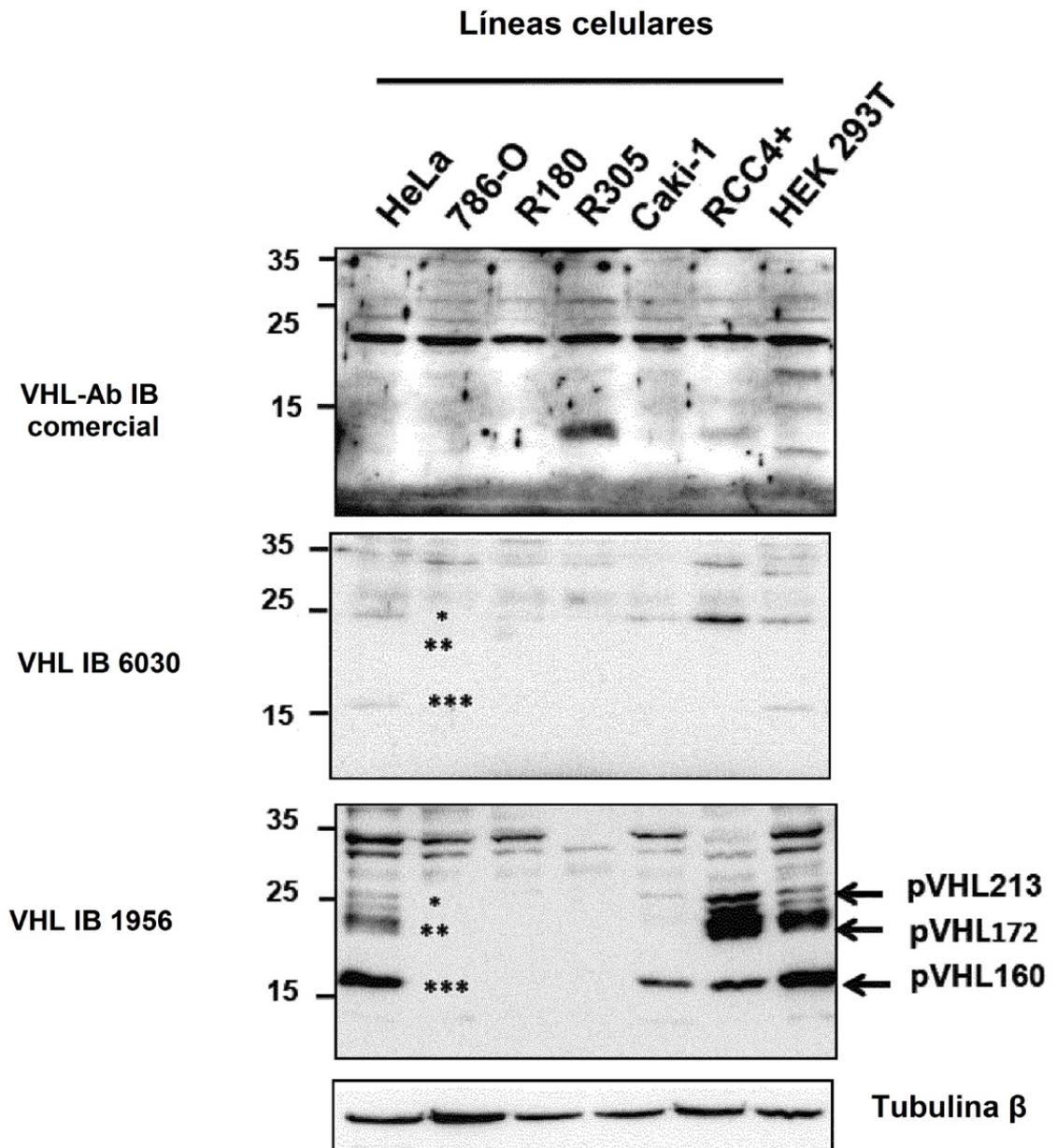


Figura 4

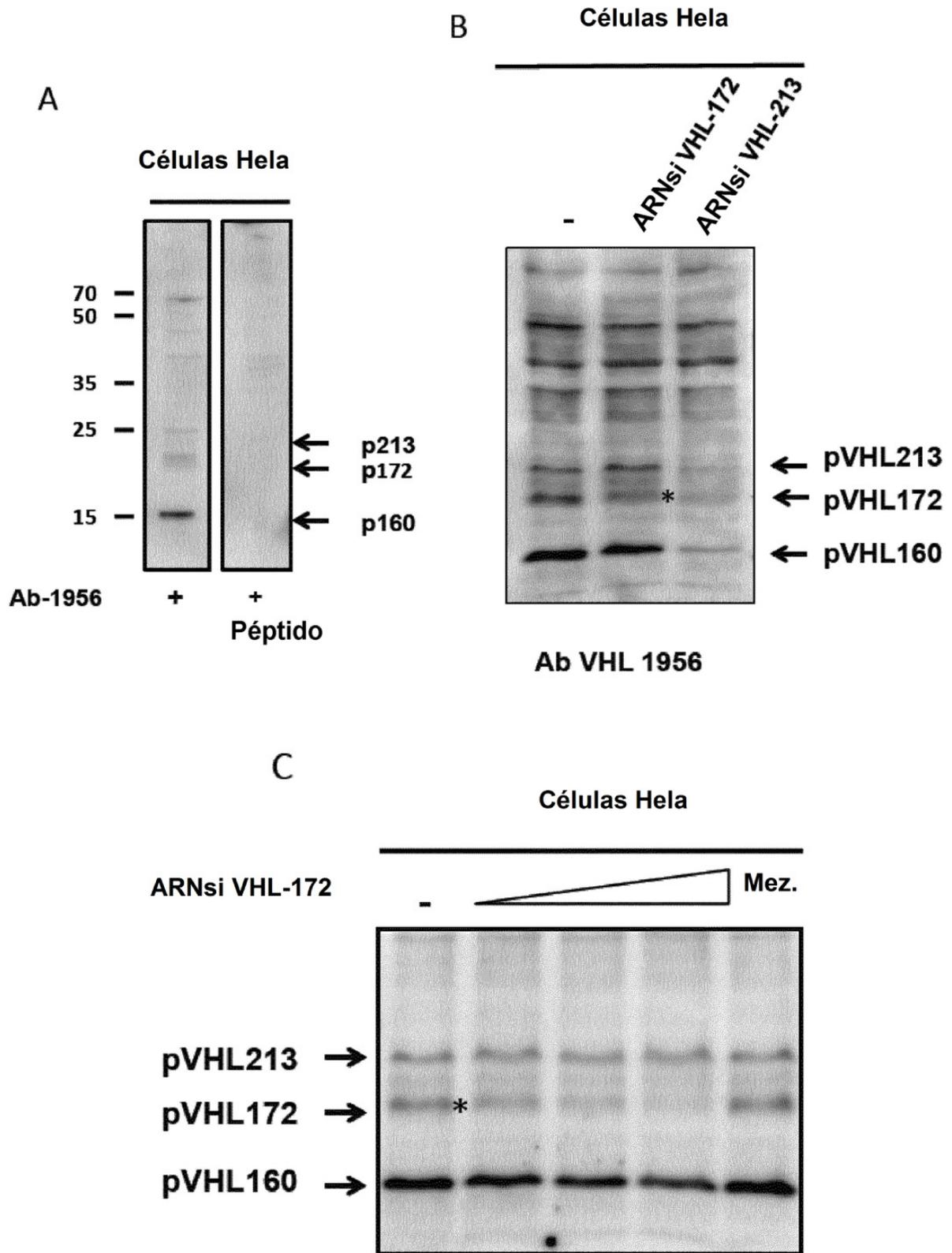


Figura 5

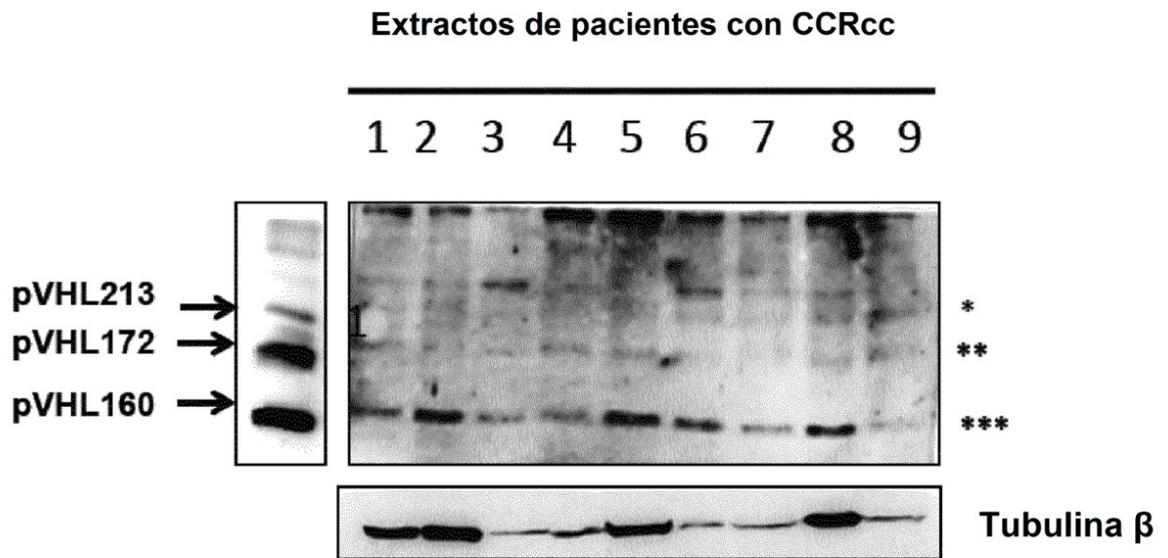


Figura 6

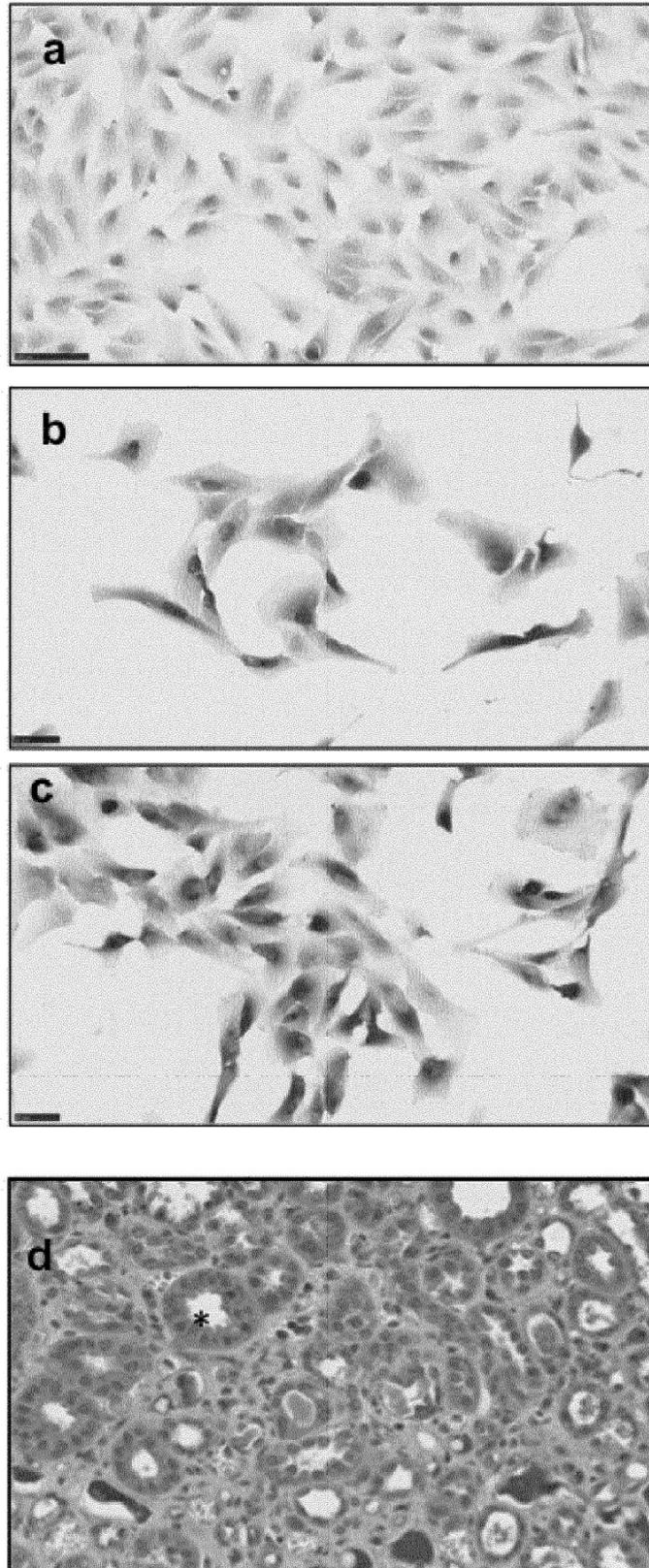


Figura 7