(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 695 899**

(51) Int. CI.:

C12N 5/10	(2006.01)	***G01N 33/577***	(2006.01)
C12N 15/09	(2006.01)		
C12N 15/62	(2006.01)		
C12N 15/82	(2006.01)		
C12N 15/86	(2006.01)		
A61K 47/68	(2007.01)		
C07K 16/18	(2006.01)		
C07K 16/30	(2006.01)		
G01N 33/574	(2006.01)		
A61K 39/00	(2006.01)		

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2011 E 16187573 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018 EP 3135692**

(54) Título: **Anticuerpos contra endoplasmina y su uso**

(30) Prioridad:

16.06.2010 US 355516 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.01.2019

(73) Titular/es:

UNIVERSITY OF PITTSBURGH OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION (100.0%)
1st Floor Gardner Steel Conference Center 130 Thackeray Avenue
Pittsburgh, Pennsylvania 15260, US

(72) Inventor/es:

FERRONE, SOLDANO;
WANG, XINHUI;
CONRADS, THOMAS P.;
FAVOINO, ELVIRA y
HOOD, BRIAN

(74) Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

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 contra endoplasmina y su uso

Campo

La presente invención se refiere al campo de los anticuerpos, específicamente anticuerpos totalmente humanos que se unen específicamente a la endoplasmina.

Antecedentes

Los melanomas son tumores agresivos frecuentemente metastásicos, derivados de melanocitos o bien de células névicas relacionadas con melanocitos («Cellular and Molecular Immunology» (1991) (eds.) Abbas A. K., Lechtman, A. H., Pober, J. S.; W. B. Saunders Company, Philadelphia: páginas 340-341). Los melanomas representan aproximadamente el tres por ciento de todos los cánceres de piel, y el crecimiento del melanoma en todo el mundo es superior al de cualquier otra neoplasia, a excepción del cáncer de pulmón en mujeres («Cellular and Molecular Immunology» (1991) (eds.) Abbas, A. K., Lechtiman, A. H., Pober, J. S.; W. B. Saunders Company Philadelphia, páginas: 340-342; Kirkwood and Agarwala (1993) Principles and Practice of Oncology 7:1-16). Incluso cuando el melanoma está aparentemente localizado en la piel, hasta el 30 % de los pacientes desarrollarán metástasis sistémicas y la mayoría morirán (Kirkwood and Agarwala (1993) Principles and Practice of Oncology 7:1-16).Las modalidades clásicas del tratamiento del melanoma incluyen la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia.En la pasada década, la inmunoterapia y otros métodos moleculares han emergido como nuevos y prometedores métodos para el tratamiento del melanoma.

La existencia de linfocitos en el interior de depósitos de melanoma constituye una prueba sólida de que existe una respuesta inmunitaria al cáncer en humanos.Estos linfocitos, al ser aislados, son capaces de identificar antígenos tumorales específicos en melanomas autólogos y alogénicos de manera restringida por el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) (Itoh et al. (1986), Cancer Res. 46: 3011-3017; Muul et al. (1987), J. Immunol. 138:989-995); Topalian et al. (1989) J. Immunol. 142: 3714-3725; Darrow et al. (1989) J. Immunol. 142: 3329-3335; Horn et al. (1991) J. Immunother. 10:153-164; Kawakami et al. (1992j J. Immunol. 148: 638-643; Horn et al. (1993) J. Immunother. 13:18-30; O'Neil et al. (1993) J. Immunol. 151: 1410-1418).Los linfocitos infiltradores de tumores (TIL) de pacientes con melanoma metastásico reconocen antígenos compartidos, incluyendo antígenos de tejido específicos del linaje del melanocito-melanoma *in vitro* (Kawakami et al. (1993) J. Immunother. 14: 88-93; Anichini et al. (1993) J. Exp. Med. 177: 989-998).El hecho de que muchos pacientes con melanoma presenten defensas celulares y humorales contra estos tumores y de que los melanomas expresen tanto antígenos MHC como antígenos asociados a tumores (TAA) sugiere que la identificación y la caracterización de antígenos de melanoma adicionales será importante para la inmunoterapia de pacientes con melanoma.Sin embargo, continúan siendo necesarias nuevas modalidades para el tratamiento del melanoma y de otros cánceres.

WO 2009/039409 y US 2005/008649 divulgan una combinación de interferón con anticuerpos dirigidos al tumor.

WO 2012/075324 divulga anticuerpos que reconocen la endoplasmina glicosilada en las células cancerosas, pero solo con efectos citotóxicos en una minoría de células.

Resumen

La invención se define por las reivindicaciones.

En la presente invención se describen anticuerpos monoclonales aislados y fragmentos de unión al antígeno de dichos anticuerpos, que se unen específicamente a la endoplasmina glicosilada (Grp94).En algunas realizaciones, estos anticuerpos son completamente humanos.Estos anticuerpos poseen una elevada afinidad a la endoplasmina humana y pueden utilizarse para tratar y/o diagnosticar el cáncer.En un ejemplo, el mAb es un Fv monocatenario.

En algunas realizaciones, los anticuerpos descritos son útiles para detectar tumores que expresan endoplasmina, tales como el melanoma, cáncer de mama, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer renal, cáncer de pulmón, glioma, cáncer de vejiga, cáncer de ovario o cáncer de páncreas.En otras realizaciones, los anticuerpos descritos son útiles para tratar tumores, tales como el melanoma, cáncer de mama, carcinoma de células escamosas en la cabeza y el cuello, cáncer renal, cáncer de pulmón, glioma, cáncer de vejiga, cáncer de ovario o cáncer de páncreas.

En la presente divulgación también se divulgan ácidos nucleicos recombinantes que codifican estos anticuerpos, vectores de expresión que incluyen estos ácidos nucleicos, y células hospedadoras transformadas con esos vectores de expresión.

Lo anteriormente expuesto y otras características y ventajas se pondrán más claramente de manifiesto a partir de la siguiente descripción detallada, en la cual se hace referencia a las figuras acompañantes.

Descripción breve de las figuras

Figura 1a.Inmunopurificación de una biblioteca de expresión en fago de Fv monocatenario con la línea celular humana del melanoma WM1158.La biblioteca de expresión en fago de Fv monocatenario contiene una gran cantidad de fragmentos Fv monocatenarios que expresan fagos con diferentes especificidades.La biblioteca se

añadió a un tubo que contenía una suspensión de células de melanoma WM1158.Después de lavar el tubo para eliminar el fago no unido, se eluyó el fago unido a un pH elevado y se amplificó en el hospedador bacteriano E.coli TG1.Tras tres ciclos de inmunopurificación, los clones aislados se absorbieron con células linfoides B humanas cultivadas LG2 para eliminar el fago unido a los antígenos compartidos por las células del melanoma y linfoides humanas.A continuación se ensayó con células WM1158 en ELISA la reactividad del fago aislado.

Figura 1b.Reactividad diferencial con la línea celular de melanoma WM1158 y con la línea celular linfoide B LG2 del Fv monocatenario W9 aislado mediante inmunopurificación con células WM1158 una biblioteca de expresión de anticuerpos en fagos.Se sembraron células WM1158 en una placa de 96 pocillos y se incubaron con Fv monocatenario durante 3 horas a temperatura ambiente.La unión de Fv monocatenario se detectó utilizando mAb 9E10 específico de c-myc y estreptavidina-HPR. Como controles negativos se utilizaron el Fv monocatenario 119, que reconoce un antígeno irrelevante, y células LG2. El Fv monocatenario W9 reacciona específicamente con la línea celular WM1158.

Figura 2. Reactividad del Fv monocatenario W9 a múltiples tipos de líneas celulares humanas.

Se sembraron en una placa de 96 pocillos y se incubaron con Fv monocatenario W9 durante 2 horas a temperatura ambiente seis líneas celulares de melanoma, cuatro de cáncer de mama, una de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, tres de cáncer de páncreas, una de cáncer de vejiga, una de cáncer de pulmón, una de cáncer epitelial, una de cáncer de colon, una de cáncer renal, una de cáncer de próstata y una de cáncer de ovario.La unión de Fv monocatenario se detectó utilizando mAb 9E10 específico de c-myc y estreptavidina-HPR. El Fv monocatenario W9 reaccionó con todas las líneas celulares de melanoma, con dos líneas celulares de cáncer de mama y con líneas celulares de cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, de páncreas, de vejiga, de pulmón, epitelial, renal, ovárico y glioma.

Figuras 3a y 3b.Identificación de endoplasmina como el antígeno reconocido por Fv monocatenario W9.Se inmunoprecipitó con Fv monocatenario W9 un lisado de células de melanoma WM1158.Se utilizaron como controles el mAb específico de HLA clase I TP25.99 y el Fv monocatenario C21 específico de HMW-MAA.Las proteínas en los precipitados se resolvieron en un SDS-PAGE al 10 % reductor y se tiñeron con azul de Coomassie.La proteína de 94 KDa fue exclusiva del precipitado de W9 (A).Se obtuvieron los mismos resultados a partir de lisados de líneas celulares T24 (cáncer de vejiga), SUM149 (cáncer de mama) y SLR21 (cáncer renal).Se escindieron del gel SDS las bandas específicas y se analizaron mediante espectrometría de masas.La proteína humana identificada en las bandas de 94 KDa es la endoplasmina.

Figura 4. Rol de los carbohidratos en la expresión del determinante reconocido por el Fv monocatenario W9.Se cultivaron células COLO38 durante 72 horas en presencia de 0,5 µg/ml de tunicamicina.Se utilizaron como controles células incubadas en medio exclusivamente con DMSO y el mAb TP25.99.Se ensayaron las células mediante ELISA para determinar la unión de Fv monocatenario W9.Se incubaron las células con Fv monocatenario W9 durante 2 horas a 4 °C. La unión de Fv monocatenario se detectó utilizando el mAb 9E10 y anticuerpos HPR de cabra anti IgG de ratón.Se midió la absorbancia a 450 nm. El tratamiento con tunicamicina indujo una fuerte disminución de la unión de Fv monocatenario W9 a las células COLO38.Así pues, los carbohidratos desempeñan un papel en la expresión del determinante reconocido por el Fv monocatenario W9.

Figuras 5a y 5b.Especificidad de la reactividad del Fv monocatenario W9 a la endoplasmina canina recombinante (Grp94).Se inmovilizó endoplasmina canina recombinante (Grp94), que presenta una homología del 98,5 % en la secuencia de aminoácidos con la endoplasmina humana (Grp94), en una placa de 96 pocillos a razón de 20 µg/pocillo y se incubó con Fv monocatenario W9 durante 2 horas a temperatura ambiente.La unión de Fv monocatenario se detectó utilizando el mAb 9E10 y anticuerpos HPR de cabra anti IgG de ratón.Se midió la absorbancia a 450 nm. Como controles negativos se utilizaron el Fv monocatenario 119 y BSA. El Fv monocatenario W9 reconoce un determinante de la endoplasmina expresado en la membrana celular.

Figura 6. Inhibición dependiente de la dosis de la unión de Fv monocatenario W9 a las células COLO38 mediante endoplasmina canina recombinante(Grp94).Se preincubaron con Fv monocatenario W9 diluciones dobles de endoplasmina canina recombinante (Grp94).Se añadió la mezcla a una placa de 96 pocillos sembrada con células COLO38.La unión de Fv monocatenario se detectó utilizando el mAb 9E10 y anticuerpos HPR de cabra anti IgG de ratón.Se midió la absorbancia a 450 nm.Como control se utilizó B2m.La Grp94 canina recombinante inhibe específicamente la unión de Fv monocatenario W9 a las células COLO38.

Figuras 7a y 7b.Efecto de la transfección de células 293 con ADNc de endoplasmina (Grp94) sobre la unión del Fv monocatenario W9.Se transfectaron células 293 con 3 µg de clon de ADNc Grp94 HSP90B1 mediante electroporación.Se incubaron las células con Fv monocatenario W9 y mAb 9E10, seguido de incubación con anticuerpos FITC de cabra anti IgG de ratón.Se analizaron las células mediante citometría de flujo.Se utilizó como control el vector pCMV6-XL4.Se utilizaron como control células no transfectadas.La electroporación incrementa la unión de Fv monocatenario W9.La expresión del antígeno reconocido por el Fv monocatenario está regulada por choque térmico.

Figuras 8a y 8b.Efecto de la transducción de células FO-1 con ARNhc de endoplasmina (Grp94) sobre la unión del Fv monocatenario W9.Se transdujeron células FO-1 con ARNhc de endoplasmina (Grp94) y un ARNhc de control (ABCB5).Se incubaron las células con de Fv monocatenario W9 y mAb 9E10, seguido de incubación con anticuerpos FITC de cabra anti IgG de ratón.A continuación se analizaron las células mediante citometría de flujo. El

ARNhc de endoplasmina (Grp94) inhibió la unión del Fv monocatenario W9 en comparación con el ARNhc de control.

Figura 9. Rol de los carbohidratos en la expresión del epítopo reconocido por el mAb W9.Se incubaron células MIAPaCa-2 ($5x10^5$) de adenocarcinoma pancreático humano con o sin 2 µl de α-2(3,6,8.9)-neuraminidasa en 50 µl de medio RPM I1640 durante 24 horas a 37 °C en un incubador de CO2 al 5 %.A continuación se tiñeron con mAb W9 las células tratadas y se analizaron mediante citometría de flujo.Se utilizaron como control células tratadas con mAb TP25.99.

Figura 10. Expresión del epítopo de endoplasmina extracelular (Grp94) reconocido por el mAb W9 en células cancerosas de adenocarcinoma pancreático humano MIAPaCa-2.Se incubaron con ALDEFLUOR células de adenocarcinoma pancreático humanas MIAPaCa-2 para detectar actividad ALDH (TEST) y se tiñeron con mAb W9.Se utilizaron como referencia (CONTROL) células incubadas con ALDEFLUOR + inhibidor DAEB y teñidas con mAb W9.Se utilizaron como control Ig humanas (IgH).Se indica el porcentaje de células cancerosas, identificadas como células $ALDH^{bright}$.

Figura 11. Tinción inmunohistoquímica con mAb W9 de una lesión de adenocarcinoma pancreático humano extirpada quirúrgicamente.Se tiñeron con mAb W9 (1 µg/ml) criosecciones de una lesión de adenocarcinoma pancreático humano extirpada quirúrgicamente y tejido pancreático normal del mismo paciente.(X200).

Figura 12. Análisis de tinción IHC de la expresión de endoplasmina (Grp94) en células MDA-MB-231 de cáncer de mama basal humano y xenoinjerto de melanoma humano MV3 utilizando mAb W9.Se tiñeron con mAb W9 (5 µg/ml) (X200) células MDA-MB-231 de cáncer de mama basal humano fijadas en formalina y embebidas en parafina, células MCF-7 de cáncer de mama luminal humano y xenoinjerto de melanoma humano MV3.La tinción inmunohistoquímica con mAb W9 reveló una intensa tinción de las células MDA-MB-231 y el xenoinjerto MV3 por el mAb W9 (5 µg/ml).No se detectó tinción en las células MCF-7.

Figura 13. El mAb W9 inhibió significativamente el crecimiento de células tumorales que expresaban endoplasmina (Grp94).Se sembraron células cancerosas humanas (1×10^4/ pocillo) en una placa de 96 pocillos (medio RPMI 1640 suplementado con un 1 % de FBS) y se trataron con mAb W9 (5 µg/ml) durante 72 horas.Se utilizaron como control Ig humanas (IgH).A continuación se sometieron las células a ensayo MTT.Los resultados se expresan como % de inhibición del crecimiento.Valor * $p < 0,05$; * * Valor $p < 0,01$.

Figura 14. Inducción de apoptosis en células cancerosas mediante mAb W9.Se privó de nutrientes a células MV3 (melanoma) y MIAPaCa-2 (adenocarcinoma pancreático) humanas (4×10^5/ml) durante 24 horas y 3 horas respectivamente, y a continuación se incubaron con mAb W9 (50 µg/ml) en medio RPMI 1640 suplementado con un 1,5 % de FBS.Al cabo de 6 horas se determinó, mediante tinción con anexina V/PI, el porcentaje de células apoptóticas.Se analizaron las células mediante citometría de flujo.Se utilizaron como control negativo Ig humanas (IgH).

Figura 15. Inducción PARP escindida en células de melanoma humanas M21 mediante mAb W9.Se incubaron durante 72 horas células de melanoma humanas M21 (4×10^5/ml) con mAb W9 (5 µg/ml) en medio RPMI 1640 suplementado con un 1,5 % de FBS. Se analizaron lisados celulares en un análisis Western blot para determinar PARP escindida. Se utilizó β-actina como control de carga. El mAb W9 incrementó fuertemente la expresión de PARP escindida.

Figura 16. Inducción de caspasa-3 escindida en células de melanoma humanas MV3 mediante mAb W9.Se privó de nutrientes a células de melanoma humanas MV3 (4×10^5/ml) durante 24 horas, y a continuación se incubaron con mAb W9 (50 µg/ml) en medio RPMI 1640 suplementado con un 1,5 % de FBS.Se ensayaron lisados celulares en Western blot para determinar caspasa-3 escindida. Se utilizó β-actina como control de carga.Las densidades de las bandas resultantes, indicadas bajo las respectivas bandas, se determinaron mediante el software IMAGJ® y se normalizaron con respecto a la de la β-actina. El mAb W9 incrementó fuertemente la expresión de caspasa-3 escindida. No se detectó ningún efecto en las células tratadas con IgH.

Figura 17. Lisis de células de melanoma humanas MV3 dependiente de células y mediada por mAb W9.Se etiquetaron células de melanoma humanas MV3 con 50 µCi de ^{51}Cr, se resuspendieron en una densidad de $0,4 \times 10^6$ células/ml y se combinaron con mAb W9 (50, 10, 2 µg/ml) en una placa de ensayo de cultivo celular de base en U de 96 pocillos.Se utilizaron como control Ig humanas (IgH).Tras 30 minutos de incubación a 4 °C se añadieron PBMC (40:1 E:T) y se incubaron durante 4 horas a 37 °C en un incubador de CO_2.Se determinó la liberación de ^{51}Cr contando el sobrenadante libre de células en un contador de centelleo en microplaca Packard TOPCOUNT™.

Figura 18. Lisis de células de melanoma humanas MV3 dependiente del complemento y mediada por mAb W9.Se etiquetaron células de melanoma humanas MV3 con 50 µCi de ^{51}Cr y se resuspendieron en una densidad de 1×10^6 células/ml.Se incubaron las células diana con mAb W9 (50, 10, 2 µg/ml) en presencia de complemento de suero humano.Se utilizaron como control Ig humanas (IgH).Tras 2 horas de incubación a 37 °C en un incubador de CO_2, se determinó la liberación de ^{51}Cr contando el sobrenadante libre de células en un contador de centelleo en microplaca Packard TOPCOUNT™.

Figura 19. Inhibición de la proliferación *in vitro* de células iniciadoras de adenocarcinoma pancreático humano MIAPaCa-2 mediante mAb W9.Se incubaron con mAb W9 (25 µg/ml) durante 48 horas a 37 °C células de

adenocarcinoma pancreático humano MIAPaCa-2. A continuación se recogieron las células y se tiñeron con ALDEFLUOR® (TEST).Se utilizaron como referencia (CONTROL) células teñidas con ALDEFLUOR® + DAEB.Se utilizaron como control Ig humanas (IgH).Se indica el porcentaje de células cancerosas, identificadas como células $ALDH^{bright}$.

Figura 20. Inhibición de las rutas de señalización RAS-MEK- ERK y AK en células pancreáticas MIAPaCa-2 y PANC 1 mediante mAb W9.Se sembraron las células pancreáticas humanas MIAPaCa-2 y PANC 1 en una concentración de 1,0 x 10^5 por pocillo en una placa de 6 pocillos en medio RPMI 1640 con un 5 % de FBS y se incubaron durante 48 horas a 37 °C con el sobrenadante W9, el sobrenadante de control o bien sin tratar. Los lisados celulares se ensayaron en Western blot con anticuerpos monoclonales contra RAS, C-Raf, (p)-ERK 1/2 fosforilado, ERK1/2, (p)-FAK (Tyr397). FAK, β-catenina, p-AKT (Ser473) y AKT.Como control de carga se utilizó calnexina y β-actina.

Figura 21. Inhibición de las rutas de señalización en células de melanoma humanas M21 mediante mAb W9.Se sembraron las células de melanoma humanas M21 en una concentración de 1,0 x 10^5 por pocillo en una placa de 6 pocillos en medio RPMI 1640 con un 5 % de FBS y se incubaron durante 72 horas con el mAb W9 (5 µg/ml). Los lisados celulares se ensayaron en Western blot con anticuerpos monoclonales contra (p)-AKT fosforilado, Bcl-2, C-Raf, (p)-ERK1/2, PKCα, β-catenina.Como control se utilizaron Ig humanas (IgH) yPBS.Como control de carga se utilizó calnexina.

Figura 22. Inhibición de las rutas de señalización en células de melanoma humanas MV3 mediante mAb W9.Se incubaron durante 6 horas a 37 °C células de melanoma humanas MV3 con mAb W9 en RPMI 1640. A continuación se prepararon los lisados celulares y se analizaron en Western blot con anticuerpos monoclonales contra RAS, Met, p-Met, β-catenina, Ras, C-RAF, p-AKT y p-ERK1/2, Thr202/Tyr204. Como control de carga se utilizó β-actina.Se utilizaron como control células incubadas con IgH.

Figura 23. Reducción de metástasis pulmonar establecida en ratones tratados con mAb W9.Se inyectaron i.v. células de melanoma MV3 (1,4 x 10^8/ratón). Al cabo de 15 días, los ratones fueron tratados con mAb W9 (100 µg/ratón, i.v.) cada 48 horas. El día 25 se sacrificaron los ratones, se recogieron los pulmones, se fijaron con formalina y se tiñeron con H-E para el análisis de áreas de tumor.Los valores mostrados son el área de tumor media de cada grupo.** indica un valor $p < 0,01$.

Figura 24. Incremento de la expresión de endoplasmina (Grp94) por células de melanoma UACC-257 mediante agentes quimioterapéuticos.Se incubaron durante 48 horas células de melanoma humanas UACC- 257 (2 x 10^5/ml) en medio RPMI 1640 suplementado con un 10 % de FBS con 5-FU (300 µM), cisplatina (10 µM) y paclitaxel (20 nM). Se recogieron las células, se tiñeron con mAb W9 y se analizaron mediante citometría de flujo.Como control se utilizaron células no tratadas.Se indican el porcentaje de células teñidas y la intensidad media de fluorescencia (MFI).

Figuras 25a y 25b.Inhibición de la proliferación de células de adenocarcinoma pancreático humano MIAPaCa-2 mediante mAb W9 en combinación con 5-FU y ciclopamina.Se sembraron las células de adenocarcinoma pancreático humanas MIAPaCa-2 (2,5 x 10^3 células por pocillo) en una placa de 96 pocillos (medio RPMI 1640 con un 5 % de FBS) y se trataron con mAb W9 (5 µg/ml) en combinación con 5-FU (10 µM) (A.) o ciclopamina (20 µM) (B.) durante 1, 2, 3 a 37 °C en una atmósfera con un 5 % de CO2.A continuación se sometieron las células a ensayo MTT.Los valores de densidad óptica a 540 nm indican las células vivas.

Figura 26. Inhibición de la proliferación *in vitro* de células iniciadoras de adenocarcinoma pancreático humanas MIAPaCa-2 mediante mAb W9 en combinación con 5-FU y ciclopamina.Se incubaron células de adenocarcinoma pancreático humanas MIAPaCa-2 durante 48 horas a 37 °C con mAb W9 (25 µg/ml), ciclopamina (20 µM) y 5-FU (10 µM). A continuación se tiñeron las células con ALDEFLUOR con o sin inhibidor DEAB para identificar las células $ALDH^{bright}$® (TEST).Se utilizó como control el mAb TP25.99 contra HLA clase I.Se indica el porcentaje de células cancerosas, identificadas como células $ALDH^{bright}$.

Figura 27. Inducción de apoptosis en células de adenocarcinoma pancreático humanas MIAPaCa-2 mediante mAb W9 en combinación con 5-FU y ciclopamina.Se privó de nutrientes durante 3 horas a células de adenocarcinoma pancreático humano (4 x 10^5/ml) y a continuación se incubaron con mAb W9 (10 µg/ml), ciclopamina (20 µM) y 5-FU (10 µM) en medio RPMI 1640 suplementado con un 1,5 % de FBS.Al cabo de 24 horas se determinó, mediante tinción con anexina V/PI, el porcentaje de células apoptóticas.Se analizaron las células mediante citometría de flujo.Se usó IgH como control negativo.

Figuras 28a y 28b.Inhibición de la proliferación *in vitro* de células iniciadoras de adenocarcinoma pancreático humano MIAPaCa-2 mediante mAb W9 en combinación con radiación y ciclopamina.Se irradiaron células de adenocarcinoma pancreático humanas MIAPaCa-2 (4 x 10^5/ml) con una dosis de 20 Gy (panel A.) y se incubaron durante 72 horas a 37 ℃ con mAb W9 (10 µg/ml) y ciclopamina (20 µM). A continuación se tiñeron las células con ALDEFLUOR con o sin inhibidor DEAB para identificar las células ALDHbright.Se utilizaron como control células no irradiadas (panel B.).Se indica el porcentaje de células cancerosas, identificadas como células $ALDH^{bright}$.

Figura 29. Inducción de apoptosis en células de adenocarcinoma pancreático humanas MIAPaCa-2 mediante mAb W9 en combinación con radiación y ciclopamina.Se irradiaron células de adenocarcinoma pancreático humanas MiaPaCa-2 (4 x 10^5/ml) con una dosis de 20 Gy y se incubaron con mAb W9 (20 µg/ml) y ciclopamina (20 µM).Al cabo de 8 horas se determinó, mediante tinción con anexina V/PI, el porcentaje de células apoptóticas.Se analizaron

las células mediante citometría de flujo.Como control se utilizaron células no irradiadas e Ig humanas (IgH).

Figura 30. Inhibición de las rutas de señalización en células de adenocarcinoma pancreático humanas MIAPaCa-2 mediante mAb W9 en combinación con 5-FU y ciclopamina.Se incubaron durante 2 días a 37 °C (panel D) células de adenocarcinoma pancreático humanas MIAPaCa-2 con mAb W9, ciclopamina (20 µM) y 5-FU (10 µM).A continuación se prepararon lisados celulares y se ensayaron en Western blot con anticuerpos monoclonales contra RAS, C-Raf, (p)-MEK fosforilado (Ser217/221), MEK, pERK(Thr202/Tyr204), ERK, p-AKT (Ser473), AKT.Como control de carga se utilizó calnexina.

Como controles se utilizaron células incubadas exclusivamente con mAb W9 (panel A), con mAb W9 y ciclopamina (panel B) y con mAb W9 y 5 FU (panel C).

Figura 31. Inhibición de las rutas de señalización en células de adenocarcinoma pancreático humanas MIAPaCa-2 mediante mAb W9 en combinación con radiación y ciclopamina.Se irradiaron células de adenocarcinoma pancreático humanas MIAPaCa-2 con una dosis de 20 Gy y se incubaron durante 48 horas a 37 °C con mAb W9 (10 µg/ml) y ciclopamina (20 µM). A continuación se prepararon lisados celulares y se ensayaron en Western blot con anticuerpos monoclonales contra RAS, (p)-ERK(Thr202/Tyr204) fosforilado, ERK, p- AKT (Ser473), AKT, SHh, GLI1.Como control de carga se utilizó calnexina. Como control de carga se utilizaron calnexina y β-actina.

Listado de secuencias

Las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos enumeradas en el listado de secuencias adjunto se muestran usando abreviaturas de letras estándar para las bases nucleotídicas y códigos de tres letras para los aminoácidos, tal como se define en 37 C.F.R. 1.822.Solo se muestra una cadena de cada secuencia de ácido nucleico, pero se entiende que la cadena complementaria está incluida en cualquier referencia a la cadena mostrada.El listado de secuencias se presenta como archivo de texto ASCII [Sequence_Listing.txt, June 15, 2011, 19.4 KB],

La SEC ID Nº: 1 es la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a la endoplasmina.

La SEC ID Nº: 2 es la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de un anticuerpo que se une específicamente a la endoplasmina.

La SEC ID Nº: 3 es una secuencia de ácido nucleico que codifica la cadena pesada de un anticuerpo que se une específicamente a la endoplasmina.

La SEC ID Nº: 4 es una secuencia de ácido nucleico de la cadena ligera de un anticuerpo que se une específicamente a la endoplasmina.

La SEC ID Nº: 5 es una secuencia de aminoácidos de una endoplasmina humana.

La SEC ID Nº: 6 es una secuencia de ácido nucleico que codifica la endoplasmina humana.

Las SEC ID Nº: 7 y 8 son secuencias de aminoácidos de polipéptidos de la endoplasmina.

Descripción detallada

I. Abreviaturas

5-FU:5-fluorouracilo

ADCC:citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos

Ag:antígeno

$ALDH^{bright}$:aldehído deshidrogenasa (bright)

Anexina V:anexina A5

β-catenina:proteína asociada a cadherina

B-Raf:serina/treonina proteína quinasa B-Raf

CDC:citotoxicidad dirigida por complemento

CDR:región determinante de la complementariedad

C-Raf:serina/treonina proteína quinasa protooncogénica RAF

DEAB:4-(dietilamino)benzaldehído

DMEM:medio de cultivo de águila modificado de Dulbecco

ER:retículo endoplásmico

ERK1/2:quinasa regulada por señal extracelular 1/2

FAK:quinasa de adhesión focal

FBS:suero fetal bovino

FR:región marco

GLI1:homólogo de oncogén asociado a glioma 1

Grp:proteína regulada por glucosa

Gy:Gray

HRP:peroxidasa de rábano silvestre

Ig:inmunoglobulina

mAb:anticuerpo monoclonal

MEK:proteína quinasa quinasa activada por mitógeno

Met:factor de crecimiento de hepatocitos

O.D.:densidad óptica

PBS:tampón fosfato salino

p-ERK1/2:quinasa fosforilada regulada por señal extracelular 1/2

p-FAK:quinasa fosforilada de adhesión focal

PI:yoduro de propidio

RAS:sarcoma de rata

scFv:regiones variables monocatenarias de V_H y V_L

SHH:homólogo Sonic hedgehog

V_H:región de cadena pesada variable

V_L:región de cadena ligera variable

II. Términos

Salvo que se indique otra cosa, los términos técnicos se utilizan con arreglo al uso convencional.

Las definiciones de términos comunes en la biología molecular pueden consultarse en Benjamin Lewin, Genes V, publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew et al. (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9) y Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

A fin de facilitar la revisión de las diversas realizaciones de esta divulgación, se proporcionan las siguientes explicaciones de términos específicos:

Anticuerpo:un polipéptido ligando que comprende como mínimo una región variable de inmunoglobulina de cadena ligera o cadena pesada que reconoce específicamente y se une específicamente a un epítopo de un antígeno, por ejemplo endoplasmina, o a un fragmento de este.Los anticuerpos se componen de una cadena ligera y una cadena pesada, cada una de las cuales posee una región variable, denominada región pesada variable (VH) y región ligera variable (VL).Conjuntamente, la región VH y la región VL son responsables de unirse al antígeno reconocido por el anticuerpo.

Los anticuerpos incluyen inmunoglobulinas intactas y las variantes.Los fragmentos funcionales (fragmentos de unión al antígeno) de los anticuerpos, que se unen específicamente a un antígeno, por ejemplo endoplasmina, son bien conocidos en la técnica, comofragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab)'2, proteínas Fv monocatenarias («scFv») y proteínas Fv estabilizadas por disulfuro («dsFv») que se unen específicamente al antígeno diana.Una proteína scFv es una proteína de fusión en la que una región variable de cadena ligera de una inmunoglobuilina y una región variable de cadena pesada de una inmunoglobuilina están unidas por un enlazador, mientras que en dsFvs las cadenas han sido mutadas para introducir un enlace disulfuro para estabilizar la asociación de las cadenas.El término también incluye formas creadas por ingeniería genética, tales como anticuerpos quiméricos (por ejemplo, anticuerpos murinos humanizados), anticuerpos heteroconjugados (tales como anticuerpos biespecíficos).Véase también Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL); Kuby, J., Immunology, 3rd Ed., W. H. Freeman & Co., New York, 1997. Los fragmentos funcionales se denominan también fragmentos «de unión al antígeno», puesto que se unen específicamente al antígeno diana, por ejemplo la endoplasmina humana.

Típicamente, una inmunoglobulina que se produce de forma natural tiene cadenas pesadas (H) cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces de disulfuro.Hay dos tipos de cadena ligera: lambda (λ) y kappa (k).Hay cinco clases principales (o isótopos) de cadena pesada que determinan la actividad funcional de una molécula de anticuerpo:IgM,

IgD, IgG, IgA e IgE.

Cada cadena pesada y ligera contiene una región constante y una región variable (las regiones también se denominan «dominios»).En combinación, las regiones variables de cadena pesada y ligera se unen específicamente al antígeno.Las regiones variables de cadena pesada y ligera contienen una región «marco») interrumpida por tres regiones hipervariables, también denominadas «regiones determinantes de la complementariedad» o «CDR».La extensión de la región marco y de las CDR ha sido definida (véase Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1991).La base de datos Kabat se mantiene ahora en línea, y permite determinar secuencias CDR; véase por ejemplo el programa IMGT/V-QUEST versión: 3.2.18., 29 de marzo de 2011, disponible en Internet y Brochet, X. et al., Nucl. Acids Res. 36, W503-508, 2008).Las secuencias de las regiones marco de diferentes cadenas ligeras o pesadas se conservan relativamente dentro de una especie, como por ejemplo los humanos.La región marco de un anticuerpo, esto es, las regiones marco combinadas de las cadenas ligeras y pesadas constituyentes, sirve para posicionar y alinear las CDR en el espacio tridimensional.

Las CDR son responsables principalmente de la unión a un epítopo de un antígeno.Las CDR de cada cadena se denominan típicamente CDR1, CDR2 y CDR3, están numeradas secuencialmente empezando por el terminal N y también están identificadas típicamente por la cadena en la cual está ubicada la CDR concreta.Así pues, una VH CDR3 está ubicada en el dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo en el que se encuentra, mientras que una VL CDR1 es la CDR1 del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo en el que se encuentra.Generalmente, un anticuerpo que se une a la endoplasmina tendrá una región VH específica y la secuencia de la región VL, y por consiguiente secuencias CDR específicas.Los anticuerpos con especificidades diferentes (esto es, diferentes sitios de combinación para diferentes antígenos) tienen CDR diferentes.Pese a que son las CDR las que varían de un anticuerpo a otro, solo un número limitado de posiciones de aminoácido dentro de las CDR están implicadas directamente en una unión a antígeno.Estas posiciones dentro de las CDR se denominan residuos determinantes de la especificidad (SDR).

Las referencias a «V_H» o «VH» se refieren a la región variable de una cadena pesada de inmunoglobulina, incluyendo la de un Fv, scFv, dsFv o Fab.Las referencias a «V_H» o «VH» se refieren a la región variable de una cadena pesada de inmunoglobulina, incluyendo la de un Fv, scFv, dsFv o Fab.Un «anticuerpo monoclonal» es un anticuerpo producido por un único clon de linfocitos B o por una célula en la que se han transfectado los genes de la cadena ligera y pesada de un único anticuerpo.Los anticuerpos monoclonales se producen mediante métodos conocidos por los expertosen la técnica, por ejemplo produciendo células productoras de anticuerpos híbridas a partir de una fusión de células de mieloma con células inmunitarias del bazo.Los anticuerpos monoclonales incluyen anticuerpos monoclonales humanizados.

Un «anticuerpo quimérico» tiene residuos marco de una especie, por ejemplo la humana, y CDR (las cuales generalmente confieren la unión al antígeno) de otra especie, por ejemplo un anticuerpo murino que se une específicamente a la endoplasmina.

Un anticuerpo «humano» (también denominado anticuerpo «totalmente humano» es un anticuerpo que incluye regiones marco humanas y todas las CDR de una inmunoglobulina humana.En un ejemplo, el marco y las CDR son de la misma secuencia de aminoácidos de cadena pesada y/o ligera humana original.Sin embargo, los marcos de un anticuerpo humano pueden ser diseñados para que incluyan CDR de un anticuerpo humano diferente.Una inmunoglobulina «humanizada» es una inmunoglobulina que incluye una región marco humana y una o varias CDR de una inmunoglobulina no humana (por ejemplo de ratón, rata o sintética).La inmunoglobulina no humana que aporta las CDR se denomina «donante», y la inmunoglobulina humana que aporta el marco se denomina «aceptador».En una realización, todas las CDR proceden de la inmunoglobulina donante en una inmunoglobulina humanizada.No es necesaria la presencia de regiones constantes, pero si están presentes deben ser sustancialmente idénticas a las regiones constantes de la inmunoglobulina humana, esto es, idénticas en como mínimo un 85-90 %, por ejemplo en un 95 % o más.Así pues, todas las partes de una inmunoglobulina humanizada, excepto posiblemente las CDR, son sustancialmente idénticas a las partes correspondientes de secuencias de inmunoglobulina humana natural.Un «anticuerpo humanizado» es un anticuerpo que comprende una inmunoglobulina de cadena ligera humanizada y una inmunoglobulina de cadena pesada humanizada.Un anticuerpo humanizado se une al mismo antígeno que el anticuerpo donante que aporta las CDR.El marco aceptador de una inmunoglobulina o un anticuerpo humanizados puede tener un número limitado de sustituciones por aminoácidos tomados del marco donante.Los anticuerpos humanizados u otros anticuerpos monoclonales pueden tener sustituciones de aminoácidos conservativas adicionales, las cuales no afectan sustancialmente a la unión al antígeno u otras funciones de la inmunoglobulina.Es posible crear inmunoglobulinas humanizadas por medio de ingeniería genética (véase por ejemplo la Patente USAnº 5.585.089).

Antígeno:un compuesto, una composición o una sustancia capaz de estimular la producción de anticuerpos o una respuesta de células T en un animal, incluyendo las composiciones inyectadas o absorbidas en un animal.Un antígeno reacciona con los productos de la inmunidad humoral o celular específica, incluidos los productos inducidos por inmunógenos heterólogos.Un ejemplo de antígeno es la endoplasmina.El término «antígeno» incluye todos los epítopos antigénicos relacionados.«Epítopo» o «determinante antigénico» se refiere a una posición en un antígeno a la cual responden células B y/o T.Los epítopos pueden formarse a partir de aminoácidos contiguos o aminoácidos no contiguos yuxtapuestos mediante plegamiento terciario de una proteína.Típicamente, los epítopos formados a partir

de aminoácidos contiguos se conservan cuando se exponen a disolventes desnaturalizantes, mientras que los epítopos formados mediante plegamiento terciario se pierden típicamente cuando se tratan con disolventes desnaturalizantes.Un epítopo incluye típicamente como mínimo tres, y más habitualmente como mínimo cinco u ocho a diez aminoácidos en una conformación espacial única.Los métodos para determinar la conformación espacial de los epítopos incluyen, por ejemplo, la cristalografía de rayos X y la resonancia magnética nuclear bidimensional.

Un antígeno puede ser un antígeno específico de un tejido o un antígeno específico de una enfermedad.

Estos términos no son excluyentes, dado que un antígeno específico de un tejido puede ser también un antígeno específico de una enfermedad.Un antígeno específico de un tejido se expresa en un número limitado de tejidos, como por ejemplo un único tejido.Ejemplos específicos no limitativos de un antígeno específico de un tejido son un antígeno específico de melanoma, o un antígeno específico de glioma, mama, pulmón, próstata, riñón o vejiga.Un antígeno específico de una enfermedad se expresa coincidiendo con un proceso patológico, como por ejemplo un melanoma u otro tipo de cáncer.Ejemplos específicos no limitativos de un antígeno específico de una enfermedad son un antígeno cuya expresión está correlacionada con, o es predictiva de formación tumoral, tales como melanoma y/o glioma, y/u otro tipo de cáncer (por ejemplo, endoplasmina).Un antígeno específico de una enfermedad puede ser un antígeno reconocido por células T o células B.

Amplificación:de una molécula de ácido nucleico (p. ej, una molécula de ADN o ARN) se refiere al uso de una técnica que aumenta el número de copias de una molécula de ácido nucleico es una muestra.Un ejemplo de amplificación es la reacción en cadena de la polimerasa, en la que una muestra biológica tomada de un sujeto se pone en contacto con un par de cebadores oligonucleótidos, en condiciones que permiten la hibridación de los cebadores para crear una plantilla de ácido nucleico en la muestra.Los cebadores se extienden en las condiciones adecuadas, se disocian de la plantilla y a continuación se realinean, se extienden y se disocian para amplificar el número de copias del ácido nucleico.El producto de la amplificación puede caracterizarse mediante electroforesis, patrones de escisión por endonucleasa de restricción, hibridación o ligadura de oligonucleótidos y/o secuenciación de ácido nucleico utilizando técnicas estándar.Otros ejemplos de amplificación incluyen la amplificación por desplazamiento de cadena, como se describe en la Patente USAnº 5.744.311; amplificación isotérmica sin transcripción, como se describe en la Patente USAnº 6.033.881; amplificación por reacción en cadena de reparación, como se describe en el documento WO 90/01069; amplificación por reacción en cadena de ligasa, como se describe en el documento EP-A-320 308; amplificación por reacción en cadena de ligasa con rellenado de huecos, como se describe en la Patente USAnº 5.427.930; y amplificación sin transcripción de ARN NASBA™, como se describe en la Patente USAnº 6.025.134.

Animal:organismos vertebrados multicelulares vivos, una categoría que incluye, por ejemplo, mamíferos y aves.El término «mamífero» incluye a los mamíferos tanto humanos como no humanos, incluyendo los primates no humanos.Similarmente, el término «sujeto» incluye tanto a humanos como a sujetos de veterinaria.

Afinidad de enlace:afinidad de un anticuerpo a un antígeno.En una realización, la afinidad se calcula por la modificación del método de Scatchard descrito por Frankel et al., Mol. Immunol., 16:101-106.En otra realización, la afinidad de enlace se mide mediante una tasa de disociación antígeno/anticuerpo.En otra realización, una afinidad de enlace elevada se mide por radioinmunoensayo de competición.En otra realización, la afinidad de enlace se mide mediante ELISA.Un anticuerpo que «se une específicamente» con una elevada afinidad a un antígeno, como por ejemplo la endoplasmina, y no se une significativamente a otros antígenos no relacionados.

Cáncer de mama:una neoplasia del tejido mamario que puede ser benigna o maligna.El tipo de cáncer de mama más común es el carcinoma ductal.El carcinoma ductal in situ es una neoplasia no invasiva de los conductos mamarios.El carcinoma lobular no es una enfermedad invasiva, pero es un indicador de que podría desarrollarse un carcinoma.El carcinoma infiltrante (maligno) de mama puede dividirse en las fases (I, IIA, IIB, III A, IIIB y IV).

Agentes quimioterapéuticos:Cualquier agente químico con utilidad terapéutica en el tratamiento de enfermedades caracterizadas por crecimiento celular anormal.Dichas enfermedades incluyen tumores, neoplasias y cáncer así como enfermedades caracterizadas por crecimiento hiperplásico, como la psoriasis.En algunas realizaciones, un agente quimioterapéutico es un agente utilizado en el tratamiento del cáncer de mama, melanoma y/o gliomas.En una realización, un agente quimioterapéutico es un compuesto radioactivo.Un experto en la técnica puede identificar fácilmente un agente quimioterapéutico de uso (por ejemplo, véase Slapak and Kufe, Principles of Cancer Therapy, capítulo 86 in Harrison's Principles of Internal Medicine, 14ª edición; Perry et al., Chemotherapy, cap. 17 en Abeloff, Clinical Oncology 2.º ed., © 2000 Churchill Livingstone, Inc; Baltzer L, Berkery R (eds):Oncology Pocket Guide to Chemotherapy, 2ª ed. St. Louis, Mosby-Year Book, 1995; Fischer DS, Knobf MF, Durivage HJ (eds): The Cancer Chemotherapy Handbook, 4ª ed. St. Louis, Mosby-Year Book, 1993).La quimioterapia de combinación es la administración de más de un agente para tratar el cáncer, como por ejemplo la administración a un sujeto de anticuerpos que se unen específicamente a la endoplasmina en combinación con un compuesto radioactivo o químico.

Anticuerpo quimérico:un anticuerpo que incluye secuencias derivadas de dos anticuerpos diferentes, que típicamente son de diferentes especies.Más típicamente, los anticuerpos quiméricos incluyen dominios de anticuerpos humanos y murinos, generalmente regiones constantes humanas y variables murinas, CDR murinas y/o SDR murinas.

ADNc (ADN complementario):una cadena de ADN que carece de segmentos internos no codificantes (intrones) y de

secuencias reguladoras que determinan la transcripción. El ADNc se sintetiza en el laboratorio mediante transcripción inversa a partir de ARN mensajero extraído de células.

Agente quimioterapéutico:un agente químico con utilidad terapéutica en el tratamiento de enfermedades caracterizadas por crecimiento celular anormal (p. ej., un agente antineoplásico).Dichas enfermedades incluyen tumores, neoplasias y cáncer así como enfermedades caracterizadas por crecimiento hiperplásico, como la psoriasis.En una realización, un agente quimioterapéutico es un agente utilizado en el tratamiento de neoplasias tales como tumores sólidos.Los agentes quimioterapéuticos pueden ser agentes proteínicos o no proteínicos, tales como fármacos de moléculas pequeñas, anticuerpos, péptidos, proteínas e inmunomoduladores.En una realización, un agente quimioterapéutico es una molécula radioactiva.Un especialista en la técnica puede identificar fácilmente un agente quimioterapéutico (por ejemplo, véase Slapak and Kufe, Principles of Cancer Therapy, capítulo 86 in Harrison's Principles of Internal Medicine, 14ª edición; Perry et al., Chemotherapy, cap. 17 en Abeloff, Clinical Oncology 2.º ed., © 2000 Churchill Livingstone, Inc; Baltzer L, Berkery R (eds): Oncology Pocket Guide to Chemotherapy, 2ª ed. St. Louis, Mosby-Year Book, 1995; Fischer DS, Knobf MF, Durivage HJ (eds): The Cancer Chemotherapy Handbook, 4ª ed. St. Louis, Mosby-Year Book, 1993).

Variantes conservativas:Las sustituciones «conservativas» de aminoácidos son aquellas sustituciones que no afectan o disminuyen sustancialmente la afinidad de un anticuerpo a unirse específicamente a la endoplasmina.Por ejemplo, un anticuerpo humano que se une específicamente a la endoplasmina puede incluir como máximo aproximadamente 1, como máximo aproximadamente 2, como máximo aproximadamente 5 y como máximo aproximadamente 10 sustituciones conservativas y unirse específicamente al polipéptido de endoplasmina original.La expresión variación conservativa también incluye el uso de un aminoácido sustituido en lugar de un aminoácido precursor no sustituido, con la condición de que el anticuerpo se una específicamente a la endoplasmina.Las sustituciones no conservativas son aquellas que reducen una actividad o unión a la endoplasmina.

Las tablas de sustitución de aminoácidos conservativos que proporcionan aminoácidos similares son bien conocidas por los expertos en la técnica. Los siguientes seis grupos son ejemplos de aminoácidos que están considerados como sustituciones conservativas entre sí:

1. Alanina (A), Serina (S), Treonina (T);
2. Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E);
3. Asparagina (N), Glutamina (Q);
4. Arginina (R), Lisina (K);
5. Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V) y
6. Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W).

Región determinante de la complementariedad (CDR):Secuencias de aminoácidos que, conjuntamente, definen la afinidad y la especificidad de enlace de la región Fv natural de un sitio de unión de Ig nativa.Cada una de las cadenas ligera y pesada de una Ig tiene tres CDR, designadas como L-CDR1, L-CDR2, L-CDR3 y H-CDR1, H-CDR2, H-CDR3, respectivamente.

Puesta en contacto:puesta en asociación física directa, incluye las formas sólida y líquida.

Citotoxicidad:la toxicidad de una molécula, como una inmunotoxina, para las células diana, en contraposición a las células del resto de un organismo.En otra realización, en contraste, el término «toxicidad» se refiere a la toxicidad de una inmunotoxina para células distintas a las células diana de la fracción de direccionamiento de la inmunotoxina, y el término «toxicidad animal» se refiere a la toxicidad de la inmunotoxina para un animal debido a la toxicidad de una inmunotoxina para células distintas a las células diana de la inmunotoxina.

Variante degenerada:un polinucleótido que codifica un polipéptido de endoplasmina que incluye una secuencia que está degenerada como resultado del código genético.Existen 20 aminoácidos naturales, la mayoría de los cuales están especificados por más de un codón.Por lo tanto, todas las secuencias de nucleótidos degeneradas están incluidas en esta divulgación, siempre y cuando la secuencia de aminoácidos del polipéptido de endoplasmina codificado por la secuencia de nucleótidos esté inalterada.

Diagnóstico:Identificar la presencia o naturaleza de una afección patológica tal como, aunque sin carácter limitativo, un melanoma, cáncer ovárico, cáncer de mama o glioma.

Los métodos de diagnóstico difieren en su sensibilidad y especificidad.La «sensibilidad» de un ensayo de diagnóstico es el porcentaje de individuos enfermos que dan positivo en el test (porcentaje de verdaderos positivos).La «especificidad» de un ensayo de diagnóstico es uno menos la tasa de falsos positivos, donde la tasa de falsos positivos se define como la proporción de individuos sin la enfermedad que dan positivo en el test.Aunque un método de diagnóstico concreto puede no proporcionar un diagnóstico definitivo de una afección, es suficiente si el método proporciona una indicación positiva que ayude en el diagnóstico.«Pronóstico» es la probabilidad de desarrollo (por ejemplo, gravedad) de una afección patológica, como por ejemplo cáncer o metástasis.

Molécula efectora:la parte de una molécula quimérica que debe tener un efecto deseado en una célula a la que está dirigida la molécula quimérica.La molécula efectora también se conoce como fracción efectora (EM), agente terapéutico, agente diagnóstico o términos similares.

Los agentes terapéuticos incluyen compuestos tales como ácidos nucleicos, proteínas, péptidos, aminoácidos o derivados, glicoproteínas, radioisótopos, lípidos, carbohidratos o virus recombinantes.Los grupos funcionales terapéuticos y diagnósticos de ácidos nucleicos incluyen ácidos nucleicos antisentido, oligonucleótidos derivatizados para entrelazamiento covalente con ADN simple o doble y oligonucleótidos inductores de triple hélice.Alternativamente, la molécula ligada a una fracción de direccionamiento, por ejemplo un anticuerpo contra endoplasmina, puede ser un sistema de encapsulación, como por ejemplo un liposoma o una micela que contiene una composición terapéutica como un fármaco, un ácido nucleico (como un ácido nucleico antisentido) u otra fracción terapéutica que puede ser protegida contra la exposición directa al sistema circulatorio.Los métodos para la preparación de liposomas ligados a anticuerpos (véase, por ejemplo, la Patente USAnº 4.957.735; y Connor et al., Pharm. Ther. 28:341-365, 1985) son bien conocidos por los expertos en la técnica.Los agentes o grupos diagnósticos incluyen radioisótopos y otras etiquetas detectables.También son bien conocidos por los expertosen la técnica etiquetas detectables útiles para tales fines, que incluyen isótopos radioactivos tales como ^{35}S, ^{11}C, ^{13}N, $^{15}0$, ^{18}F, ^{19}F, ^{99m}Tc, $^{131}1$, ^{3}H, ^{14}C, ^{15}N, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In y ^{125}I, fluoróforos, agentes quimioluminiscentes y enzimas.

Epítopo:un determinante antigénico.Se trata de grupos químicos o secuencias de péptidos concretos en una molécula que son antigénicos, es decir, que provocan una respuesta inmunitaria específica.Un anticuerpo se une específicamente a un epítopo antigénico concreto en un polipéptido.Los epítopos pueden formarse a partir de aminoácidos contiguos o aminoácidos no contiguos yuxtapuestos mediante plegamiento terciario de una proteína.Típicamente, los epítopos formados a partir de aminoácidos contiguos se conservan cuando se exponen a disolventes desnaturalizantes, mientras que los epítopos formados mediante plegamiento terciario se pierden típicamente cuando se tratan con disolventes desnaturalizantes.Un epítopo incluye típicamente como mínimo tres, y más habitualmente como mínimo cinco u ocho a diez aminoácidos en una conformación espacial única.Los métodos para determinar la conformación espacial de los epítopos incluyen, por ejemplo, la cristalografía de rayos X y la resonancia magnética nuclear bidimensional.Véase p. ej. Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed (1996). Un epítopo puede ser glicosilado.Así pues, un anticuerpo se puede unir específicamente a una forma glicosilada (o a una forma no glicosilada) de una proteína.

Endoplasmina:una proteína también conocida como proteína regulada por glucosa (Grp) 94 (Grp94), que es el miembro residente en el retículo endoplásmico (ER) de la familia de proteínas de choque térmico 90 (Hsp90).En vivo, Hsp90 y la endoplasmina interactúan con proteínas cliente y funcionan para protegerlas contra la degradación proteasomal dependiente de ubiquitina.Aunque la proteína endoplasmina se expresa constitutivamente en todos los tipos de células, su expresión aumenta en diversas condiciones de estrés que incluyen niveles de glucosa bajos, pH extracelular bajo, expresión de proteínas mutadas e infecciones virales.Las proteínas de choque térmico tienen una función citoprotectora y modulan la apoptosis directa o indirectamente.

Se ha demostrado que la expresión de endoplasmina en la superficie de la célula se incrementa en las células tumorales, incluyendo células de carcinoma hepatocelular, carcinoma colorrectal y cáncer de pulmón, y que la endoplasmina tiene un efecto antiapoptótico en algunas células tumorales.Además, se observaron niveles aumentados de endoplasmina cuando una infección crónica por virus de la hepatitis B (HBV) desembocó en cirrosis y carcinoma hepatocelular (HCC).Se han investigado inhibidores de Hsp90 y endoplasmina (tales como la geldanamicina (GA) y su derivado menos tóxico 17-AAG) para determinar su eficacia en el tratamiento del cáncer.

Ejemplos de ácidos nucleicos que codifican endoplasmina (Grp94) incluyen, sin carácter limitativo:Números de registro GENBANK® NM_003299, BC066656 (Homo sapiens); NM_011631 (Mus musculus); NM_001045763: (Xenopus (Silurana) tropicalis); NM_214103 (Sus scrofa) NM_98210 (Danio rerio); NM_001012197 (Rattus norvegicus); NM_001134101: Pongo abelii; NM_001003327 (Canis lupus familiaris) proteína de choque térmico 90 kDa beta (Grp94); NM_204289 (Gallus gallus).

Secuencias de control de expresión:las secuencias de ácido nucleico que regulan la expresión de una secuencia de ácido nucleico heteróloga a la que están unidas de forma funcional.Las secuencias de control de expresión están unidas de forma funcional a una secuencia de ácido nucleico cuando las secuencias de control de expresión controlan y regulan la transcripción y, según sea apropiado, la traducción de la secuencia de ácido nucleico.Por tanto, las secuencias de control de expresión pueden incluir promotores, potenciadores, terminadores de la transcripción apropiados, un codón de inicio (es decir, ATG) delante del gen que codifica la proteína, la señal de corte y empalme para los intrones, el mantenimiento del marco de lectura correcto de ese gen para permitir la traducción apropiada del ARNm, y codones de parada.Se pretende que la expresión «secuencias de control» incluya, como mínimo, los componentes cuya presencia puede influir en la expresión, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, como por ejemplo secuencias líder y secuencias de elementos de fusión.Las secuencias de control de la expresión pueden incluir un promotor.

Un promotor es una secuencia mínima suficiente para dirigir la transcripción.También se incluyen aquellos elementos promotores que son suficientes para hacer que la expresión del gen dependiente de promotor sea controlable de forma específica de tipo celular, específica de tejido, o inducible por señales o agentes externos; dichos elementos pueden estar localizados en las regiones 5' o 3' del gen.Se incluyen promotores tanto constitutivos como inducibles (véase por ejemplo Bitter et al., Methods in Enzymology 153:516-544, 1987).Por ejemplo, cuando se clona en sistemas bacterianos, pueden usarse promotores inducibles tales como pL del bacteriófago lambda, plac, ptrp, ptac (promotor híbrido ptrp-lac) y similares.En una realización, cuando se clona en sistemas celulares de mamífero, pueden usarse promotores derivados del genoma de células de mamífero (tales como el promotor de la

metalotioneína) o de virus de mamífero (tales como la repetición terminal larga de retrovirus; el promotor tardío de adenovirus; el promotor 7.5K del virus vaccinia).También pueden usarse promotores producidos por ADN recombinante o técnicas sintéticas para proporcionar la transcripción de las secuencias de ácido nucleico.

Expresado:traducción de un ácido nucleico a una proteína.Las proteínas pueden ser expresadas y mantenerse intracelulares, convertirse en un componente de la membrana de la superficie de la célula o ser segregadas en la matriz o el medio extracelular.

Región marco:secuencias de aminoácidos interpuestas entre las CDR.Las regiones marco incluyen regiones marco ligeras variables y pesadas variables.Las regiones marco sirven para mantener las CDR en una orientación apropiada para la unión al antígeno.

Glioma:un tumor compuesto por células gliales en cualquier estadio de desarrollo.

Los gliomas incluyen todas las neoplasias intrínsecas del cerebro y de la médula espinal, tales como astrocitomas, ependimomas y oligodendrogliomas.Los gliomas «de bajo grado» están bien diferenciados (no anaplásicos); son benignos y auguran un mejor pronóstico para el paciente.Los gliomas «de alto grado» son indiferenciados o anaplásicos; son malignos y tienen un peor pronóstico.

Glicosilación:la unión covalente de un carbohidrato a una proteína, por ejemplo un antígeno.La glicosilación incluye la N-glicosilación, O-glicosilación y C-glicosilación.

Respuesta HAMA (anticuerpo antimurino humano):una respuesta inmunitaria en un sujeto humano a las regiones variable y constante de un anticuerpo murino que ha sido administrado al paciente.La administración repetida de anticuerpos puede dar lugar a un aumento de la tasa de eliminación del anticuerpo del suero del paciente y también puede provocar reacciones alérgicas en el paciente.

Células hospedadoras:Células en las que puede propagarse un vector y expresarse su ADN.La célula puede ser procariota o eucariota.El término también incluye cualquier descendencia de la célula hospedadora del sujeto.Se entiende que toda la descendencia puede no ser idéntica a la célula precursora ya que pueden producirse mutaciones durante la replicación.Sin embargo, dicha descendencia se incluye cuando se usa la expresión «célula hospedadora».

Respuesta inmunitaria:una respuesta de una célula del sistema inmunitario, como por ejemplo una célula B, célula T o monocito, a un estímulo.En una realización, la respuesta es específica para un antígeno concreto (una «respuesta antigenoespecífica»).En una realización, una respuesta inmunitaria es una respuesta de células T, tal como una respuesta CD4+ o una respuesta CD8+.En otra realización, la respuesta es una respuesta de células B, y provoca la producción de anticuerpos específicos.

Inmunoconjugado:un enlace covalente de una molécula efectora a un anticuerpo o a un fragmento funcional de este, que se une específicamente a un antígeno de interés, tal como endoplasma humano.La molécula efectora puede ser una etiqueta detectable, una inmunotoxina, una citoquina o una quimiocina.Ejemplos específicos no limitativos de toxinas incluyen abrina, ricina, exotoxina de Pseudomonas (PE, tales como PE35, PE37, PE38 y PE40), toxina de la difteria (DT), toxina botulínica o sus toxinas modificadas u otros agentes tóxicos que inhiben directa o indirectamente el crecimiento celular o matan células.Por ejemplo, PE y DT son compuestos altamente tóxicos que típicamente provocan la muerte por toxicidad hepática.Sin embargo, es posible modificar PE y DT para crear una forma para su uso como inmunotoxina, eliminando el componente de direccionamiento nativo de la toxina (por ejemplo, el dominio la de PE y la cadena B de DT) y sustituyéndolo por una fracción de direccionamiento diferente, como por ejemplo un anticuerpo.Una «molécula quimérica» es una fracción de direccionamiento, por ejemplo un ligando o un anticuerpo, conjugado (acoplado) con una molécula efectora.El término «conjugado» o «enlazado» se refiere a convertir dos polipéptidos en una molécula polipéptida contigua.En una realización, un anticuerpo se une a una molécula efectora.En otra realización, un anticuerpo unido a una molécula efectora se une además a un lípido u otra molécula (a una proteína o péptido) para incrementar su semivida en el organismo.El enlace puede tener lugar por medios químicos o recombinantes.En una realización, el enlace es químico, donde una reacción entre la fracción del anticuerpo y la molécula efectora ha provocado la formación de un enlace covalente entre las dos moléculas para formar una sola molécula.Opcionalmente se puede incluir un enlazador péptido (secuencia peptídica corta) entre el anticuerpo y la molécula efectora.Dado que los inmunoconjugados fueron preparados originalmente a partir de dos moléculas con funcionalidades separadas, como un anticuerpo y una molécula efectora, en ocasiones son denominados también «moléculas quiméricas».A los efectos de la presente, el término «molécula quimérica» se refiere a una fracción de direccionamiento, por ejemplo un ligando o un anticuerpo, conjugado (acoplado) con una molécula efectora.

Péptido inmunogénico:un péptido que comprende un motivo específico de alelo u otra secuencia, por ejemplo una repetición de terminal N, de modo que el péptido se una a una molécula MHC e induzca una respuesta de linfocitos T citotóxicos («CTL») o una respuesta de células B (por ejemplo, producción de anticuerpos) contra el antígeno del que se obtiene el péptido inmunogénico.

En una realización, los péptidos inmunogénicos se identifican usando motivos de secuencia u otros métodos, tales como redes neurales o determinaciones polinomiales, conocidos en la técnica. Típicamente, se usan algoritmos para determinar el «umbral de unión» de péptidos para seleccionar aquellos con valores que les otorguen una elevada

probabilidad de unión a una cierta afinidad y serán inmunogénicos.Los algoritmos se basan en los efectos sobre la unión a MHC de un aminoácido concreto en una posición concreta, los efectos sobre la unión al anticuerpo de un aminoácido concreto en una posición concreta, o los efectos sobre la unión de una sustitución concreta en un péptido que contiene un motivo.En el contexto de un péptido inmunogénico, un «residuo conservado» es uno que aparece en una frecuencia significativamente mayor que la que se esperaría por distribución aleatoria en una posición concreta en un péptido.En una realización, un residuo conservado es uno donde la estructura MHC puede proporcionar un punto de contacto con el péptido inmunogénico.En un ejemplo específico no limitativo, un polipéptido inmunogénico incluye una región de endoplasmina o un fragmento de la misma, donde el polipéptido es expresado en la superficie de una célula hospedadora que expresa el polipéptido de endoplasmina completo.

Composición inmunogénica:Una composición que comprende un polipéptido por ejemplo un polipéptido de endoplasmina, que induce una respuesta CTL medible contra células que expresan polipéptido de endoplasmina, o induce una respuesta de células B medible (como la producción de anticuerpos) contra un polipéptido de endoplasmina.Una composición inmunogénica también puede inducir la producción de citoquina.Asimismo, se refiere a ácidos nucleicos aislados que codifican un polipéptido de endoplasmina que puede utilizarse para expresar el polipéptido de endoplasmina (y, por consiguiente, puede utilizarse para provocar una respuesta inmunitaria contra este polipéptido).Para uso *in vitro*, una composición inmunogénica puede constar de la proteína aislada o del epítopo péptido.Para uso *in vivo*, la composición inmunogénica típicamente comprenderá la proteína o el péptido inmunogénico en vehículos farmacéuticamente aceptables, y/u otros agentes.Todo péptido concreto, por ejemplo un polipéptido de endoplasmina o un ácido nucleico que codifica el polipéptido, puede ensayarse fácilmente en cuanto a su capacidad para inducir una respuesta CTL o de células B mediante ensayos reconocidos en la técnica.Las composiciones inmunogénicas pueden incluir adyuvantes, que son bien conocidos por los expertosen la técnica.

Condiciones inmunológicamente reactivas:incluye la referencia a condiciones que permiten que un anticuerpo activado contra un epítopo particular se una a ese epítopo en un grado detectablemente mayor que la unión a sustancialmente todos los demás epítopos y/o excluyendo esta en un grado sustancial.Las condiciones inmunológicamente reactivas son dependientes del formato de la reacción de unión del anticuerpo y típicamente son las que se utilizan en protocolos de inmunoensayo o en condiciones que se encuentran *in vivo*.Véase Harlow & Lane, más arriba, para obtener una descripción de los formatos y las condiciones de los inmunoensayos.Las condiciones inmunológicamente reactivas empleadas en los métodos son «condiciones fisiológicas» que incluyen la referencia a condiciones (como temperatura, osmolaridad y pH) que son típicas en el interior de un mamífero vivo o de una célula de mamífero.A pesar de que se reconoce que algunos órganos están sujetos a condiciones extremas, por lo general el entorno intracelular y en el interior del organismo tiene aproximadamente un pH 7 (es decir, entre un pH 6,0 y un pH 8,0, más típicamente entre un pH 6,5 y un pH 7,5), contiene agua como disolvente predominante y existe a una temperatura superior a 0 °C e inferior a 50 °C. La osmolaridad se encuentra dentro del rango que favorece la viabilidad y la proliferación celular.

Aislado:un componente biológico «aislado», por ejemplo, un ácido nucleico, una proteína (incluyendo anticuerpos) u orgánulo se ha separado sustancialmente o purificado de otros componentes biológicos en el entorno (por ejemplo una célula) en el que el componente se da de forma natural, es decir, otro ADN y ARN cromosómico y extracromosómico, proteínas y orgánulos.Los ácidos nucleicos y las proteínas que han sido «aislados» incluyen ácidos nucleicos y proteínas purificados por métodos de purificación estándar.El término también engloba ácidos nucleicos y proteínas preparados mediante expresión recombinante en una célula hospedadora, así como ácidos nucleicos sintetizados químicamente.

Etiqueta:un compuesto o composición detectable que se conjuga directa o indirectamente con otra molécula, por ejemplo un anticuerpo o una proteína, para facilitar la detección de esa molécula.Ejemplos específicos no limitativos de etiquetas incluyen marcadores fluorescentes, enlaces enzimáticos e isótopos radiactivos.En un ejemplo, un «anticuerpo etiquetado» se refiere a la incorporación de otra molécula en el anticuerpo.Por ejemplo, la etiqueta es un marcador detectable, como la incorporación de un aminoácido radiomarcado o la unión a un polipéptido de fracciones de biotinilo que puede detectarse mediante avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina conteniendo un marcador fluorescente o actividad enzimática que puede detectarse empleando métodos ópticos o colorimétricos).En la técnica se conocen y se pueden utilizar varios métodos para el etiquetado de polipéptidos y glicoproteínas.Ejemplos de etiquetas para polipéptidos incluyen, pero sin limitación:radioisótopos o radionucleótidos (como ^{35}S, ^{11}C, ^{13}N, $^{15}0$,^{18}F, ^{19}F, ^{99m}Tc, $^{131}1$,^{3}H, ^{14}C, ^{15}N, ^{90}Y, ^{99}**TC,** ^{111}In e ^{125}I), etiquetas fluorescentes (como isotiocianato de fluoresceína (FITC), rodamina, fósforos lantánidos), etiquetas enzimáticas (como peroxidasa de rábano silvestre, beta-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), marcadores quimioluminiscentes, grupos biotinilos, epítopos polipéptidos predeterminados reconocidos por un reporter secundario (por ejemplo, secuencias de par de cremalleras de leucina, lugares de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metal, marcadores epitópicos) o agentes magnéticos, como quelatos de gadolinio.En algunas realizaciones, las etiquetas están sujetas por brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el impedimento estérico potencial.

Enlazador:en algunos casos, un enlazador es un péptido dentro de un fragmento de unión de un anticuerpo (como un fragmento Fv) que sirve para unir indirectamente la cadena pesada variable a la cadena ligera variable.«Enlazador» también se puede referir a un péptido que sirve para unir una fracción de direccionamiento , como un anticuerpo, a una molécula efectora, como una citotoxina o una etiqueta detectable.

Los términos «conjugar» «unir», «conectar» o «enlazar» se refieren a convertir dos polipéptidos en una molécula

polipéptida contigua, o unir de forma covalente un radioisótopo u otra molécula a un polipéptido, como un Fv monocatenario.En el contexto específico, los términos se refieren también a la unión de un ligando, como una fracción de anticuerpo, a una molécula efectora.El enlace puede tener lugar por medios químicos o recombinantes.«Medios químicos» se refiere a una reacción entre la fracción del anticuerpo y la molécula efectora, de forma que se haya formado un enlace covalente entre las dos moléculas para formar una sola molécula.

Mamífero:este término incluye a los mamíferos tanto humanos como no humanos.Similarmente, el término «sujeto» incluye tanto a humanos como a sujetos de veterinaria.

Complejo principal de histocompatibilidad (MHC):denominación genérica que pretende abarcar los sistemas de antígeno de histocompatibilidad descritos en diferentes especies, incluyendo los antígenos de leucocitos humanos («HLA»).El término «motivo» se refiere al patrón de residuos en un péptido de longitud definida, habitualmente de aproximadamente 8 a aproximadamente 11 aminoácidos, que es reconocido por un alelo MHC concreto.Típicamente, los motivos péptidos son diferentes para cada alelo MHC y difieren en el patrón de los residuos altamente conservados y los residuos de unión negativa.

Melanoma:una forma de cáncer que se origina en los melanocitos (células que producen el pigmento melanina).Los melanocitos están presentes principalmente en la piel, pero también están presentes en las vísceras y en el ojo.El melanoma en la piel incluye el melanoma de extensión superficial, el melanoma nodular, el melanoma lentiginoso acral y lentigo maligno (melanoma).Cualquiera de los tipos mencionados puede producir melanina o puede ser amelanótico.Similarmente, cualquier subtipo puede presentar desmoplasia (reacción fibrosa densa con neurotropismo), que es un marcador de comportamiento agresivo y tendencia a la recurrencia local.Otros melanomas incluyen el de sarcoma de células claras, el melanoma mucoso y el melanoma uveal.

Las características que afectan al pronóstico son el grosor del tumor en milímetros (profundidad de Breslow), profundidad en relación con las estructuras de la piel (nivel de Clark), tipo de melanoma, presencia de ulceración, presencia de invasión linfática/perineural, presencia de linfocitos infiltradores de tumores (si están presentes, el pronóstico es mejor), ubicación de la lesión, presencia de lesiones satélite y presencia de metástasis regional o distante.Si los melanomas se han propagado a los ganglios linfáticos, uno de los principales factores es el número de ganglios malignos.También es importante el grado de malignidad dentro de un ganglio; las micrometástasis en las cuales la malignidad es solo microscópica tienen un pronóstico más favorable que las macrometástasis.Si existe metástasis distante, el índice de supervivencia a cinco años es inferior al 10 por ciento; el promedio de supervivencia se sitúa entre 6 y 12 meses.

Las metástasis en piel y pulmones tienen un mejor pronóstico.Las metástasis en cerebro, hueso e hígado están asociadas a un pronóstico peor.

El melanoma puede dividirse en los siguientes estadios:

Estadio 0:melanoma in situ (nivel de Clark I), supervivencia del 100 %

Estadios I/II:melanoma invasivo, supervivencia del 85-95 %

T1a:menos de 1,00 mm primario, sin ulceración, nivel de Clark II-III

T1b:menos de 1,00 mm primario, con ulceración o nivel de Clark IV-V

T2a:1,00-2,00 mm primario, sin ulceración

Estadio II:melanoma de alto riesgo, supervivencia del 40-85 %

T2b: 1,00-2,00 mm primario, con ulceración

T3a:2,00-4,00 mm primario, sin ulceración

T3b:2,00-4,00 mm primario, con ulceración

T4a:4,00 mm o superior primario, sin ulceración

T4b:4,00 mm o superior primario, con ulceración

Estadio III:metástasis regional, supervivencia del 25-60 %

N1:un solo ganglio linfático positivo

N2:2-3 ganglios linfáticos positivos O metástasis regional en la piel/en tránsito

N3:4 ganglios linfáticos positivos O metástasis en ganglio linfático y regional en la piel/en tránsito

Estadio IV:metástasis distante, supervivencia del 9-15 %

M1a: metástasis distante en la piel, lactato deshidrogenasa normal (LDH)

M2b:metástasis en el pulmón, LDH normal

M1c:otras metástasis distantes O cualquier metástasis distante con LDH elevada

Anticuerpo monoclonal:un anticuerpo producido por un único clon de linfocitos B, por una célula en la que se han transfectado los genes de cadena ligera y pesada de un único anticuerpo o por un fago específico en un anticuerpo en una biblioteca de anticuerpos, de modo que el anticuerpo monoclonal incluye un conjunto definido de CDR y se une específicamente a un antígeno diana de interés.Los anticuerpos monoclonales se producen por los métodos conocidos por los expertosen la técnica, por ejemplo (pero sin carácter limitativo) produciendo células productoras de anticuerpos híbridas a partir de la fusión de células de mieloma con células inmunitarias del bazo o por selección de una biblioteca de expresión de secuencias de anticuerpos en fagos.Los anticuerpos monoclonales incluyen anticuerpos monoclonales humanizados y totalmente humanos.A efectos del presente documento, un fragmento funcional de un anticuerpo monoclonal incluye fragmentos de anticuerpo que se unen específicamente a la proteína diana (unión al antígeno) para el anticuerpo monoclonal, como por ejemplo, pero sin limitarse a ellos, scFv, Fv, dsRv o Fab.Los anticuerpos monoclonales se unen específicamente a un epítopo antigénico, por ejemplo un epítopo glicosilado.Los anticuerpos monoclonales incluyen anticuerpos bifuncionales, donde uno o más conjuntos de CDR se unen específicamente a un antígeno diana, como endoplasmina y un Fc con función efectora mejorada, y otros anticuerpos modificados con glicol.

Neoplasia, malignidad, cáncer o tumor:el resultado del crecimiento anormal e incontrolado de células.Los términos neoplasia, malignidad, cáncer y tumor se utilizan a menudo indistintamente.El volumen de un tumor en un individuo es la «carga tumoral», que puede medirse como el número, volumen o peso del tumor.Un tumor que no metastatiza se denomina «benigno».Un tumor que invade el tejido circundante y/o puede metastatizar se denomina «maligno».Ejemplos de tumores hematológicos incluyen leucemias, incluyendo las leucemias agudas (tales como leucemia aguda positiva para 1q23, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda, leucemia mielógena aguda y leucemiamieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia), leucemias crónicas (tales como leucemia mielocítica (granulocítica) crónica, leucemia mielógenacrónica y leucemia linfocítica crónica), policitemia vera, linfoma, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin (formas indolente y de alto grado), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de cadena pesada, síndrome mielodisplásico, leucemia de células pilosas y mielodisplasia.

Algunos ejemplos de tumores sólidos, como sarcomas y carcinomas, incluyen fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico y otros sarcomas, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiosarcoma, rabdomiosarcoma, carcinoma de colon, neoplasia maligna linfoide, cáncer de páncreas, cáncer de mama (incluyendo carcinoma de mama basal, carcinoma ductal y carcinoma de mama lobular), cáncer de pulmón, cáncer de ovarios, cáncer de próstata, carcinoma hepatocelular, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma medular de tiroides, carcinoma papilar de tiroides, feocromocitoma, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinoma papilar, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, tumor de Wilms, cáncer cervical, tumor testicular, seminoma, carcinoma de vejiga y tumores CNS (como glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, menangioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma).

En algunos ejemplos, un tumor es un melanoma, un cáncer de mama, un cáncer renal, un glioma o un carcinoma de células escamosas, como por ejemplo cáncer de cabeza y cuello.

Ácido nucleico:un polímero compuesto por unidades nucleótidas (ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, variantes estructurales existentes en la naturaleza relacionadas y sus análogos sintéticos no existentes en la naturaleza) unidas por enlaces fosfodiéster, variantes estructurales existentes en la naturaleza relacionadas y sus análogos sintéticos no existentes en la naturaleza.Así pues, el término incluye polímeros nucleótidos en los que los nucleótidos y los enlaces entre ellos incluyen análogos sintéticos no existentes en la naturaleza, tales como, por ejemplo y sin carácter limitativo, fosforotioatos, fosforamidatos, metilfosfonatos, metilfosfonatos quirales, 2-O-metil ribonucleótidos, ácidos péptido-nucleicos (PNA) y similares.Tales polinucleótidos pueden sintetizarse, por ejemplo, utilizando un sintetizador de ADN automatizado.El término «oligonucleótido» se refiere típicamente a polinucleótidos cortos, generalmente de tamaño no superior a aproximadamente 50 nucleótidos.Se entenderá que cuando una secuencia de nucleótidos se represente por una secuencia de ADN (es decir, A, T, G, C), esto también incluye una secuencia de ARN (es decir, A, U, G, C) en la que «U» sustituye a «T».

En la presente se utiliza la notación convencional para describir secuencias de nucleótidos:el extremo izquierdo de una secuencia de nucleótidos de cadena simple es el extremo 5'; la dirección a la izquierda de una secuencia de nucleótidos de doble cadena se denomina dirección 5'.La dirección de adición 5' a 3' de nucleótidos a transcritos incipientes de ARN se conoce como dirección de transcripción.La cadena de ADN que tiene la misma secuencia que un ARNm se denomina «cadena codificadora»; las secuencias en la cadena de ADN que tiene la misma secuencia que un ARNm transcrito desde dicho ADN y que están ubicadas 5' al extremo 5' del transcritos de ARN se denominan «secuencias ascendentes»; las secuencias en la cadena de ADN que tiene la misma secuencia que el ARN y que están ubicadas 3' al extremo 3' del transcrito de ARN codificador se denominan «secuencias descendentes».

«ADNc» se refiere a un ADN que es complementario o idéntico a un ARNm, ya sea en forma de cadena sencilla o de doble cadena.

«Codificador» se refiere a la propiedad inherente de secuencias específicas de nucleótidos en un polinucleótido, como por ejemplo un gen, un ADNc o un ARNm, para servir como plantillas para la síntesis de otros polímeros y

macromoléculas en procesos biológicos que tienen una secuencia de nucleótidos definida (es decir, ARNr, ARNt y ARNm) o una secuencia definida de aminoácidos y las propiedades biológicas resultantes de ello.Así pues, un gen codifica una proteína si la transcripción y la traducción del ARNm producido por ese gen produce la proteína en una célula o en otro sistema biológico.

Tanto la cadena codificadora, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia de ARNm y habitualmente se proporciona en listas de secuencias, como la cadena no codificadora, utilizada como plantilla para la transcripción de un gen o ADNc pueden ser denominadas como codificadorade la proteína u otro producto de ese gen o ADNc.Salvo que se especifique otra cosa, una «secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos» incluye todas las secuencias de nucleótidos que son versiones degeneradas unas de otras y codifican la misma secuencia de aminoácidos.Las secuencias de nucleótidos que codifican proteínas y ARN pueden incluir intrones.

«Ácido nucleico recombinante» se refiere a un ácido nucleico que tiene secuencias de nucleótidos que no están unidas entre sí de forma natural.Esto incluye vectores de ácido nucleico que comprenden un ácido nucleico amplificado o ensamblado que puede utilizarse para transformar una célula hospedadora adecuada.Una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico recombinante se denomina «célula hospedadora recombinante».Posteriormente, el gen se expresa en la célula hospedadora recombinante para producir, por ejemplo, un «polipéptido recombinante».Un ácido nucleico recombinante puede desempeñar también una función no codificadora (como promotor, origen de la replicación, lugar de unión de ribosomas, etc.).

Una primera secuencia es un «antisentido» con respecto a una segunda secuencia si un polinucleótido cuya secuencia es la primera secuencia hibrida específicamente con un polinucleótido cuya secuencia es la segunda secuencia.

Los términos utilizados para describir relaciones entre dos o más secuencias de nucleótidos o secuencias de aminoácidos incluyen «secuencia de referencia», «seleccionada de» «ventana de comparación», «idéntica», «porcentaje de identidad de secuencia», «sustancialmente idéntica», «complementaria» y «sustancialmente complementaria».

Para la comparación de secuencias de ácidos nucleicos, típicamente una secuencia actúa como secuencia de referencia con la cual se comparan las secuencias de prueba.Al utilizar un algoritmo de comparación de secuencias, se introducen en un ordenador secuencias de prueba y de referencia, se designan coordenadas de subsecuencia si fuera necesario y se definen los parámetros del programa del algoritmo de secuencias.Se utilizan los parámetros del programa por defecto.Los métodos de alineamiento de secuencias para la comparación son bien conocidos en la técnica. El alineamiento óptimo de secuencias para la comparación puede realizarse, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482, 1981, mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443, 1970, mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988, mediante implementaciones computerizadas de dichos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el paquete de software para genética Wisconsin, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) o mediante alineamiento manual e inspección visual (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. 1995 suplemento)).

Un ejemplo de un algoritmo útil es PILEUP.PILEUP utiliza una simplificación del método de alineamiento progresivo de Feng & Doolittle, J. Mol. Evol. 35:351-360, 1987. El método utilizado es similar al método descrito por Higgins & Sharp, CABIOS 5:151-153, 1989. Utilizando PILEUP, se compara una secuencia de referencia con otras secuencias de prueba para determinar el porcentaje de la relación de identidad de las secuencias usando los siguientes parámetros: peso del hueco por defecto (3,00), peso de la longitud del hueco por defecto (0,10), y huecos de los extremos ponderados.PILEUP puede obtenerse del paquete de software de análisis de secuencias GCG, por ejemplo la versión 7.0 (Devereaux et al., Nuc. Acids Res. 12:387-395,1984).

Otro ejemplo de algoritmos adecuados para determinar el porcentaje de identidad de la secuencia y la similitud de la secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que son descritos por Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990 y Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1977.El software para realizar análisis BLAST está disponible al público a través del Centro Nacional para Información Biotecnológica (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/).El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) utiliza de forma predeterminada una longitud de palabra (W) de 11, alineamientos (B) de 50, una expectativa (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas cadenas.El programa BLASTP (para secuencias de aminoácidos) utiliza de forma predeterminada una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10 y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915, 1989).

Oligonucleótido:una secuencia polinucleotídica lineal con una longitud de hasta aproximadamente 100 bases nucleotídicas.

Marco abierto de lectura (ORF):una serie de tripletes de nucleótidos (codones) que codifican para aminoácidos sin codones de terminación.Habitualmente, estas secuencias son traducibles a un péptido.

Unida operativamente:una primera secuencia de ácido nucleico está unida operativamente a una segunda secuencia de ácido nucleico cuando la primera secuencia de ácido nucleico está dispuesta en una relación funcional con la segunda secuencia de ácido nucleico.Por ejemplo, un promotor, como pueda ser un promotor heterólogo, está unido

operativamente a una secuencia codificadora si el promotor afecta a la transcripción o la expresión de la secuencia codificadora.Por regla general, las secuencias de ADN unidas operativamente son contiguas y, allí donde sea necesario para unir dos regiones codificadoras de proteína, se encuentran en el mismo marco de lectura.

Agente farmacéutico:un compuesto o una composición química capaz de inducir un efecto terapéutico o profiláctico deseado al ser administrado correctamente a un sujeto o una célula.

Vehículos farmacéuticamente aceptables:los vehículos farmacéuticamente aceptables de uso son convencionales.Remington's Pharmaceutical Sciences,por E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15ª edición (1975), describe composiciones y formulaciones apropiadas para la liberación farmacéutica de las proteínas de fusión aquí divulgadas.

En general, la naturaleza del vehículo dependerá del modo concreto de administración que se utilice.Por ejemplo, las formulaciones parenterales suelen comprender fluidos inyectables que incluyen como vehículo fluidos farmacéutica y fisiológicamente aceptables tales como agua, suero fisiológico, soluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol o similares.Para composiciones sólidas (por ejemplo, en forma de polvo, píldora, tableta o cápsula), los vehículos sólidos no tóxicos convencionales pueden incluir, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón o estearato de magnesio.Además de los vehículos biológicamente neutros, las composiciones farmacéuticas a administrar pueden contener pequeñas cantidades de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes y agentes de tamponado de pH y similares, por ejemplo acetato de sodio o monolaurato de sorbitano.

Polinucleótido:el término polinucleótido o secuencia de ácido nucleico se refiere a una forma polimérica de nucleótido con una longitud mínima de 10 bases.Un polinucleótido recombinante incluye un polinucleótido que no es inmediatamente contiguo a ambas secuencias codificadoras a las cuales es inmediatamente contiguo (una en el extremo 5' y una en el extremo 3') en el genoma natural del organismo del que se deriva.Por consiguiente, el término incluye, por ejemplo, un ADN recombinante que se incorpora a un vector, en un plásmido o virus que se replica de forma autónoma o en el ADN genómico de una procariota o eucariota, o que existe como molécula separada (por ejemplo, un ADNc) independiente de otras secuencias.Los nucleótidos pueden ser ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos o formas modificadas de ambos nucleótidos.El término incluye formas de ADN de cadena sencilla y de doble cadena.

Polipéptido:cualquier cadena de aminoácidos, independientemente de su longitud o modificación posttraduccional (por ejemplo, glicosilación o fosforilización).En una realización, el polipéptido es el polipéptido de endoplasmina.Un «residuo» se refiere a un aminoácido o a un mimético de aminoácido incorporado a un polipéptido por un enlace amida o un mimético de enlace amida.Un polipéptido tiene un extremo terminal amino (terminal N) y un extremo terminal carboxilo (terminal C).

Prevenir, tratar o mitigar una enfermedad:«prevenir» una enfermedad se refiere a inhibir el pleno desarrollo de una enfermedad.«Tratar» se refiere a una intervención terapéutica que mitiga un signo o síntoma de una enfermedad o un estado patológico una vez que ha empezado a desarrollarse, como por ejemplo la reducción de la carga tumoral o la reducción del número y el tamaño de metástasis.«Mitigar» se refiere a la reducción del número o la gravedad de los signos o síntomas de una enfermedad, como el cáncer.

Sondas y cebadores:una sonda comprende un ácido nucleico aislado ligado a una molécula marcadora o informadora detectable.Los cebadores son ácidos nucleicos cortos, preferiblemente oligonucleótidos de ADN, con una longitud de 15 nucleótidos o más.Los cebadores pueden emparejarse con una cadena de ADN diana complementaria mediante hibridación de ácido nucleico para formar un híbrido entre el cebador y la cadena de ADN diana, y después extenderse a lo largo de la cadena de ADN diana mediante una enzima ADN polimerasa.Los pares de cebadores se pueden utilizar para la amplificación de una secuencia de ácido nucleico, por ejemplo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) u otros métodos de amplificación de ácido nucleico conocidos en la técnica. Un experto en la técnica apreciará que la especificidad de una sonda o de un cebador particular se incrementa a medida que crece su longitud.Así, por ejemplo, un cebador de 20 nucleótidos consecutivos se emparejará con una diana con una mayor especificidad que un cebador correspondiente de solo 15 nucleótidos.Así, a fin de lograr una mayor especificidad, se pueden seleccionar sondas y cebadores que comprendan como mínimo 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más nucleótidos consecutivos.

Promotor:un promotor es una serie de secuencias de control de ácido nucleico que dirige la transcripción de un ácido nucleico.Un promotor incluye las secuencias de ácido nucleico necesarias cerca del lugar de inicio de la transcripción, tal como un elemento TATA en el caso de un promotor de polimerasa tipo II.Un promotor también puede incluir opcionalmente elementos potenciadores o supresores distales que se pueden localizar tan lejos como varios miles de pares de bases del lugar de inicio de la transcripción.Se incluyen promotores tanto constitutivos como inducibles (véase por ejemplo Bitter et al., Methods in Enzymology 153:516-544, 1987).

Ejemplos específicos no limitativos de promotores incluyen promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ej. el promotor de la metalotioneína) o de virus de mamífero (por ej. la repetición terminal larga de retrovirus, el promotor tardío de adenovirus, el promotor del virus vaccinia 7.5K).También se pueden utilizar promotores producidos mediante ADN recombinante o técnicas sintéticas.Un polinucleótido puede insertarse en un

vector de expresión que contiene una secuencia promotora que favorece la transcripción eficiente de la secuencia genética insertada del hospedador.Típicamente, el vector de expresión contiene un origen de replicación, un promotor, así como secuencias de ácido nucleico específicas que posibilitan la selección fenotípica de las células transformadas.

Purificado:el término «purificado» no requiere pureza absoluta, sino que debe entenderse como término relativo.Así, por ejemplo, un ácido nucleico purificado es aquel en el que el ácido nucleico está más enriquecido de lo que el ácido nucleico lo está en su entorno natural dentro de una célula.De forma similar, una preparación peptídica purificada es aquella en la que el péptido o la proteína está más enriquecido de lo que el péptido o la proteína lo está en su entorno natural dentro de una célula.Purificación sustancial denota la purificación respecto de otras proteínas o componentes celulares.En una realización, se purifica (o aísla) una preparación de tal manera que la proteína o el péptido represente como mínimo el 50 % (por ejemplo, pero sin carácter limitativo, el 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 %) del contenido total de péptido o de proteína de la preparación.Los polipéptidos de endoplasmina aquí divulgados pueden ser purificados (y/o sintetizados) mediante cualquiera de los métodos conocidos en la técnica (véase p. ej., Guide to Protein Purification, ed. Deutscher, Melh. Enzymol. 185, Academic Press, San Diego, 1990; y Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer Verlag, Nueva York, 1982).

Recombinante:un ácido nucleico recombinante es aquel que tiene una secuencia que no se produce de forma natural o tiene una secuencia formada mediante una combinación artificial de dos segmentos de secuencia normalmente separados.Esta combinación artificial se logra a menudo por síntesis química o, más habitualmente, por la manipulación artificial de segmentos aislados de ácidos nucleicos, por ejemplo, con técnicas de ingeniería genética.

Toxinas recombinantes:proteínas quiméricas en las que una fracción de direccionamiento a la célula está fusionada con una toxina (Pastan etal., Science, 254:1173-1177, 1991).Si la fracción de direccionamiento a la célula es la porción Fv de un anticuerpo, la molécula se denomina inmunotoxina recombinante (Chaudhary et al., Nature, 339:394-397, 1989).La fracción de toxina está alterada genéticamente de modo que no pueda unirse al receptor de toxinas presente en la mayoría de células normales.Las inmunotoxinas recombinantes matan selectivamente células que son reconocidas por el dominio de unión al antígeno.Estas toxinas e inmunotoxinas recombinantes pueden utilizarse para tratar el cáncer, por ejemplo, un cáncer en el que se expresa endoplasmina.

Hibridar selectivamente:hibridación en condiciones moderada o altamente restrictivas, que excluye las secuencias de nucleótidos no relacionadas.

En las reacciones de hibridación de ácido nucleico, las condiciones aplicadas para alcanzar un nivel de restricción concreto variarán dependiendo de la naturaleza de los ácidos nucleicos hibridados.Por ejemplo, la longitud, el grado de complementariedad, la composición de la secuencia de nucleótidos (p. ej., contenido GC frente a contenido AT) y el tipo de ácido nucleico (p. ej., ARN frente a ADN) de las regiones hibridantes de los ácidos nucleicos pueden considerarse al seleccionar las condiciones de hibridación.Una consideración adicional es si uno de los ácidos nucleicos está inmovilizado, por ejemplo, en un filtro.

Un ejemplo específico no limitativo de condiciones restrictivas progresivamente más estrictas es el siguiente:2 x SSC/0,1 % SDS a aproximadamente temperatura ambiente (condiciones de hibridación); 0,2 x SSC/0,1 % SDS a aproximadamente temperatura ambiente (condiciones de baja restrictividad); 0,2 x SSC/0,1 % SDS a aproximadamente 42 °C (condiciones de restrictividad moderada) y 0,1 x SSC a aproximadamente 68 °C (condiciones de alta restrictividad).Un experto en la técnica puede determinar fácilmente variaciones de estas condiciones (p. ej., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., vol. 1-3, ed. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989). El lavado puede llevarse a cabo aplicando solo una de estas condiciones, p. ej., condiciones de alta restrictividad, o bien puede aplicarse cada una de las soluciones, p. ej., durante 10-15 minutos cada una, en el orden anteriormente expuesto, repitiendo uno o todos los pasos mencionados.Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, las condiciones óptimas variarán dependiendo de la reacción de hibridación concreta implicada, y pueden determinarse empíricamente.

Identidad de secuencias:la similitud entre las secuencias de aminoácidos se expresa en términos de la similitud entre secuencias, también conocida como identidad de secuencias.La identidad de secuencias se mide frecuentemente en términos de porcentaje de identidad (o similitud u homología); cuanto mayor sea el porcentaje, más similares son las dos secuencias.Los homólogos o las variantes de un polipéptido de endoplasmina poseerán un grado relativamente elevado de identidad de secuencias cuando se alinean utilizando métodos estándar.

Los métodos de alineamiento de secuencias para la comparación son bien conocidos en la técnica.

Varios programas y algoritmos de alineamiento se describen en:Smith and Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482, 1981; Needleman and Wunsch,./. Mol. Biol. 48:443, 1970; Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988; Higgins and Sharp, Gene 73:237, 1988; Higgins and Sharp, CABIOS 5:151, 1989; Corpet et al., Nucleic Acids Research 16:10881, 1988; and Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988. Altschul et al., Nature Genet. 6:119, 1994, presenta una consideración detallada de los métodos de alineamiento de secuencias y cálculos de homología.

La herramienta de alineamiento de secuencias NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al./. Mol. Biol. 215:403, 1990) está disponible a través de diversas fuentes, incluyendo el Centro Nacional para

Información Biotecnológica (NCBI, Bethesda, MD) y en Internet, para usar en combinación con los programas de análisis de secuencias blastp, blastn, blastx, tblastn y tblastx.En el sitio web de la NCBI en Internet hay disponible una descripción del método para determinar la identidad de secuencias utilizando este programa.

Los homólogos y las variantes de un polipéptido de endoplasmina se caracterizan típicamente por la posesión de al menos un 75 %, por ejemplo al menos un 80 %, de identidad de secuencia contada a lo largo del alineamiento de longitud completa con la secuencia de aminoácidos de la endoplasmina usando el NCBI Blast 2.0, blastp de huecos ajustado a los parámetros por defecto.Para comparaciones de secuencias de aminoácidos de más de aproximadamente 30 aminoácidos, se emplea la función Blast 2 secuencias usando la matriz por defecto BLOSUM62 ajustada a los parámetros por defecto (la existencia de un hueco tiene una penalización de 11, y un hueco por residuo tiene una penalización de 1).Cuando se alinean péptidos cortos (menos de aproximadamente 30 aminoácidos), el alineamiento debe realizarse usando la función Blast 2 sequences, empleando la matriz PAM30 ajustada a los parámetros por defecto (penalizaciones de apertura de hueco 9, extensión de hueco 1).Proteínas con incluso mayor similitud a las secuencias de referencia mostrarán porcentajes de identidad crecientes cuando se evalúan por este método, tales como al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de identidad de secuencias.Cuando se compara menos de la secuencia completa para determinar la identidad de secuencias, los homólogos y variantes típicamente tendrán al menos un 80 % de identidad de secuencias a lo largo de ventanas cortas de 10-20 aminoácidos, y pueden tener identidades de secuencias de al menos el 85 % o al menos el 90 % o el 95 % dependiendo de su similitud con la secuencia de referencia.Los métodos para determinar la identidad de secuencias sobre dichas ventanas cortas están disponibles en el sitio web del NCBI en Internet.Un experto en la técnica apreciará que estos intervalos de identidad de secuencias se proporcionan meramente a modo de guía; es perfectamente posible que pudieran obtenerse homólogos muy significativos que estén fuera de los intervalos proporcionados.

Agente de unión específico:un agente que se une sustancialmente solo a una diana definida.Por tanto, un agente de unión específica a endoplasmina es un agente que se une sustancialmente a un polipéptido de endoplasmina.En una realización, el agente de unión específico es un anticuerpo monoclonal o policlonal que se une específicamente a la endoplasmina.

Carcinoma de células escamosas:un tipo de cáncer que se origina en las células escamosas (células delgadas y planas que forman la superficie de la piel, los ojos, varios órganos internos, el revestimiento de órganos huecos y conductos de algunas glándulas).El carcinoma de células escamosas también se conoce como carcinoma epidermoide.Un tipo de carcinoma de células escamosas es el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC).El carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello incluye cánceres de la cavidad nasal, los senos, los labios, la boca, las glándulas salivales, la garganta y la laringe.

El HNSCC puede dividirse en los siguientes estadios:

Estadio 0:no existe evidencia de tumor.

Estadio I:el tumor tiene 2 cm o menos en su mayor dimensión; no existe evidencia de afectación de ganglio linfático regional o metástasis distante.

Estadio II:el tumor tiene más de 2 cm pero no más de 4 cm; no existe evidencia de afectación de ganglio linfático regional o metástasis distante.

Estadio III:el tumor tiene más de 4 cm; en algunos casos, el tumor se ha propagado a los ganglios linfáticos; no existe evidencia de metástasis distante.

Estadio IV:el tumor se ha propagado a los ganglios linfáticos; en algunos casos hay metástasis distantes.

Sujeto:organismos vertebrados multicelulares vivos, una categoría que incluye tanto a humanos como a sujetos de veterinaria, incluyendo mamíferos tanto humanos como no humanos.

Célula T:un glóbulo blanco fundamental para la respuesta inmunitaria.Las células T incluyen, sin carácter limitativo, las células T $CD4^+$ y las células T $CD8^+$.Un linfocito T $CD4^+$ es una célula inmunitaria que lleva en su superficie un marcador denominado «cúmulo de diferenciación 4» (CD4).Estas células, a menudo denominadas células T «auxiliares», ayudan a orquestar la respuesta inmunitaria, incluyendo la respuestade los anticuerpos así como las respuestas de células T asesinas.Las células T $CD8^+$ llevan el marcador «clúster de diferenciación 8» (CD8).En una realización, una célula T CD8 es un linfocito Tcitotóxico.En otra realización, una célula CD8 es una célula T supresora.

Cantidad terapéuticamente efectiva:una cantidad de una sustancia específica suficiente para conseguir el efecto deseado en un sujeto tratado.Por ejemplo, puede ser la cantidad necesaria para inhibir o suprimir el crecimiento de un tumor.En una realización, una cantidad terapéuticamente efectiva es la cantidad necesaria para eliminar un tumor o reducir el número o el tamaño de las metástasis.Al administrarla a un sujeto, por regla general se utilizará una dosis que alcanzará concentraciones en el tejido diana (por ejemplo, en tumores) que se ha demostrado que logran un efecto *in vitro*deseado.

Toxina:una molécula que es citotóxica para una célula.Las toxinas incluyen abrina, ricina, exotoxina de Pseudomonas (PE), toxina de la difteria (DT), toxina botulínica, saporina, restrictocina o gelonina, o sus toxinas

modificadas.Por ejemplo, PE y DT son compuestos altamente tóxicos que típicamente provocan la muerte por toxicidad hepática.Sin embargo, es posible modificar PE y DT para crear una forma para el uso como inmunotoxina, eliminando el componente director nativo de la toxina (como el dominio la de PE o la cadena B de DT) y sustituyéndolo por una fracción de direccionamiento diferente, como un anticuerpo.

Transducida:Una célula transducida es una célula en la que se ha introducido una molécula de ácido nucleico empleando técnicas de biología molecular.Tal como se entiende en el presente, el término «transducción» abarca todas las técnicas mediante las cuales se podría introducir una molécula de ácido nucleico en una célula, incluyendo la transfección con vectores víricos, la transformación con vectores plasmídicos y la introducción de ADN desnudo por electroporación, lipofección y aceleración por pistola de partículas.

Vector:una molécula de ácido nucleico que, introducida en una célula hospedadora, produce una célula hospedadora transformada.Un vector puede incluir secuencias de ácido nucleico que le permiten replicarse en una célula hospedadora, como un origen de replicación.Un vector también puede incluir uno o varios genes marcadores seleccionables y otros elementos genéticos conocidos en la técnica.

Salvo que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la técnica a la que pertenece esta divulgación.Las formas singulares «un/a» y «el/la» incluyen referentes plurales, a no ser que el contexto dicte claramente lo contrario.Similarmente, se entiende que la palabra «o» incluye «y», a no ser que el contexto dicte claramente lo contrario.Asimismo, debe entenderse que todos los tamaños de bases o tamaños de aminoácidos, y todos los valores de peso molecular o masa molecular dados para los ácidos nucleicos o polipéptidos son aproximados, y se proporcionan con fines descriptivos.Si bien para la práctica o la prueba de la presente divulgación pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los aquí descritos, a continuación se describen métodos y materiales adecuados.El término «comprende» significa «incluye».En caso de conflicto, prevalecerá la presente especificación, incluyendo las explicaciones de términos.Además, los materiales, métodos y ejemplos tienen carácter únicamente ilustrativo y no pretenden ser limitativos.

III. Anticuerpos monoclonales humanos que se unen específicamente a la endoplasmina

Se han producido anticuerpos que se unen específicamente a la endoplasmina (Grp94), incluyendo anticuerpos monoclonales tales como anticuerpos monoclonales totalmente humanos.Estos anticuerpos y/o sus fragmentos de unión al antígeno pueden utilizarse para aislar la endoplasmina, y pueden utilizarse para detectar y/o tratar tumores que expresan endoplasmina, como por ejemplo, pero sin limitación, melanoma, cáncer de mama, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer renal, cáncer de pulmón, glioma, cáncer de vejiga o cáncer de páncreas.Estos anticuerpos pueden conjugarse con etiquetas detectables o moléculas efectoras.

En una realización, los anticuerpos se unen específicamente a la endoplasmina glicosilada.

Así pues, en esta realización, los anticuerpos no se unen específicamente a la endoplasmina no glicosilada ni a antígenos no relacionados.

En la presente invención se divulgan anticuerpos monoclonales humanos aislados y fragmentos de unión al antígeno de dichos anticuerpos que se unen específicamente a la endoplasmina.En un ejemplo, la endoplasmina humana tiene una secuencia de aminoácidos definida como:

MRALWVLGLCCVLLTFGSVRADDEVDVDGTVEEDLGKSREGSRTDDEVVQ
REEEAIQLDGLNASQIRELREKSEKFAFQAEVNRMMKLIINSLYKNKEIFLRELISNAS
DALDKIRLISLTDENALSGNEELTVKIKCDKEKNLLHVTDTGVGMTREELVKNLGTI
AKSGTSEFLNKMTEAQEDGQSTSELIGQFGVGFYSAFLVADKVIVTSKHNNDTQHIW
ESDSNEFSVIADPRGNTLGRGTTITLVLKEEASDYLELDTIKNLVKKYSQFINFPIYVW
SSKTETVEEPMEEEEAAKEEKEESDDEAAVEEEEEEKKPKTKKVEKTVWDWELMND
IKPIWQRPSKEVEEDEYKAFYKSFSKESDDPMAYIHFTAEGEVTFKSILFVPTSAPRGL
FDEYGSKKSDYIKLYVRRVFITDDFHDMMPKYLNFVKGVVDSDDLPLNVSRETLQQ
HKLLKVIRKKLVRKTLDMIKKIADDKYNDTFWKEFGTNIKLGVIEDHSNRTRLAKLL
RFQSSHHPTDITSLDQYVERMKEKQDKIYFMAGSSRKEAESSPFVERLLKKGYEVIYL
TEPVDEYCIQALPEFDGKRFQNVAKEGVKFDESEKTKESREAVEKEFEPLLNWMKD
KALKDKIEKAVVSQRLTESPCALVASQYGWSGNMERIMKAQAYQTGKDISTNYYAS
QKKTFEINPRHPLIRDMLRRIKEDEDDKTVLDLAVVLFETATLRSGYLLPDTKAYGD
RIERMLRLSLNIDPDAKVEEEPEEEPEETAEDTTEDTEQDEDEEMDVGTDEEEETAKE
STAEKDEL

SEC ID Nº: 5, véase también el nº de registroGENBANK® NM_003299 disponible el 16 de junio de 2010.

En un ejemplo, la endoplasmina está codificada por la secuencia de aminoácidos definida como:

gtgggcggac cgcgcggctg gaggtgtgag gatccgaacc caggggtggg gggtggaggc
ggctcctgcg atcgaagggg acttgagact caccggccgc acgccatgag ggccctgtgg
gtgctgggcc tctgctgcgt cctgctgacc ttcgggtcgg tcagagctga cgatgaagtt
gatgtggatg gtacagtaga agaggatctg ggtaaaagta gagaaggatc aaggacggat
gatgaagtag tacagagaga ggaagaagct attcagttgg atggattaaa tgcatcacaa
ataagagaac ttagagagaa gtcggaaaag tttgccttcc aagccgaagt taacagaatg
atgaaactta tcatcaattc attgtataaa aataaagaga ttttcctgag agaactgatt
tcaaatgctt ctgatgcttt agataagata aggctaatat cactgactga tgaaaatgct
ctttctggaa atgaggaact aacagtcaaa attaagtgtg ataaggagaa gaacctgctg
catgtcacag acaccggtgt aggaatgacc agagaagagt tggttaaaaa ccttggtacc
atagccaaat ctgggacaag cgagttttta aacaaaatga ctgaagcaca ggaagatggc
cagtcaactt ctgaattgat tggccagttt ggtgtcggtt tctattccgc cttccttgta
gcagataagg ttattgtcac ttcaaaacac aacaacgata cccagcacat ctgggagtct
gactccaatg aattttctgt aattgctgac ccaagaggaa acactctagg acggggaacg
acaattaccc ttgtcttaaa agaagaagca tctgattacc ttgaattgga tacaattaaa
aatctcgtca aaaaatattc acagttcata aactttccta tttatgtatg gagcagcaag
actgaaactg ttgaggagcc catggaggaa gaagaagcag ccaaagaaga gaaagaagaa
tctgatgatg aagctgcagt agaggaagaa gaagaagaaa agaaaccaaa gactaaaaaa
gttgaaaaaa ctgtctggga ctgggaactt atgaatgata tcaaaccaat atggcagaga
ccatcaaaag aagtagaaga agatgaatac aaagctttct acaaatcatt ttcaaaggaa
agtgatgacc ccatggctta tattcacttt actgctgaag gggaagttac cttcaaatca
attttatttg tacccacatc tgctccacgt ggtctgtttg acgaatatgg atctaaaaag
agcgattaca ttaagctcta tgtgcgccgt gtattcatca cagacgactt ccatgatatg
atgcctaaat acctcaattt tgtcaagggt gtggtggact cagatgatct ccccttgaat
gtttcccgcg agactcttca gcaacataaa ctgcttaagg tgattaggaa gaagcttgtt
cgtaaaacgc tggacatgat caagaagatt gctgatgata aatacaatga tacttttttgg
aaagaatttg gtaccaacat caagcttggt gtgattgaag accactcgaa tcgaacacgt
cttgctaaac ttcttaggtt ccagtcttct catcatccaa ctgacattac tagcctagac
cagtatgtgg aaagaatgaa ggaaaaacaa gacaaaatct acttcatggc tgggtccagc
agaaaagagg ctgaatcttc tccatttgtt gagcgacttc tgaaaaaggg ctatgaagtt
atttacctca cagaacctgt ggatgaatac tgtattcagg cccttcccga atttgatggg
aagaggttcc agaatgttgc caaggaagga gtgaagttcg atgaaagtga gaaaactaag
gagagtcgtg aagcagttga gaaagaattt gagcctctgc tgaattggat gaaagataaa
gcccttaagg acaagattga aaaggctgtg gtgtctcagc gcctgacaga atctccgtgt
gctttggtgg ccagccagta cggatggtct ggcaacatgg agagaatcat gaaagcacaa
gcgtaccaaa cgggcaagga catctctaca aattactatg cgagtcagaa gaaaacattt
gaaattaatc ccagacaccc gctgatcaga gacatgcttc gacgaattaa ggaagatgaa

gatgataaaa cagttttgga tcttgctgtg gttttgtttg aaacagcaac gcttcggtca
gggtatcttt taccagacac taaagcatat ggagatagaa tagaaagaat gcttcgcctc
agtttgaaca ttgaccctga tgcaaaggtg gaagaagagc ccgaagaaga acctgaagag
acagcagaag acacaacaga agacacagag caagacgaag atgaagaaat ggatgtggga
acagatgaag aagaagaaac agcaaaggaa tctacagctg aaaaagatga attgtaaatt
atactctcac catttggatc ctgtgtggag agggaatgtg aaatttacat catttctttt
tgggagagac ttgttttgga tgccccctaa tccccttctc ccctgcactg taaaatgtgg
gattatgggt cacaggaaaa agtgggtttt ttagttgaat ttttttaac attcctcatg
aatgtaaatt tgtactattt aactgactat tcttgatgta aaatcttgtc atgtgtataa
aaataaaaaa gatcccaaat

SEC ID Nº: 6, véase también el nº de registro GENBANK® NM_003299, 16 de junio de 2010.Un experto en la técnica puede utilizar fácilmente una secuencia de ácido nucleico para producir un polipéptido, por ejemplo

endoplasmina, empleando un método estándar en biología molecular (véase, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., vol. 1-3, ed. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989). Con los agentes terapéuticos y anticuerpos aquí descritos, un experto en la técnica puede construir fácilmente diversos clones que contienen ácidos nucleicos funcionalmente equivalentes, tales como ácidos nucleicos que difieren en cuanto a su secuencia pero que codifican la misma EM o secuencia de anticuerpos.Así pues, la presente invención divulga ácidos nucleicos que codifican anticuerpos y conjugados y sus proteínas de fusión.

En la presente invención se describen anticuerpos monoclonales humanos aislados y fragmentos de dichos anticuerpos que se unen específicamente a endoplasmina humana, como endoplasmina glicosilada.En algunas realizaciones, el fragmento de unión al antígeno del anticuerpo monoclonal humano es un Fv monocatenario.También se describen composiciones, incluyendo anticuerpos monoclonales humanos divulgados o fragmentos funcionales de dichos anticuerpos (que se unen específicamente a endoplasmina humana) y un vehículo farmacéuticamente aceptable.También se divulgan ácidos nucleicos que codifican estos anticuerpos, vectores de expresión que comprenden estos ácidos nucleicos, y células hospedadoras aisladas que expresan los ácidos nucleicos.

También se describen inmunoconjugados que comprenden anticuerpos monoclonales humanos o fragmentos de unión al antígeno de dichos anticuerpos que se unen específicamente a endoplasmina humana.Los inmunoconjugados pueden comprender cualquier agente terapéutico, toxina u otra fracción.En un ejemplo, la toxina es PE o una variante o un fragmento de esta.

También se describen composiciones que comprenden inmunoconjugados.Se pueden utilizar composiciones que comprenden anticuerpos monoclonales humanos que se unen específicamente a endoplasmina o fragmentos de unión al antígeno de dichos anticuerpos para fines de cribado, investigación, detección y terapéuticos.Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales humanos o fragmentos de unión al antígeno de dichos anticuerpos se pueden utilizar para identificar otros anticuerpos que se unen específicamente a la endoplasmina, por ejemplo en inmunoensayos competitivos.

Se pueden utilizar composiciones que comprenden anticuerpos monoclonales humanos que se unen específicamente a endoplasmina o un fragmento de unión al antígeno de dichos anticuerpos para tratar a un sujeto diagnosticado con cáncer, por ejemplo un cáncer que presente un incremento de la expresión de endoplasmina con respecto a las células normales.Por ejemplo, los anticuerpos pueden utilizarse para tratar el melanoma, cáncer de mama, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer renal, cáncer de pulmón, glioma, cáncer de vejiga, cáncer de ovario o cáncer de páncreas.El melanoma incluye el melanoma de extensión superficial, el melanoma nodular, el melanoma lentiginoso acral y lentigo maligno (melanoma).Los carcinomas de células escamosas incluyen, pero sin limitarse a ellos, el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello y cánceres de pulmón de células escamosas.

También pueden utilizarse composiciones que comprenden los anticuerpos contra endoplasmina para prevenir metástasis o reducir el número de micrometástasis, tales como micrometástasis a ganglios linfáticos regionales.También pueden utilizarse inmunoconjugados que comprenden anticuerpos contra endoplasmina para tratar a un paciente diagnosticado con cáncer.Los anticuerpos monoclonales humanos también pueden utilizarse para diagnosticar cáncer en un sujeto, incluyendo la detección de una metástasis.Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales humanos pueden ponerse en contacto con una muestra tomada del paciente, por ejemplo una muestra de suero, para detectar niveles elevados de endoplasmina.Los anticuerpos y las composiciones divulgados aquí también pueden utilizarse para detectar cáncer en un sujeto o confirmar el diagnóstico de cáncer en un sujeto.

En la presente invención se divulgan anticuerpos monoclonales totalmente humanos que se unen específicamente a endoplasmina y fragmentos funcionales (fragmentos de unión al antígeno) de dichos anticuerpos que se unen específicamente a endoplasmina humana.Una limitación importante en el uso clínico de anticuerpos monoclonales de ratón es el desarrollo de una respuesta de anticuerpo antimurino humano (HAMA) en pacientes que reciben los tratamientos.La respuesta HAMA puede incluir reacciones alérgicas y un aumento de la tasa de eliminación del anticuerpo administrado del suero.Se han desarrollado varios tipos de anticuerpos monoclonales modificados para minimizar la respuesta HAMA, tratando de mantener al mismo tiempo la afinidad de unión al antígeno del anticuerpo monoclonal precursor.Un tipo de anticuerpo monoclonal modificado es una quimera humano-ratón en la que una región variable de unión al antígeno murino está acoplada a un dominio constante humano (Morrison and Schlom, Important Advances in Oncology, Rosenberg, S.A. (Ed.), 1989).Un segundo tipo de anticuerpo monoclonal modificado es el anticuerpo monoclonal injertado en la región determinante de la complementariedad (CDR) o humanizado (Winter and Harris, Immunol. Today 14:243-246, 1993).Sin embargo, los anticuerpos aquí divulgados son totalmente humanos; tanto la región marco como las CDR se derivan de secuencias humanas.Así pues, no se induce una respuesta HAMA cuando se administran estos anticuerpos a un sujeto humano.

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal humano o el fragmento de unión al antígeno de dicho anticuerpo comprende como mínimo una porción de la región variable de la secuencia de aminoácidos de cadena pesada establecida como SEC ID Nº: 1 y se une específicamente a la endoplasmina.

Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal humano puede incluir los SDR (residuos determinantes deespecificidad), las CDR o la región variable.En la secuencia de aminoácidos mostrada a continuación, la región constante se muestra en negrita y las CDR están subrayadas:

Q V Q L V Q S G A E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T S Y A M H W
V R Q A P G Q R L E W M G W I N A G N G N T K Y S Q K F Q G R V T I T R
D T S A S T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R A H F D Y W G Q G T L
V T V S **A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F**
P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T
V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T
H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T
C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q
Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A
P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T
C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G
S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V Met H E A L H N H Y T
Q K S L S L S P G K

(SEC ID Nº: 1)

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal humano o el fragmento de unión al antígeno de dicho anticuerpo comprende como mínimo una porción de la secuencia de aminoácidos de cadena pesada establecida como SEC ID Nº: 1 y se une específicamente a la endoplasmina.En algunos ejemplos, como mínimo una de las CDR decadena ligera del anticuerpo comprende una o más de las secuencias de aminoácidos establecidas como aminoácidos 26-33 de SEC ID Nº: (CDR1), aminoácidos 51-58 de SEC ID Nº: 1 (CDR2) y aminoácidos 97-103 de SEC ID Nº: 1 (CDR3).En ejemplos adicionales, la cadena pesada del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos establecida como aminoácidos 26-33 de SEC ID Nº: (CDR1), aminoácidos 51-58 de SEC ID Nº: 1 (CDR2) y aminoácidos 97-103 de SEC ID Nº: 1 (CDR3).En algunos ejemplos, la región variable de cadena pesada del anticuerpo puede incluir, o consistir en, los aminoácidos 1-113 de SEC ID Nº: 1.La cadena pesada del anticuerpo puede incluir, o consistir en, SEC ID Nº: 1.

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal humano o el fragmento de unión al antígeno de dicho anticuerpo comprende como mínimo una porción de la región variable de la secuencia de aminoácidos de cadena ligera establecida como SEC ID Nº: 2 y se une específicamente a la endoplasmina.

En la secuencia de aminoácidos mostrada a continuación, la región constante se muestra en negrita y las CDR están subrayadas:

E I E L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S S Y L N W Y Q Q K
P G K A P K L L I Y A A S S L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L
Q P E D F A T Y Y C Q Q S Y S T P P T F G Q G T K V E I K **T V A A P S V F I**
F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A
L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H
K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C

(SEC ID Nº: 2)

En algunos ejemplos, como mínimo una de las CDR de la cadena ligera del anticuerpo comprende una o más de las secuencias de aminoácidos establecidas como aminoácidos 27-32 de SEC ID Nº 2: (CDR1), aminoácidos 50-52 de SEC ID Nº: 2 (CDR2) y aminoácidos 89-97 de SEC ID Nº: 2 (CDR3).En ejemplos adicionales, la cadena ligera del anticuerpo comprende los aminoácidos 27-32 de SEC ID Nº: (CDR1), los aminoácidos 50-52 de SEC ID Nº: 2 (CDR2) y los aminoácidos 89-97 de SEC ID Nº: 2 (CDR3).La región variable de la cadena ligera del anticuerpo puede incluir, o consistir en, los aminoácidos 1-107 de SEC ID Nº: 2.La cadena ligera del anticuerpo puede incluir, o consistir en, SEC ID Nº: 2.

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal humano está etiquetado.En algunos ejemplos, la etiqueta es una etiqueta fluorescente, enzimática o radioactiva.

El anticuerpo monoclonal puede ser de cualquier isotipo.El anticuerpo monoclonal puede ser, por ejemplo, un anticuerpo IgA, IgM o IgG, tal como IgG_1 o IgG_2.La clase de un anticuerpo que se une específicamente a la endoplasmina puede cambiarse por otra.En un aspecto, una molécula de ácido nucleico que codifica VL o VH se aísla utilizando métodos bien conocidos en la técnica, de modo que no incluya secuencias de ácido nucleico que codifican la región constante de la cadena ligera o pesada, respectivamente.Posteriormente, la molécula de ácido nucleico que codifica VL o VH se une de forma funcional a una secuencia de ácido nucleico que codifica un CL o CH de una clase diferente de molécula de inmunoglobulina.Esto puede conseguirse utilizando un vector o molécula de ácido nucleico que comprende una cadena CL o CH, como se conoce en la técnica. Por ejemplo, la clase de un anticuerpo que se une específicamente a la endoplasmina que originalmente era IgM puede cambiarse a una IgG.El

cambio de clase puede utilizarse para convertir una subclase de IgG en otra, como por ejemplo de IgG_1 a IgG_2.

Los anticuerpos monoclonales totalmente humanos incluyen regiones marco humanas.Las regiones marco humanas pueden incluir las regiones marco divulgadas en una o ambas de SEC ID Nº: 1 o SEC ID N:º 2 (estas secuencias incluyen secuencias CDR así como secuencias marco).Sin embargo, las regiones marco pueden proceder de otra fuente.Ejemplos adicionales de secuencias marco que pueden utilizarse incluyen las secuencias marco de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera divulgadas en la Publicación PCT Nº WO 2006/074071 (véase, por ejemplo, SEC ID N:º 1-16).

Los fragmentos de anticuerpo están englobados por la presente divulgación, como Fab, F(ab')2, scFv y Fv, los cuales incluyen una región variable de cadena pesada y de cadena ligera y se unen al determinante epitópico en la endoplasmina.Estos fragmentos de anticuerpo conservan la capacidad de unirse específicamente al antígeno, concretamente la endoplasmina humana, y por consiguiente son fragmentos de unión al antígeno.Estos fragmentos incluyen:

1) Fab, el fragmento que contiene un fragmento de unión al antígeno monovalente de una molécula de anticuerpo, puede ser producido por la digestión del anticuerpo entero con la enzima papaína para obtener una cadena ligera intacta y una porción de una cadena pesada;
2) Fab', el fragmento de una molécula de anticuerpo, puede obtenerse mediante tratamiento del anticuerpo entero con pepsina, seguido de reducción, para obtener una cadena ligera intacta y una porción de la cadena pesada; se obtienen dos fragmentos Fab' por cada molécula de anticuerpo.
3) (Fab')2, el fragmento del anticuerpo que puede obtenerse mediante tratamiento del anticuerpo entero con la enzima pepsina sin posterior reducción; F(ab')2 es un dímero de dos fragmentos Fab' unidos por dos enlaces de disulfuro.
4) Fv, un fragmento creado por ingeniería genética que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada expresadas como dos cadenas, y
5) Anticuerpo monocatenario (por ejemplo, Fv monocatenario), definido como una molécula creada por ingeniería genética que contiene la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada, enlazadas por un enlazador polipéptido adecuado como molécula monocatenaria fusionada genéticamente.
6) Un dímero de un anticuerpo monocatenario (SCFV2), definido como un dímero de un Fv monocatenario.Este también se conoce como «minianticuerpo».

En la técnica se conocen métodos para crear estos fragmentos (véase, por ejemplo, Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, 1988).

En otro grupo de realizaciones, los anticuerpos son Fv monocatenarios, que típicamente tienen un tamaño aproximado de 25 kDa y contienen un lugar completo de unión al antígeno con tres CDR por cada cadena pesada y cada cadena ligera.Para producir estos anticuerpos, la VH y la VL pueden expresarse a partir de dos estructuras de ácido nucleico individuales en una célula hospedadora.Si la VH y la VL se expresan de forma no contigua, las cadenas del anticuerpo Fv están típicamente unidas por interacciones no covalentes.Sin embargo, estas cadenas tienden a disociarse durante la dilución, y por lo tanto se han desarrollado métodos para entrelazar las cadenas mediante glutaraldehído, disulfuros intermoleculares o un enlazador péptido.Así, en un ejemplo, el Fv puede ser un Fv estabilizado con disulfuro (dsFv), donde la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera están unidas químicamente por enlaces de disulfuro.

En un ejemplo adicional, los fragmentos de Fv comprenden cadenas VH y VL conectadas por un enlazador péptido.Estas proteínas de unión al antígeno monocatenarias (Fv monocatenario) se preparan construyendo un gen estructural que comprende secuencias de ADN que codifican los dominios VH y VL conectados por un oligonucleótido.El gen estructural se inserta en un vector de expresión, que a continuación se introduce en una célula hospedadora, como por ejemplo E. coli. Las células hospedadoras recombinantes sintetizan una única cadena polipeptídica con un péptido enlazador que enlaza los dos dominios V.En la técnica se conocen métodos para producir FV monocatenarios (véase Whitlow et al., Methods: a Companion to Methods in Enzymology, Vol. 2, página 97, 1991; Bird et al., Science 242:423, 1988; Patente USAnº 4.946.778; Pack et al., Bio/Technology 11:1271, 1993; y Sandhu, supra).

También se contemplan dímeros de un anticuerpo monocatenario (SCFV2).

Los fragmentos de anticuerpo se pueden preparar mediante hidrólisis proteolítica del anticuerpo o mediante expresión en E. coli de ADN que codifique el fragmento.Los fragmentos de anticuerpo se pueden obtener mediante digestión por pepsina o papaína de anticuerpos enteros por métodos convencionales.Por ejemplo, se pueden producir fragmentos de anticuerpo mediante escisión enzimática de anticuerpos con pepsina para obtener un fragmento 5S representado como F(ab')2. Este fragmento puede escindirse aún más utilizando un agente reductor de tiol, y opcionalmente un grupo de bloqueo para los grupos sulfhidrilos resultantes de la escisión de enlaces de disulfuro, para producir fragmentos monovalentes 3.5S Fab'.Alternativamente, una escisión enzimática utilizando pepsina produce directamente dos fragmentos monovalentes Fab' y un fragmento Fc (véase la Patente USAnº 4.036.945 y Patente USAnº 4.331.647 y las referencias allí incluidas; Nisonhoff et al.,Arch. Biochem. Biophys. 89:230, 1960; Porter, Biochem. J. 73:119, 1959; Edelman et al., Methods in Enzymology, Vol. 1, page 422, Academic Press, 1967; and Coligan et al. at secciones 2.8.1-2.8.10 y 2.10.1-2.10.4).

También pueden utilizarse otros métodos para escindir anticuerpos, tales como la separación de cadenas pesadas

para formar fragmentos de cadena ligera-pesada monovalentes, la escisión adicional de fragmentos u otras técnicas enzimáticas, químicas o genéticas, siempre y cuando los fragmentos se unan al antígeno que es reconocido por el anticuerpo intacto.

Un experto en la técnica comprenderá que pueden producirse variantes conservativas de los anticuerpos que se unan específicamente a la endoplasmina humana.Tales variantes conservativas empleadas en fragmentos de anticuerpos, tales como fragmentos de dsFv o fragmentos de Fv monocatenario, conservarán los residuos de aminoácidos cruciales necesarios el plegamiento y la estabilización correctos entre las regiones VH y VL, y conservarán las características de carga de los residuos a fin de preservar el bajo pi y la baja toxicidad de las moléculas.Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, como máximo una, como máximo dos, como máximo tres, como máximo cuatro o como máximo cinco sustituciones de aminoácidos) en las regiones VH y VL para aumentar la producción.Los expertosen la técnica conocen tablas de sustitución de aminoácidos conservativos que proporcionan aminoácidos similares. Los siguientes seis grupos son ejemplos de aminoácidos que están considerados como sustituciones conservativas entre sí:

1. Alanina (A), Serina (S), Treonina (T);
2. Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E);
3. Asparagina (N), Glutamina (Q);
4. Arginina (R), Lisina (K);
5. Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V) y
6. Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W).

IV. Uso en fracciones terapéuticas y diagnósticas

Los anticuerpos monoclonales humanos, o fragmentos funcionales de dichos anticuerpos que se unen específicamente a la endoplasmina humana se pueden utilizar en métodos terapéuticos y diagnósticos, como el tratamiento y la detección de melanoma, cáncer de mama, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer renal, cáncer de pulmón, glioma, cáncer de vejiga, cáncer de ovario o cáncer de páncreas.Para su uso terapéutico, los métodos pueden incluir la administración a un sujeto de una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo que se une específicamente a la endoplasmina, o de un fragmento de unión al antígeno de dicho anticuerpo, por ejemplo para el tratamiento de melanoma, cáncer de mama, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer renal, cáncer de pulmón, glioma, cáncer de vejiga, cáncer de ovario o cáncer de páncreas, como por ejemplo carcinoma pancreático.

En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales humanos o fragmentos de unión al antígeno de dichos anticuerpos aquí descritos se pueden conjugar con un agente terapéutico.Los inmunoconjugados incluyen pero sin limitación, moléculas en las que existe un enlace covalente de un agente terapéutico a un anticuerpo.Un agente terapéutico es un agente con una actividad biológica concreta dirigida contra una molécula diana concreta o una célula que porta una molécula diana.Un experto en la técnica apreciará que los agentes terapéuticos pueden incluir varios fármacos, tales como vinblastina, daunomicina y similares, citotoxinas tales como exotoxina de Pseudomonas nativa o modificada o toxina de la difteria, agentes encapsuladores (como liposomas), que a su vez contienen composiciones farmacológicas, agentes radioactivos tales como ^{125}I, ^{32}P, ^{14}C, ^{3}H y ^{35}S y otras fracciones diana y ligandos.

Las toxinas pueden utilizarse con los anticuerpos monoclonales humanos específicos de la endoplasmina y fragmentos de unión al antígeno de dichos anticuerpos que se describen aquí, para producir inmunotoxinas.Ejemplos de toxinas incluyen ricina, abrina, toxina de la difteria y subunidades de estas, así como las toxinas butilínicas A hasta F. Estas toxinas están fácilmente disponibles a través de canales comerciales (por ejemplo, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO).Las toxinas contempladas incluyen también variantes de las toxinas aquí descritas (véanse, por ejemplo, las Patentes USAnº 5.079.163 y 4.689.401).En una realización, la toxina es la exotoxina de Pseudomonas (PE) (Patente USAnº 5.602.095).A efectos de la presente, «exotoxina de Pseudomonas» se refiere a una PE nativa (existente de forma natural) de longitud completa o a una PE que ha sido modificada.Tales modificaciones pueden incluir pero sin limitación, la eliminación del dominio Ia, varias deleciones de aminoácidos en los dominios Ib, II y III, sustituciones de aminoácidos individuales y la adición de una o más secuencias en el terminal carboxilo (por ejemplo, véase Siegall et al., J. Biol. Chem. 264:14256-14261, 1989).En una realización, el fragmento citotóxico de PE conserva al menos el 50 %, al menos el 75 %, al menos el 90 % o al menos el 95 % de la citotoxicidad de la PE nativaEn algunos ejemplos, el fragmento citotóxico es más tóxico que la PE nativa.

La exotoxina de Pseudomonas nativa A (PE) es una proteína monomérica extremadamente activa (peso molecular de 66 kD) segregada por la especie bacteriana Pseudomonas aeruginosa, que inhibe la síntesis de proteínas en células eucariotas.El método de acción de PE es la inactivación de la ribosilación de ADP del factor de elongación 2 (EF-2).La exotoxina contiene tres dominios estructurales que actúan de forma concertada para provocar citotoxicidad.El dominio Ia media la unión a la célula.El dominio II es responsable de la translocación al citosol y el dominio II media la ribosilación de ADP del factor de elongación 2. La función del dominio Ib es desconocida.La PE empleada con los anticuerpos monoclonales aquí descritos puede incluir la secuencia nativa, fragmentos citotóxicos de la secuencia nativa y variantes modificadas conservativamente de PE nativa y sus fragmentos citotóxicos.Los fragmentos citotóxicos de PE incluyen aquellos que son citotóxicos con o sin posterior procesamiento proteolítico o

de otro tipo en la célula diana.Fragmentos citotóxicos de PE incluyen PE40, PE38 y PE35.Para una descripción adicional de PE y sus variantes, véanse por ejemplo las Patentes USAnº 4.892.827; 5.512.658; 5.602.095; 5.608.039; 5.821.238; y 5.854.044; Publicación PCT nº WO 99/51643; Pai et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 88:3358-3362, 1991; Kondo et al., J. Biol. Chem. 263:9470-9475, 1988; Pastan et al., Biochim. Biophys. Acta 1333:C1-C6, 1997.

Los anticuerpos y sus fragmentos de unión al antígeno aquí descritos también pueden utilizarse para dirigir cualquiera de diferentes compuestos diagnósticos o terapéuticos diferentes a células que expresan endoplasmina en su superficie.Así pues, un anticuerpo de la presente divulgación puede ligarse directamente o mediante un enlazador a un fármaco que se libera directamente a células que expresan endoplasmina en su superficie.Los agentes terapéuticos incluyen compuestos tales como ácidos nucleicos, proteínas, péptidos, aminoácidos o derivados, glicoproteínas, radioisótopos, lípidos, carbohidratos o virus recombinantes.Los grupos funcionales terapéuticos y diagnósticos de ácidos nucleicos incluyen ácidos nucleicos antisentido, oligonucleótidos derivatizados para entrelazamiento covalente con ADN simple o doble y oligonucleótidos inductores de triple hélice.

Alternativamente, la molécula ligada a un anticuerpo contra endoplasmina, puede ser un sistema de encapsulación, como por ejemplo un liposoma o una micela que contiene una composición terapéutica como un fármaco, un ácido nucleico (por ejemplo, un ácido nucleico antisentido) u otra fracción terapéutica que esté preferiblemente protegida contra la exposición directa en el sistema circulatorio.Los expertosen la técnica conocen métodos para la preparación de liposomas ligados a anticuerpos (véase, por ejemplo, la Patente USAnº 4.957.735; Connor et al., Pharm. Ther. 28:341-365, 1985).

Los anticuerpos aquí divulgados pueden ser conjugados con un agente terapéutico adicional y/o pueden ser utilizados en combinación con un agente de adición, mediante administración secuencial o simultánea.La elección de un agente terapéutico concreto depende de la molécula o célula diana concreta, y del efecto biológico deseado.Así, por ejemplo, el agente terapéutico puede ser una citotoxina que se utiliza para provocar la muerte de una célula diana concreta.A la inversa, allí donde se desee inducir una respuesta biológica no letal se puede conjugar el agente terapéutico con un agente farmacológico no letal o con un liposoma que contenga un agente farmacológico no letal.

El agente terapéutico también puede ser una citoquina o una quimiocina.Una «citoquina» es una clase de proteínas o péptidos liberadas por una población de células que actúa sobre otras células como mediadores intercelulares.Las citoquinas pueden actuar como agente inmunomodulador.Ejemplos de citoquinas incluyen linfocinas, monocinas, factores de crecimiento y hormonas polipéptidas tradicionales.Así pues, las realizaciones utilizan un interferón (p. ej., IFN-α, IFN-β, e IFN-γ); miembro de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNFSF); hormona del crecimiento humana; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorrelaxina; hormona foliculoestimulante (FSH); hormona estimulante de la tiroides (TSH); hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; prostaglandina, factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario, proteína OB; TNF-α; TNF-β; integrina; trombopoyetina (TPO); un factor de crecimiento nervioso como NGF-β; factor de crecimiento de plaquetas; TGF-α; TGF-β; factores de crecimiento similares a la insulina I y II; eritropoyetina (EPO); factores estimulantes de colonias (CSF) tales como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de granulocitos-macrófagos (GM-CSF); y CSF de granulocitos (G-CSF); una interleucina (IL-1 a IL-21), ligando de kit o FLT-3, angiostatina, trombospondina o endostatina.Estas citoquinas incluyen proteínas procedentes de fuentes naturales o de cultivo celular recombinante y equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de la secuencia nativa.

Las quimiocinas también pueden conjugarse con los anticuerpos aquí divulgados.Las quimiocinas son una superfamilia de citoquinas proinflamatorias pequeñas (de entre aproximadamente 4 y aproximadamente14 kDa), inducibles y segregadas que actúan primariamente como quimioatractivos y activadores de subtipos celulares específicos de leucocitos.La producción de quimiocina es inducida por citoquinas inflamatorias, factores de crecimiento y estímulos patogénicos.Las proteínas de la quimiocina están divididas en subfamilias (alfa, beta y delta) basadas en motivos de secuencia de aminoácidos conservados y están clasificadas en cuatro grupos altamente conservados (CXC, CC, C y CX3C), basados en la posición de las dos primeras cisteínas adyacentes al terminal amino.Hasta la fecha se han descubierto más de 50 quimiocinas y existen por lo menos 18 receptores de quimiocina de dominio transmembrana siete (7TM) humanos.Las quimiocinas de uso incluyen, pero sin limitarse a estas, RANTES, MCAF, MCP-1 y fractalquina.

El agente terapéutico puede ser un agente quimioterapéutico.En una realización, el agente quimioterapéutico es una molécula radioactiva.Un experto en la técnica puede identificar fácilmente un agente quimioterapéutico de uso (por ejemplo, véase Slapak and Kufe, Principles of Cancer Therapy, capítulo 86 in Harrison's Principles of Internal Medicine, 14ª edición; Perry et al., Chemotherapy, cap. 17 en Abeloff, Clinical Oncology 2.º ed., © 2000 Churchill Livingstone, Inc; Baltzer L., Berkery R. (eds): Oncology Pocket Guide to Chemotherapy, 2ª ed. St. Louis, Mosby-Year Book, 1995; Fischer DS, Knobf MF, Durivage HJ (eds): The Cancer Chemotherapy Handbook, 4ª ed. St. Louis, Mosby-Year Book, 1993).Los agentes quimioterapéuticos incluyen aquellos conocidos por los expertosen la técnica, incluyendo pero sin limitación: 5-fluorouracilo (5-FU), azatioprina, ciclopamina, ciclofosfamida, antimetabolitos (como fludarabina), antineoplásicos (como etopósido, doxorrubicina, metotrexato y vincristina), carboplatina, cisplatino, dacarbazina, temozolomida, inhibidores de PARP y los taxanos, tales como taxol.También se ha utilizado la rapamicina como agente quimioterapéutico.

Moléculas efectoras tales como, sin carácter limitativo, radionucleótidos, citoquinas, quimiocinas y agentes

quimioterapéuticos, pueden enlazarse con un anticuerpo de interés utilizando cualquier medio conocido por los expertosen la técnica. Pueden utilizarse medios de enlace tanto covalentes como no covalentes.El procedimiento para enlazar una molécula efectora con un anticuerpo varía en función de la estructura química del efector.Típicamente, los polipéptidos contienen diversos grupos funcionales, como grupos de ácido carboxílico (COOH), grupos aminos ($-NH_2$) o sulfhidrilos (-SH) libres, que están disponibles para la reacción con un grupo funcional adecuado en un anticuerpo para provocar la unión de la molécula efectora.Alternativamente, se derivatiza el anticuerpo para exponer o ligar grupos funcionales reactivos adicionales.La derivatización puede implicar el enlace de cualquier cantidad de moléculas enlazadoras, como las disponibles a través de Pierce Chemical Company, Rockford, IL.El enlazador puede ser cualquier molécula utilizada para unir el anticuerpo a la molécula efectora.El enlazador puede formar enlaces covalentes tanto con el anticuerpo como con la molécula efectora.Los expertosen la técnica conocen enlazadores adecuados que pueden incluir, sin limitarse a ellos, enlazadores de carbono de cadena recta o ramificada, enlazadores de carbono heterocíclicos o enlazadores péptidos.En caso de que el anticuerpo y la molécula efectora sean polipéptidos, los enlazadores pueden estar ligados a los aminoácidos constituyentes mediante sus grupos laterales (por ejemplo, mediante un enlace disulfuro a cisteína) o a los grupos aminos de carbono alfa y carboxilos de los aminoácidos terminales.

En algunas circunstancias, es deseable liberar la molécula efectora del anticuerpo cuando el inmunoconjugado ha alcanzado su punto diana.Por consiguiente, en estas circunstancias, los imnunoconjugados comprenderán enlaces escindibles en las proximidades del punto diana.La escisión del enlazador para liberar la molécula efectora del anticuerpo puede inducirse mediante actividad enzimática o condiciones a las que esté sujeto el inmunoconjugado, ya sea dentro de la célula diana o en las proximidades del punto diana.

En vista del gran número de métodos que se han descrito para ligar diversos compuestos radiodiagnósticos, compuestos radioterapéuticos, fármacos marcadores (tales como enzimas o moléculas fluorescentes), toxinas, polipéptidos y otros agentes a anticuerpos, un experto en la técnica podrá determinar un método adecuado para ligar un agente dado a un anticuerpo u otro polipéptido.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se unen específicamente a la endoplasmina aquí divulgados pueden derivatizarse o ligarse a otras moléculas (por ejemplo, otro péptido o proteína).En general, los anticuerpos o partes de estos se derivatizan de tal manera que el enlace a la endoplasmina no se ve afectado adversamente por la derivatización o el etiquetado.Por ejemplo, el anticuerpo puede enlazarse funcionalmente (mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente u otras técnicas) a una o más entidades moleculares, tales como otro anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente de detección, un agente farmacéutico y/o una proteína o péptido que pueda mediar la asociación del anticuerpo o de la porción de anticuerpo a otra molécula (por ejemplo, una región central de estreptavidina o un marcador de polihistidina).

Un tipo de anticuerpo derivatizado se produce por entrelazamiento de dos o más anticuerpos (del mismo tipo o de diferentes tipos, por ejemplo para crear anticuerpos biespecíficos).Entrelazadores específicos incluyen aquellos que son heterobifuncionales, y que tienen dos grupos marcadamente reactivos separados por un espaciado apropiado (como éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida) u homobifuncionales (como suberato de disuccinimidilo).Tales enlazadores están disponibles a través de Pierce Chemical Company, Rockford,

Ill.En la presente se divulgan métodos para la detección de endoplasmina, incluyendo métodos para detectar células que expresan endoplasmina, tales como células de melanoma, cáncer de mama, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer renal, cáncer de pulmón, glioma, cáncer de vejiga, cáncer de ovario o cáncer de páncreas.Estos métodos pueden incluir poner en contacto una muestra de un sujeto con un anticuerpo que se une específicamente a la endoplasmina, o un fragmento de unión al antígeno de dicho anticuerpo, tal como se divulga en la presente.Los métodos pueden utilizarse para detectar un tumor primario, o pueden utilizarse para detectar metástasis.

En algunas realizaciones, se divulgan métodos para detectar cáncer o para confirmar el diagnóstico de cáncer en un sujeto.El método incluye poner en contacto una muestra de un sujeto con un anticuerpo aislado que se une específicamente a la endoplasmina, o un fragmento de unión al antígeno de dicho anticuerpo, y detectar la unión a la muestra del anticuerpo monoclonal humano aislado o del fragmento de unión al antígeno de dicho anticuerpo.Un incremento en la unión a la muestra del anticuerpo monoclonal humano aislado o del fragmento de unión al antígeno de dicho anticuerpo en comparación con la unión del anticuerpo monoclonal humano aislado o del fragmento de unión al antígeno de dicho anticuerpo a una muestra de control detecta cáncer en el sujeto o confirma el diagnóstico de cáncer en el sujeto.El control puede ser una muestra procedente de un sujeto del que se sabe que no tiene cáncer, o bien un valor estándar.

La muestra puede ser cualquier muestra, incluyendo sin limitación, tejido de biopsias, autopsias y muestras de patología.Las muestras biológicas también incluyen secciones de tejidos, por ejemplo criosecciones tomadas con fines histológicos.Las muestras biológicas también incluyen fluidos corporales, tales como sangre, suero, plasma, esputo y líquido cefalorraquídeo.

En algunas realizaciones, el anticuerpo humano que se une específicamente a la endoplasmina (el primer anticuerpo) no está etiquetado y un segundo anticuerpo u otra molécula que puede unirse al anticuerpo que se une específicamente a la endoplasmina sí que está etiquetado.Como bien conocen los expertosen la técnica, se elige un segundo anticuerpo capaz de unirse específicamente a la especie y la clase específicas del primer anticuerpo.Por

ejemplo, si el primer anticuerpo es una IgG humana, el anticuerpo secundario puede ser una IgG antihumana.Otras moléculas que pueden unirse a anticuerpos incluyen, sin carácter limitativo, la proteína A y la proteína G, las cuales están disponibles comercialmente.

Un anticuerpo humano que se une específicamente a la endoplasmina o un fragmento de unión al antígeno de dicho anticuerpo puede ser etiquetado con una fracción detectable.Agentes de detección útiles incluyen compuestos fluorescentes, incluyendo fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-(dimetilamino)-nafaleno-1-sulfonilo, ficoeritrina, fósforos lantánidos y similares.También se utilizan marcadores bioluminescentes, como luciferasa, proteína verde fluorescente (GFP), proteína amarilla fluorescente (YFP).Un anticuerpo también puede ser etiquetado con enzimas útiles para la detección, como peroxidasa de rábano silvestre, β- galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa y similares.Cuando un anticuerpo está etiquetado con una enzima detectable, puede detectarse añadiendo reactivos adicionales que la enzima utiliza para producir un producto de reacción que puede ser observado.Por ejemplo, cuando está presente el agente peroxidasa de rábano silvestre, la adición de peróxido de hidrógeno y de diaminobencidina da lugar a un producto de reacción coloreado que puede detectarse visualmente.Un anticuerpo también puede ser etiquetado con biotina y detectado mediante la medición indirecta de la unión de avidina o estreptavidina.Cabe señalar que la avidina puede, a su vez, ser etiquetada con una enzima o una etiqueta fluorescente.

Un anticuerpo puede ser etiquetado con un agente magnético, por ejemplo gadolinio.Los anticuerpos también pueden ser etiquetados con lantánidos (como europio y disprosio) y manganeso.También son útiles como etiquetas partículas paramagnéticas como el óxido de hierro superparamagnético.Un anticuerpo también puede ser etiquetado con epítopos polipéptidos predeterminados reconocidos por un informador secundario (como secuencias de par de cremalleras de leucina, lugares de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metal, marcadores epitópicos).En algunas realizaciones, las etiquetas están ligadas por brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el impedimento estérico potencial.

Un anticuerpo también puede ser etiquetado con un aminoácido radioetiquetado.La radioetiqueta puede utilizarse para fines tanto diagnósticos como terapéuticos.Por ejemplo, la radioetiqueta puede utilizarse para detectar endoplasmina por rayos X, espectros de emisión, imagen por resonancia magnética (MRI), tomografía computerizada (CT), tomografía por emisión de positrones (PET) u otras técnicas diagnósticas.Ejemplos de etiquetas para polipéptidos incluyen, pero sin limitarse a ellos, los siguientes radioisótopos o radionucleótidos: ^{35}S, ^{11}C, ^{13}N, ^{15}O, ^{18}F, ^{19}F, ^{99m}Tc, $^{131}1$, ^{3}H, ^{14}C, ^{15}N, ^{90}Y, ^{99}Tc, ^{111}In e ^{125}I.

Un anticuerpo también puede ser derivatizado con un grupo químico, como polietilenglicol (PEG), un grupo metilo o etilo o un grupo carbohidrato.Estos grupos pueden ser útiles para mejorar las características biológicas del anticuerpo, como por ejemplo incrementar la semivida en suero o para aumentar la unión tisular. Los anticuerpos aquí descritos también pueden estar unidos de forma covalente o no covalente a una etiqueta detectable.Las etiquetas detectables adecuadas para el uso incluyen cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos.Etiquetas útiles incluyen nanoperlas magnéticas, tintes fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, Texas red, rodamina, proteína verde fluorescente y similares), radioetiquetas (por ejemplo, ^{3}H, ^{125}I, ^{35}S, ^{14}C, o ^{32}P), enzimas (tales como peroxidasa de rábano silvestre, fosfatasa alcalina y otras utilizadas habitualmente en un ELISA) y etiquetas colorimétricas como nanoperlas de oro coloidal o cristal o plástico coloreado (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex y similares).Estos anticuerpos pueden utilizarse en diversos inmunoensayos, incluyendo la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), la inmunohistoquímica, los ensayos radioinmunológicos (RIA) y los ensayos por inmunoadsorción ligados a enzimas (ELISA).

Medios de detectar tales etiquetas son bien conocidos por los expertosen la técnica. Así, por ejemplo, las radioetiquetas se pueden detectar utilizando película fotográfica o contadores de centelleo, y los marcadores fluorescentes se pueden detectar mediante un fotodetector para detectar la iluminación emitida.Típicamente, las etiquetas enzimáticas se detectan proporcionando a la enzima un sustrato y detectando el producto de reacción producido por la acción de la enzima sobre el sustrato, y las etiquetas colorimétricas se detectan por simple visualización de la etiqueta coloreada.

En una realización, se suministra un kit para detectar endoplasmina en una muestra biológica, por ejemplo una muestra de sangre.Los kits para detectar un polipéptido comprenderán típicamente un anticuerpo humano que se une específicamente a la endoplasmina, como por ejemplo cualquiera de los anticuerpos aquí divulgados.En algunas realizaciones se incluye en el kit un fragmento de anticuerpo, por ejemplo un fragmento Fv.Para usos en vivo, el anticuerpo puede ser un fragmento de Fv monocatenario.En otra realización, el anticuerpo está etiquetado (por ejemplo, con una etiqueta fluorescente, enzimática o radioactiva).

En una realización, un kit incluye materiales instructivos que divulgan medios de uso de un anticuerpo que se une específicamente a la endoplasmina.Los materiales instructivos pueden ser escritos, en forma electrónica (como un disquete de ordenador o disco compacto) o pueden ser visuales (como archivos de vídeo).Los kits también pueden incluir componentes adicionales para facilitar la aplicación específica para la que está diseñado el kit.

Así, por ejemplo, el kit puede contener adicionalmente medios para detectar una etiqueta (por ejemplo, sustratos de enzima para etiquetas enzimáticas, juegos de filtros para detectar etiquetas fluorescentes, etiquetas secundarias adecuadas como un anticuerpo secundario, o similares).Los kits pueden incluir adicionalmente tampones y otros

reactivos utilizados rutinariamente para la implementación de un método particular.Tales kits y los contenidos adecuados son bien conocidos por los expertosen la técnica.

En una realización, el kit diagnóstico comprende un inmunoensayo. Aunque los detalles de los inmunoensayos pueden variar en función del formato específico empleado, el método para detectar endoplasmina en una muestra biológica incluye generalmente los pasos de poner la muestra biológica en contacto con un anticuerpo que reacciona específicamente, en condiciones inmunológicamente reactivas, con la endoplasmina.Se deja que el anticuerpo se una específicamente, en condiciones inmunológicamente reactivas, para formar un complejo inmunitario, y la presencia del complejo inmunitario (anticuerpo ligado) se detecta directa o indirectamente.

V. Polinucleótidos y polipéptidos del anticuerpo contra endoplasmina

Las moléculas de ácido nucleico (también denominadas polinucleótidos) que codifican los polipéptidos aquí divulgados (incluyendo sin limitación, anticuerpos, sus fragmentos de unión al antígeno, inmunoconjugados y proteínas de fusión) pueden ser producidos fácilmente por un experto en la técnica, utilizando las secuencias de aminoácidos aquí divulgadas, secuencias disponibles en la técnica y el código genético.Además, un experto en la técnica puede construir fácilmente diversos clones que contienen ácidos nucleicos funcionalmente equivalentes, tales como ácidos nucleicos que difieren en cuanto a su secuencia pero que codifican la misma molécula efectora o secuencia de anticuerpos.Así pues, la presente invención divulga ácidos nucleicos que codifican anticuerpos, conjugados y proteínas de fusión.

En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales humanos contra endoplasmina tienen un dominio VH codificado por una secuencia de nucleótidos que comprende SEC ID N:º: 3.En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales humanos contra endoplasmina tienen un dominio VL codificado por la secuencia de nucleótidos que comprende SEC ID N:º: 4.A continuación se presentan ejemplos de secuencias de ácidos nucleicos:

secuencia W9 VH (región pesada constante hIgG1 en negrita):

CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCT
CAGTGAAGGTTTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCACTAGCTATGCT
ATGCATTGGGTGCGCCAGGCCCCCGGACAAAGGCTTGAGTGGATGGGAT

GGATCAACGCTGGCAATGGTAACACAAAATATTCACAGAAGTTCCAGGG
CAGAGTCACCATTACCAGGGACACATCCGCGAGCACAGCCTACATGGAG
CTGAGCAGCCTGAGATCTGAAGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGGG
CCCATTTTGACTACTGGGGCCAAGGTACCCTGGTCACCGTCTCG**GCTAG**
CACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGC
ACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACT
TCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAG
CGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACT
CCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCA
GACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTG
GACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCC
ACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC
TTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGA
GGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTC
AAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA
CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG
CGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC
AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAA
CCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACAC
CCTGCCCCCATCCCGGGA<u>G</u>GAG<u>A</u>TGACCAAGAACCAGGTCAGCCTG
ACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT
GGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCC
CGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCG
TGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGT
GATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCC
CTGTCTCCGGGTAAATGA

(SEC ID Nº: 3)

secuencia W9 VH (región ligera constante kappa humana en **negrita**):

GAAATTGAGCTCACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGA
CAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTACTTA
AATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATG
CTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGG
ATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATT
TTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCTCCAACGTTCGGC
CAAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA**ACGGTGGCTGCACCATCTGTCTT**
CATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTG
TTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAG
TGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTG
TCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCAC
CCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCC
TGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCT
TCAACAGGGGAGAGTGTTAG

(SEC ID Nº: 4)

Secuencias de ácido nucleico que codifican anticuerpos humanos que se unen específicamente a la endoplasmina, o fragmentos de unión al antígeno de dichos anticuerpos que se unen específicamente a la endoplasmina, pueden prepararse empleando cualquier método adecuado, incluyendo por ejemplo, la clonación de las secuencias adecuadas o la síntesis química directa empleando métodos como el método de fosfotriéster de Narang et al., Meth. Enzymol. 68:90-99, 1979; el método de fosfodiéster de Brown et al., Meth. Enzymol. 68:109-151, 1979; el método de dietilfosforamidita de Beaucage et al., Tetra. Lett. 22:1859-1862, 1981; el método fosforamidita triéster de fase sólida descrito por Beaucage & Caruthers, Tetra. Letts. 22(20): 1859-1862, 1981, usando un sintetizador automatizado, como el descrito en ejemplo, en Needham-VanDevanter et al., Nucl. Acids Res. 12:6159-6168, 1984; y el método de soporte sólido de la Patente USAnº4.458.066.La síntesis química produce un oligonucleótido de una sola cadena.Este puede convertirse en un ADN de doble cadena mediante hibridación con una secuencia complementaria, o mediante polimerización con una polimerasa de ADN que emplee la cadena única como plantilla.Según resultará evidente para los expertos en la técnica, aunque la síntesis química de ADN esté limitada generalmente a secuencias de aproximadamente 100 bases, pueden obtenerse secuencias más largas por la ligadura de secuencias más cortas.

Mediante técnicas de clonación se pueden preparar ácidos nucleicos ejemplares que codifican anticuerpos humanos que se unen específicamente a la endoplasmina, o fragmentos funcionales de dichos anticuerpos que se unen específicamente a la endoplasmina.En Sambrook et al., supra, Berger and Kimmel (eds.), supra, y Ausubel, supra, hay ejemplos de técnicas de clonación y secuenciación adecuadas, así como instrucciones suficientes para guiar a aquellos versados a través de numerosos ejercicios de clonación.También puede encontrarse información útil en la información sobre el producto proporcionada por los fabricantes de reactivos biológicos y equipos de experimentación.Tales fabricantes incluyen SIGMA Chemical Company (Saint Louis, MO), R&D Systems (Minneapolis, MN), Pharmacia Amersham (Piscataway, NJ), CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA), Chem Genes Corp., Aldrich Chemical Company (Milwaukee, WI), Glen Research, Inc., GIBCO BRL Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD), Fluka Chemica-Biochemika Analytika (Fluka Chemie AG, Buchs, Suiza), Invitrogen (Carlsbad, CA) y Applied Biosystems (Foster City, CA), así como otras muchas fuentes comerciales conocidas por aquellos versadosen la técnica.

Los ácidos nucleicos que codifican la molécula efectora (EM) nativa o anticuerpos contra endoplasmina pueden modificarse para formar la EM, los anticuerpos o los inmunoconjugados de la presente divulgación.La modificación por mutagénesis del punto dirigido es bien conocida en la técnica. Los ácidos nucleicos también pueden prepararse empleando métodos de amplificación.Los métodos de amplificación incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), el sistema de amplificación basado en transcripción (TAS), el sistema de replicación de secuencias autosostenido (3SR).Aquellos versados en la técnica conocen una gran variedad de métodos de clonación, células hospedadoras y métodos de amplificación *in vitro*.

En una realización, se preparan inmunoconjugados insertando el ADNc que codifica un anticuerpo monoclonal humano específico de la endoplasmina, o un fragmento de unión al antígeno de dicho anticuerpo, en un vector que comprende el ADNc que codifica la EM.La inserción se realiza de tal manera que el anticuerpo y la EM se leen en marco, esto es, en un polipéptido continuo que contiene una región de anticuerpo funcional y una región EM funcional.En una realización, el ADNc que codifica una EM, etiqueta o enzima está ligado a un anticuerpo de tal modo que la EM, etiqueta o enzima está situada en el terminal carboxilo del anticuerpo.En otra realización, la EM, etiqueta o enzima está situada en el terminal amino del anticuerpo.En otro ejemplo, el ADNc que codifica la EM, etiqueta o enzima está ligado a una región variable de cadena pesada de un anticuerpo de tal modo que la EM, etiqueta o enzima está situada en el terminal carboxilo de la región variable de cadena pesada.Posteriormente, la región variable de cadena pesada se puede ligar a una región variable de cadena ligera del anticuerpo usando enlaces disulfuro.En otro ejemplo, el ADNc que codifica una EM, etiqueta o enzima está ligado a una región variable de cadena ligera de un anticuerpo, de tal modo que la EM, etiqueta o enzima está situada en el terminal carboxilo de la región variable de cadena ligera.Posteriormente, la región variable de cadena ligera se puede ligar a una región

variable de cadena pesada del anticuerpo usando enlaces de disulfuro.

Una vez que los ácidos nucleicos que codifican una EM, un anticuerpo contra endoplasmina, un fragmento de unión al antígeno de dicho anticuerpo, o un inmunoconjugado son aislados y clonados, la proteína deseada puede expresarse en una célula diseñada de forma recombinante, como por ejemplo bacterias, y células de plantas, levadura, insectos y mamíferos.Cabe esperar que los expertosen la técnica conozcan los numerosos sistemas de expresión disponibles para la expresión de proteínas, incluyendo E. coli, otros hospedadores bacterianos, levaduras y diversascélulas eucariotas superiores, como las líneas celulares COS, CHO, HeLa y mieloma.

Una o más secuencias de ADN que codifican el anticuerpo o el fragmento de dicho anticuerpo pueden expresarse *in vitro*por transferencia de ADN a una célula hospedadora adecuada.La célula puede ser procariota o eucariota.El término también incluye cualquier progenie de la célula hospedadora del sujeto.Se entiende que toda la descendencia puede no ser idéntica a la célula precursora ya que pueden producirse mutaciones durante la replicación.En la técnica se conocen métodos de transferencia estables, lo que significa que el ADN ajeno se mantiene continuamente en el hospedador. Esta divulgación abarca también hibridomas que expresan los anticuerpos de interés.

La expresión de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos aislados y los fragmentos de anticuerpo aquí descritos puede lograrse uniendo funcionalmente el ADN o ADNc a un promotor heterólogo (que puede ser constitutivo o inducible), para su posterior incorporación a un casete de expresión.Los casetes pueden ser adecuados para la replicación y la integración en procariotas o eucariotas.Los casetes de expresión típicos contienen secuencias específicas útiles para la regulación de la expresión del ADN que codifica la proteína.Por ejemplo, los casetes de expresión pueden incluir los promotores, potenciadores, terminadores de la transcripción y la traducción apropiados, secuencias de iniciación, un codón de inicio (es decir, ATG) delante del gen que codifica la proteína, la señal de corte y empalme para los intrones, el mantenimiento del marco de lectura correcto de ese gen para permitir la traducción apropiada del ARNm, y codones de parada.

Para obtener niveles de expresión elevados de un gen clonado, es deseable construir casetes de expresión que contengan, como mínimo, un promotor fuerte para la transcripción directa, un punto de unión de ribosoma para la iniciación de la traducción y un terminador de transcripción/traducción.Para E. coli, esto incluye un promotor, como por ejemplo los promotores T7, trp, lac o lambda, un punto de unión de ribosoma y preferiblemente una señal de terminación de la transcripción.Para células eucariotas, las secuencias de control pueden incluir un promotor y/o un potenciador derivado de, por ejemplo, un gen de inmunoglobulina, SV40 o citomegalovirus, y una secuencia de poliadenilación, y además puede incluir secuencias donantes y aceptadoras de corte y empalme.Los casetes pueden transferirse a la célula hospedadora escogida empleando métodos bien conocidos, tales como transformación o electroporación para E. coli y tratamiento con fosfato de calcio, electroporación o lipofección para células de mamífero.Las células transformadas por los casetes pueden seleccionarse según la resistencia a antibióticos conferida por los genes contenidos en las casetes, como los genes amp, gpt, neo y hyg.

Cuando el hospedador es una eucariota, se pueden utilizar métodos de transfección de DNA tales como coprecipitados de fosfato de calcio, procedimientos mecánicos convencionales como microinyección, electroporación, inserción de un plásmido encapsulado en liposomas, o vectores víricos.Las células eucariotas también se pueden cotransformar con secuencias polinucleotídicas que codifican el anticuerpo, el anticuerpo etiquetado o el fragmento de unión al antígeno de dicho anticuerpo, y una segunda molécula de ADN que codifica un fenotipo seleccionable, como por ejemplo el gen de la timidina quinasa del herpes simplex.Otro método consiste en utilizar un vector vírico eucariótico, como por ejemplo un virus del simio 40 (SV40) o virus del papiloma bovino, para infectar transitoriamente o transformar células eucariotas y expresar la proteína (véase, por ejemplo, Eukaryotic Viral Vectors, Cold Spring Harbor Laboratory, Gluzman ed., 1982).Los expertosen la técnica podrán utilizar fácilmente un sistema de expresión, como por ejemplo plásmidos y vectores de uso en la producción de proteínas en células, incluyendo células eucariotas superiores, como líneas celulares COS, CHO, HeLa y mieloma.

Pueden realizarse modificaciones en un ácido nucleico que codifica un polipéptido aquí descrito (es decir, un anticuerpo monoclonal humano específico de la endoplasmina o un inmunoconjugado que comprende el anticuerpo) sin merma de su actividad biológica.Pueden realizarse algunas modificaciones para facilitar la clonación, la expresión o la incorporación de la molécula de direccionamiento en una proteína de fusión.Tales modificaciones son bien conocidas por los expertosen la técnica e incluyen, por ejemplo, codones de terminación, una metionina añadida en el terminal amino para proporcionar un punto de iniciación, aminoácidos adicionales situados en cualquiera de los terminales para crear puntos de restricción convenientemente ubicados, o aminoácidos adicionales (como polihistidina) para ayudar en los pasos de purificación.Además de los métodos recombinantes, los inmunoconjugados, las fracciones efectoras y los anticuerpos de la presente divulgación pueden construirse en su totalidad o en parte utilizando la síntesis de péptidos estándar conocida en la técnica.

Una vez expresados, los inmunoconjugados recombinantes, los anticuerpos y/o las moléculas efectoras pueden ser purificados conforme a procedimientos estándar de la técnica, incluyendo la precipitación de sulfato amónico, columnas de afinidad, cromatografía en columna y similares (véase, en general, R. Scopes, PROTEIN PURIFICATION, Springer-Verlag, N.Y., 1982).No es preciso que los anticuerpos, los inmunoconjugados y las moléculas efectoras sean puros al 100 %.Una vez purificados, parcialmente o hasta la homogeneidad según se desee, los polipéptidos deberían estar sustancialmente libres de endotoxina si van a utilizarse terapéuticamente.

Se han descrito y son conocidos y aplicables a los anticuerpos aquí divulgados métodos para la expresión de anticuerpos monocatenarios y/o replegamiento a una forma activa adecuada, incluyendo anticuerpos monocatenarios procedentes de bacterias tales como E. coli.Véase Buchner et al., Anal. Biochem. 205:263-270, 1992; Pluckthun, Biotechnology 9:545, 1991; Huse et al., Science 246:1275, 1989 y Ward et al., Nature 341:544, 1989.

A menudo, proteínas heterólogas funcionales de E. coli u otras bacterias son aisladas a partir de cuerpos de inclusión y requieren solubilización utilizando desnaturalizantes potentes, para su posterior replegamiento.Durante el paso de solubilización, como es bien conocido en la técnica, debe estar presente un agente reductor para separar los enlaces de disulfuro.Un ejemplo de tampón con un agente reductor es:0,1 M Tris pH 8, 6 M guanidina, 2 mM EDTA, 0,3 M DTE (ditioeritritol).Puede producirse reoxidación de los enlaces de disulfuro en presencia de reactivos de tiol de bajo peso molecular en forma reducida y oxidada, como se describe en Saxena et al., Biochemistry 9: 5015-5021, 1970, y especialmente como describen Buchner et al., supra.

Típicamente, la renaturalización se consigue por dilución (por ejemplo, centesimal) de la proteína desnaturalizada y reducida en tampón de replegamiento.Un ejemplo de tampón es 0,1 M Tris, pH 0,5 M L-arginina, 8 mM glutatión oxidado (GSSG) y 2 mM EDTA.

Como modificación del protocolo de purificación del anticuerpo bicatenario, las regiones de cadenas pesada y ligera se solubilizan y reducen por separado y posteriormente se combinan en la solución de replegamiento.Se obtiene una producción ejemplar cuando estas dos proteínas se mezclan en una proporción molar, de modo que no se supere un exceso molar quíntuple de una proteína sobre la otra.El excedente de glutatión oxidado u otros compuestos oxidantes de bajo peso molecular pueden añadirse a la solución de replegamiento una vez completado el barajado de reducción-oxidación.

Además de los métodos recombinantes, los anticuerpos, los anticuerpos etiquetados y los fragmentos de unión al antígeno de dichos anticuerpos aquí divulgados también pueden construirse en su totalidad o en parte utilizando la síntesis de péptidos estándar.La síntesis de fase sólida de los polipéptidos de menos de aproximadamente 50 aminoácidos de longitud puede lograrse ligando el aminoácido del terminal C de la secuencia a un soporte insoluble, seguido de la adición secuencial de los aminoácidos remanentes en la secuencia.Técnicas para la síntesis de fase sólida son descritas por Barany & Merrifield, The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology. Vol. 2: Special Methods in Peptide Synthesis, Part A. pp. 3-284; Merrifield et al., J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2156, 1963, and Stewart et al., Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd ed., Pierce Chem. Co., Rockford, 1984. Pueden sintetizarse proteínas de mayor longitud mediante condensación de los terminales amino y carboxilo de fragmentos más cortos.En la técnica se conocen métodos para formar enlaces péptidos por activación de un extremo terminal carboxilo (como el uso del reactivo de acoplamiento N, N'-diciclohexilcarbodiimida).

VI. Composiciones y métodos terapéuticos

En la presente se describen composiciones que incluyen un vehículo y uno o más de los anticuerpos que se unen específicamente a la endoplasmina, o el fragmento de unión al antígeno de dicho anticuerpo que se une específicamente a la endoplasmina.También se divulgan composiciones que comprenden inmunoconjugados o inmunotoxinas.Las composiciones pueden prepararse en formas de dosificación unitarias para la administración a un sujeto.La cantidad y el momento de administración son a discreción del responsable del tratamiento para lograr los propósitos deseados.El anticuerpo puede ser formulado para la administración sistémica o local (como intratumoral).En un ejemplo, el anticuerpo que se une específicamente a la endoplasmina está formulado para la administración parenteral, por ejemplo administración intravenosa.

Las composiciones para administración pueden incluir una solución del anticuerpo que se une específicamente a la endoplasmina (o un fragmento funcional de dicho anticuerpo que se une específicamente a la endoplasmina) disuelto en un vehículo farmacéuticamente aceptable, como por ejemplo un vehículo acuoso.Se pueden utilizar diversos vehículos acuosos, como por ejemplo un tampón salino y similares.Estas soluciones son estériles y generalmente libres de sustancias indeseables.Estas composiciones pueden esterilizarse empleando técnicas de esterilización convencionales bien conocidas.Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables en la medida requerida para aproximarse a las condiciones fisiológicas, como agentes de ajuste de pH y de tampón, agentes de ajuste de la toxicidad y similares,por ejemplo acetato de sorio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio y similares.La concentración de anticuerpo en estas formulaciones puede variar en gran medida, y se seleccionará principalmente sobre la base de volúmenes de fluido, viscosidades, peso corporal y similares con arreglo al modo de administración concreto seleccionado y las necesidades del sujeto.

Una composición farmacéutica típica para la administración intravenosa incluye aproximadamente 0,1 a 10 mg de anticuerpo por sujeto al día.Pueden utilizarse dosis desde 0,1 hasta aproximadamente 100 mg al día, particularmente si el agente se administra en un lugar aislado, como por ejemplo en una cavidad corporal o en el lumen de un órgano, y no en el sistema circulatorio o linfático.Métodos reales para preparar composiciones administrables serán conocidos u obvios para los expertosen la técnica, y se describen con mayor detalle en publicaciones tales como Remington's Pharmaceutical Science, 19ª ed., Mack Publishing Company, Easton, PA (1995).

Los anticuerpos pueden suministrarse en forma liofilizada y rehidratados con agua estéril antes de la administración,

pese a que también se suministran en soluciones estériles con concentración conocida.A continuación se añade la solución de anticuerpos a una bolsa de infusión que contiene un 0,9 % de cloruro de sodio, USP, y se administra típicamente en una dosis de 0,5 a 15 mg/kg de peso corporal.En la técnica se dispone de experiencia considerable en la administración de fármacos con anticuerpos, que han sido comercializados en EE.UU. desde la aprobación de Rituxan® en 1997. Los anticuerpos pueden administrarse por infusión lenta, en lugar de por presión o bolo intravenoso.En un ejemplo se administra una dosis de carga mayor, con administración subsiguiente de dosis de mantenimiento menores.Por ejemplo, se puede administrar una dosis de 4 mg/kg por infusión durante un periodo de aproximadamente 90 minutos, seguida de dosis de mantenimiento de 2 mg/kg semanales durante 30 minutos a lo largo de 4-8 semanas si se toleró bien la dosis previa.

El anticuerpo que se une específicamente a la endoplasmina (o el fragmento de unión al antígeno o el inmunoconjugado de dicho anticuerpo) se puede administrar para ralentizar o inhibir el crecimiento de células, tales como células cancerosas.En estas aplicaciones, una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo se administra a un sujeto en una cantidad suficiente para inhibir el crecimiento, la replicación o la metástasis de células cancerosas, o para inhibir un signo o síntoma del cáncer.En algunas realizaciones, los anticuerpos se administran a un sujeto para inhibir o prevenir el desarrollo de metástasis, como micrometástasis, por ejemplo micrometástasis a los ganglios linfáticos regionales (Goto et al., Clin. Cancer Res. 14(11):3401-3407, 2008).

Los sujetos indicados pueden incluir aquellos diagnosticados con un cáncer que expresa endoplasmina, tales como, sin carácter limitativo, melanoma, cáncer de mama, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer renal, cáncer de pulmón, glioma, cáncer de vejiga, cáncer de ovario o cáncer de páncreas.Una cantidad terapéuticamente efectiva de anticuerpo específico de endoplasmina humana dependerá de la gravedad de la enfermedad y del estado general de salud del paciente.Una cantidad terapéuticamente efectiva de anticuerpo es aquella que proporciona un alivio subjetivo de un síntoma o síntomas o una mejora objetivamente identificable constatada por el facultativo u otro observador cualificado.Estas composiciones pueden administrarse en combinación con otro agente terapéutico, ya sea simultánea o secuencialmente.

Actualmente se conocen en la técnica muchos agentes quimioterapéuticos. En una realización, el agente quimioterapéuticos se selecciona del grupo formado por inhibidores mitóticos, agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos intercalantes, inhibidores del factor de crecimiento, inhibidores del ciclo celular, enzimas, inhibidores de la topoisomerasa, agentes antisupervivencia, modificadores de la respuesta biológica, antihormonas, p. ej., antiandrógenos y agentes antiangiogénicos.

Pueden utilizarse agentes antiangiogénicos, como inhibidores de MMP-2 (metaloproteinasa de matriz 2), inhibidores de MMP-9 (metaloproteinasa de matriz 9) e inhibidores de COX-II (ciclooxigenasa II) en combinación con un compuesto de la invención.Ejemplos de inhibidores COX-II útiles incluyen CELEBREX™(alecoxib), valdecoxib y rofecoxib.Ejemplos de inhibidores de metaloproteinasa de matriz útiles se describen en la Publicación PCT nº WO 96/33172 (publicada el 24 oct. 1996), Publicación PCT nº WO 96/27583 (publicada el 7 mar. 1996), Solicitud de Patente Europea nº 97304971.1 (presentada el 8 jul. 1997), Solicitud de Patente Europea nº 99308617.2 (presentada el 29 oct. 1999), Publicación PCT nº WO 98/07697 (publicada el 30 feb. 1998), Publicación PCT nº WO 98/03516 (publicada el 29 en. 1998), Publicación PCT nº WO 98/34918 (publicada el 13 ag. 1998), Publicación PCT nº WO 98/34915 (publicada el 13 ag. 1998), Publicación PCT nº WO 98/33768 (publicada el 6 ag. 1998), Publicación PCT nº WO 98/30566 (publicada el 16 jul. 1998), Publicación de Patente Europea nº 606.046 (publicada el 13 jul. 1994), Publicación de Patente Europea nº 931.788 (publicada el 28 jul. 1999), Publicación PCT nº WO 90/05719 (publicada el 31 may. 1990), Publicación PCT nº WO 99/52910 (publicada el 21 oct. 1999), Publicación PCT nº WO 99/52889 (publicada el 21 oct. 1999), Publicación PCT nº WO 99/29667 (publicada el 17 jun. 1999), Solicitud Internacional PCT nº PCT/IB98/01113 (presentada el 21 jul. 1998), Solicitud de Patente Europea nº 99302232.1 (presentada el 25 mar. 1999), Patente USAnº 5.863.949 (emitida el 26 de enero, 1999), Patente USAnº 5.861.510 (emitida el 19 en. 1999) y Publicación de Patente Europea nº 780.386 (publicada el 25 jun. 1997).En un ejemplo, los inhibidores de MMP no inducen artralgia al ser administrados.En otro ejemplo, el inhibidor de MMP inhibe selectivamente MMP-2 y/o MMP-9 con respecto a las demás metaloproteinasas de matriz (tales como MMP-1, MMP-3, MMP-4, MMP-5, MMP-6, MMP-7, MMP-8, MMP-10, MMP-11, MMP-12 y MMP-13).Algunos ejemplos específicos de inhibidores de MMP de uso son AG-3340, RO 32-3555, RS 13-0830, ácido 3-[[4-(4-fluoro-fenoxi)-bencenosulfonilo]-(1-hidroxicarbamoil-ciclopentil)-amino]-propiónico; hidroxiamida de ácido 3-exo-3-[4-(4-fluoro-fenoxi)-bencenosulfonilamino]-8-oxa-biciclo[3.2.1]octano-3-carboxílico; hidroxiamida de ácido (2R, 3R) 1-[4-(2-cloro-4-fluoro-benciloxi)-bencenosulfonil]-3-hidroxi-3-metil-piperidin-2-carboxílico; hidroxiamida de ácido 4-[4-(4-fluoro-fenoxi)-bencenosulfonilamino]-tetrahidro-piran-4-carboxílico; ácido 3-[[4-(4-fluoro-fenoxi)-bencenosulfonil]-(1-hidroxicarbamoil-ciclobutil)-amino]; hidroxiamida de ácido 4-[4-(4-cloro-fenoxi)-bencenosulfonilamino]-tetrahidropiran-4-carboxílico; hidroxiamida de ácido (R) 3-[4-(4-cloro-fenoxi)-bencenosulfonilamino]-tetrahidropiran-3-carboxílico; hidroxiamida de ácido (2R, 3R) 1-[4-(4-fluoro-2-metil-benciloxi)-bencenosulfonilo]-3-hidroxi-3-metil-piperidin-2-carboxílico; ácido 3-[[4-(4-fluoro-fenoxi)-bencenosulfonil] - (1-hidroxicarbamoil-1-metill-etil)-amino]-propiónico; ácido 3-[[4-(4-fluoro-fenoxi)-bencenosulfonil]-(4-hidroxicarbamoil-tetrahidropiran-4-il)-amino]-propiónico; hidroxiamida de ácido 3-exo-3-[4-(4-cloro-fenoxi)-benxenesulfonilamino]-8-oxaiciclo[3.2.1]octano-3-carboxílico; hidroxiamida de ácido 3-endo-3-[4-(4-fluoro-fenoxi)-bencenosulfonilamino]-8-oxa-iciclo[3.2.1]octano-3-carboxílico; e hidroxiamida de ácido (R) 3-[4-(4-fluoro-fenoxi)-bencenosulfonilamino]-tetrahidro-furan-3-carboxílico; y sales y solvatos farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos.

Los anticuerpos que se unen específicamente a la endoplasmina también pueden utilizarse con inhibidores de la

transducción de señales, como agentes capaces de inhibir las respuestas EGF-R (receptor del factor de crecimiento epidérmico 5), tales como anticuerpos EGF-R, anticuerpos EGF y moléculas inhibidoras de EGF-R; inhibidores de VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), tales como receptores de VEGF y moléculas capaces de inhibir VEGF; e inhibidores del receptor de erbB2, tales como moléculas orgánicas o anticuerpos que se unen al receptor de erbB2, como por ejemplo HERCEPTIN™ (Genentech, Inc.).Se describen inhibidores de EGF-R en, por ejemplo, las Publicaciones PCT nº WO 95/19970 (publicada el 27 jul. 1995), WO 98/14451 (publicada el 9 abr. 1998), WO 98/02434 (publicada el 22 en. 1998) y la Patente USAnº 5.747.498 (emitida el 5 de mayo de 1998).Los agentes inhibidores de EGFR también incluyen, sin carácter limitativo, los anticuerpos monoclonales C225 y anti-EGFR 22Mab (ImClone Systems Incorporated), ABX-EGF (Abgenix/Cell Genesys), EMD-7200 (Merck KgaA), EMD-5590 (Merck KgaA), MDX-447/H-477 (Medarex Inc. and Merck KgaA), y los compuestos ZD-1834, ZD-1838 y ZD- 1839 (AstraZeneca), PKI-166 (Novartis), PKI-166/CGP-75166 (Novartis), PTK 787 (Novartis), CP 701 (Cephalon), leflunomida (Pharmacia/Sugen), Cl-1033 (Warner Lambert Parke Davis), C1-1033/PD 183,805 (Warner Lambert Parke Davis), CL- 387,785 (Wyeth-Ayerst), BBR-1611 (Boehringer Mannheim GmbH/Roche), Naamidine A (Bristol Myers Squibb), RC-3940-II (Pharmacia), BIBX-1382 (Boehringer Ingelheim), OLX-103 (Merck & Co.), VRCTC-310 (Ventech Research), toxina de fusión EGF (Seragen Inc.), DAB-389 (Seragen/Lilgand), ZM- 252808 (Imperial Cancer Research Fund), RG-50864 (INSERM), LFM-A12 (Parker Hughes Cancer Center), WHI-P97 (Parker Hughes Cancer Center), GW-282974 (Glaxo), KT-8391 (Kyowa Hakko) y vacuna EGF-R (York Medical/Centro de Inmunología Molecular (CIM)).

Los inhibidores de VEGF, por ejemplo SU-5416 y SU-6668 (Sugen Inc.), SH-268 (Schering) y NX-1838 (NeXstar) se pueden utilizar también en combinación con un anticuerpo que se une específicamente a la endoplasmina.Se describen inhibidores de VEGF en, por ejemplo, la Publicación PCT nº WO 99/24440 (publicada el 20 de mayo, 1999), la Solicitud Internacional PCT PCT/IB99/00797 (presentada el 3 de mayo, 1999), la Publicación PCT nº WO 95/21613 (publicada el 17 ag. 1995), la Publicación PCT nº WO 99/61422 (publicada el 2 dic., 1999), la Patente USAnº 5.834.504 (emitida el 10 nov., 1998), la Publicación PCT nº WO 98/50356 (publicada el 12 nov., 1998), la Patente USAnº 5.883.113 (emitida el 16 mar., 1999), la Patente USAnº 5.886.020 (emitida el 23 mar., 1999), Patente USAnº 5.792.783 (emitida el 11 ag., 1998), la Publicación PCT nº WO 99/10349 (publicada el 4 mar., 1999), la Publicación PCT nº WO 97/32856 (publicada el 12 sep., 1997), la Publicación PCT nº WO 97/22596 (publicada el 26 jun., 1997), la Publicación PCT nº WO 98/54093 (publicada el 3 dic., 1998), la Publicación PCT nº WO 98/02438 (publicada el 22 en., 1998), la Publicación PCT nº WO 99/16755 (publicada el 8 abr., 1999), y la Publicación PCT nº WO 98/02437 (publicada el 22 en., 1998).Otros ejemplos de algunos inhibidores de VEGF específicos son IM862 (Cytran Inc.); anticuerpo monoclonal anti-VEGF de Genentech, Inc.; y angiozima, una ribozima sintética de Ribozyme y Chiron.Estos y otros inhibidores de VEGF pueden utilizarse en combinación con un anticuerpo que se une específicamente a la endoplasmina.

Además, pueden combinarse con el compuesto de la invención inhibidores del receptor de ErbB2, tales como GW-282974 (Glaxo Wellcome pic), y los anticuerpos monoclonales AR-209 (Aronex Pharmaceuticals Inc.) y 2B-1 (Chiron), por ejemplo aquellos indicados en la Publicación PCT nº WO 98/02434 (publicada el 22 en., 1998, la Publicación PCT nº WO 99/35146 (publicada el 15 jul., 1999), la Publicación PCT nº WO 99/35132 (publicada el 15 jul., 1999), la Publicación PCT nº WO 98/02437 (publicada el 22 en., 1998), la Publicación PCT nº WO 97/13760 (publicada el 17 abr., 1997), la Publicación PCT nº WO 95/19970 (publicada el 27 jul., 1995), la Patente USAnº 5.587.458 (emitida el 24 dic., 1996) y la Patente USAnº 5.87.305 (emitida el 2 mar., 1999).Los inhibidores del receptor de ErbB2 de uso se describen también en la Solicitud provisional USAnº60/117.341, presentada el 27 en.,1999, y en la Solicitud provisional USAnº 60/117.346, presentada el 27 en., 1999.

Los anticuerpos que se unen específicamente a la endoplasmina (o un fragmento de unión al antígeno de dichos anticuerpos) se pueden utilizar con, y/o conjugar con, una citoquina o una quimiocina, o se pueden conjugar con una citoquina o una quimiocina.Las citoquinas ejemplares incluyen, sin carácter limitativo, interferones (IFN), tales como IFN-α, IFN-β e IFN-γ); miembros de la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNFSF); hormona de crecimiento humana; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorrelaxina; hormona foliculoestimulante (FSH); hormona estimulante de la tiroides (TSH); hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; prostaglandina, factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario, proteína OB; factor de necrosis tumoral (TNF)-α; TNF-β; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso (NGF) tales como NGF-β; factor de crecimiento de plaquetas; factor de crecimiento transformante (TGF)-α; TGF-β; factores de crecimiento similares a la insulina I y II; eritropoyetina (EPO); factores estimulantes de colonias (CSF) tales como CSF de macrófagos (M-CSF); CSF de granulocitos-macrófagos (GM-CSF); y CSF de granulocitos (G-CSF); interleucinas (IL-1 a IL-21), ligando de kit o FLT-3, angiostatina, trombospondina y endostatina.Las quimiocinas adecuadas incluyen, pero sin limitarse a estas, RANTES, MCAF, MCP-1 y fractalquina.

Para el tratamiento del cáncer, por ejemplo melanoma, los anticuerpos aquí divulgados se pueden utilizar con tratamiento quirúrgico, o con otros agentes terapéuticos, incluyendo dacarbacina (también conocida como DTIC), temozolomida, inhibidores de PARP o interleucina-2 (IL-2) o interferón, por ejemplo interferón (IFN), o combinaciones de dichos agentes.Para el tratamiento de un melanoma superficial, los anticuerpos se pueden utilizar en combinación con imiquimod.Para el tratamiento del carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, los anticuerpos aquí divulgados se pueden utilizar en combinación con cirugía, radioterapia, quimioterapia, otros anticuerpos (tales como cetuximab y bevacizumab) o agentes terapéuticos de moléculas pequeñas (tales como erlotinib).

Se administran administraciones únicas o múltiples de las composiciones, dependiendo de la dosis y la frecuencia, en la medida requerida y tolerada por el paciente.En cualquier caso, para tratar al paciente de forma efectiva, la composición debería aportar una cantidad suficiente de al menos uno de los anticuerpos (o fragmentos de unión al antígeno de dichos anticuerpos) aquí divulgados.La dosis se puede administrar una sola vez, pero puede aplicarse periódicamente hasta que se haya logrado un resultado terapéutico o hasta que los efectos secundarios aconsejen la interrupción del tratamiento.En un ejemplo, se administra mediante infusión una dosis del anticuerpo durante treinta minutos en días alternos.En este ejemplo se pueden administrar aproximadamente de una a diez dosis, por ejemplo, se pueden administrar tres o seis dosis en días alternos.En otro ejemplo, se administra una infusión continua durante aproximadamente cinco a aproximadamente diez días.El sujeto puede ser tratado a intervalos regulares, por ejemplo mensualmente, hasta que se haya logrado un resultado terapéutico deseado.Generalmente, la dosis es suficiente para tratar o mitigar síntomas o signos de enfermedad sin producir una toxicidad inaceptable en el paciente.

Formulaciones parenterales de liberación controlada pueden realizarse como implantes, inyecciones oleosas o sistemas de partículas.Para una amplia vista de conjunto de sistemas de liberación de proteínas, véase Banga, A.J., Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems, Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, PA, (1995) incorporados aquí como referencia.Los sistemas de partículas incluyen microesferas, micropartículas, microcápsulas, nanocápsulas, nanoesferas y nanopartículas.Las microcápsulas contienen la proteína terapéutica, como una citotoxina o un fármaco, como núcleo central.En microesferas, el agente terapéutico está dispersado por toda la partícula.Las partículas, las microesferas y las microcápsulas de tamaño inferior a aproximadamente 1 µm se denominan generalmente nanopartículas, nanoesferas y nanocápsulas, respectivamente.Los capilares tienen un diámetro de aproximadamente 5 µm, de modo que tan solo las nanopartículas se administran intravenosamente.Las micropartículas tienen típicamente un diámetro aproximado de 100 µm y se administran por vía subcutánea o intramuscular.Véase, por ejemplo, Kreuter, J., Colloidal Drug Delivery Systems, J. Kreuter, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, NY, pp. 219-342 (1994); y Tice & Tabibi, Treatise on Controlled Drug Delivery, A. Kydonieus, ed., Marcel Dekker, Inc. New York, NY, pp. 315-339, (1992).

Se pueden utilizar polímeros para la liberación controlada de iones de las composiciones de anticuerpos aquí divulgadas.En la técnica se conocen varias matrices poliméricas degradables y no degradables para su uso en la liberación de fármacos controlada (Langer, Accounts Chem. Res. 26:537-542, 1993).Por ejemplo, el copolímero de bloque, polaxamer 407, existe como un líquido viscoso pero móvil a bajas temperaturas, pero forma un gel semisólido a temperatura corporal.Ha demostrado ser un vehículo efectivo para la formulación y la liberación sostenida de intercelucina-2 recombinante y ureasa (Johnston et al., Pharm. Res. 9:425-434, 1992; y Pec et al., J. Parent. Sci. Tech. 44(2):58-65, 1990).Alternativamente, se ha utilizado hidroxiapatita como microvehículo para la liberación controlada de proteínas (Ijntema et al., Int. J. Pharm. 112:215-224, 1994).En otro aspecto, se utilizan liposomas para la liberación controlada, así como para el direccionamiento del fármaco encapsulado en lípido (Betageri et al., Liposome Drug Delivery Systems, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA (1993)).Se conocen numerosos sistemas adicionales para la liberación controlada de proteínas terapéuticas (véanse Patente USAnº 5.055.303; Patente USAnº 5.188.837; Patente USAnº 4.235.871; Patente USAnº 4.501.728; Patente USAnº 4.837.028; Patente USAnº4.957.735; Patente USAnº 5.019.369; Patente USAnº 5.055.303; Patente USAnº 5.514.670; Patente USAnº 5.413.797; Patente USAnº 5.268.164; Patente USAnº 5.004.697; Patente USAnº 4.902.505; Patente USAnº 5.506.206; Patente USAnº 5.271.961; Patente USAnº 5.254.342 y Patente USAnº 5.534.496).

Se pueden utilizar anticuerpos monoclonales totalmente humanos que se unen específicamente a la endoplasmina, o fragmentos de unión al antígeno de dichos anticuerpos, enlazados de forma covalente a una molécula efectora, para diversos fines, incluyendo la radioinmunoterapia o la cirugía radioinmunoguiada.Por ejemplo, puede ligarse un anticuerpo contra endoplasmina a un isótopo radioactivo y utilizarse en la inmunoterapia para tratar un tumor que expresa endoplasmina.Un anticuerpo humano contra endoplasmina ligado de forma covalente a un isótopo radioactivo puede utilizarse para localizar un tumor en la cirugía radioinmunoguiada, a fin de posibilitar la extirpación quirúrgica del tumor.En una realización, se administran a un sujeto aproximadamente 10 mCi de un anticuerpo monoclonal humano contra endoplasmina radioetiquetado.En otras realizaciones, se administran a un sujeto aproximadamente 15 mCi, aproximadamente 20 mCi, aproximadamente 50 mCi, aproximadamente 75 mCi o aproximadamente 100 mCi de un anticuerpo monoclonal humano contra endoplasmina radioetiquetado.En otras realizaciones, se administran a un sujeto de aproximadamente 100 mCi a aproximadamente 100 mCi de un anticuerpo monoclonal humano contra endoplasmina radioetiquetado.

Un método para detectar tumores en un sujeto *in vivo* incluye la administración de un anticuerpo humano que se une específicamente a la endoplasmina, o un fragmento de unión al antígeno de dicho anticuerpo, formando un complejo con una molécula efectora, como un isótopo radioactivo.

Una vez transcurrido un lapso de tiempo suficiente para permitir que el anticuerpo radioetiquetado administrado localice el tumor, el tumor es detectado.En un ejemplo específico no limitativo, un complejo inmunitario radioetiquetado se detecta utilizando una sonda manual de detección gamma.En algunas realizaciones, el tumor se detecta mediante MRI, escaneo CT o escaneo PET.Se pueden detectar tumores primarios, tumores metastatizados o células que expresan endoplasmina.Por ejemplo, antes de la cirugía o el tratamiento se administra a un sujeto un anticuerpo monoclonal humano contra endoplasmina, formando un complejo con una molécula efectora, por ejemplo un isótopo radioactivo.En una realización específica, el paso de detección se lleva a cabo antes de la cirugía para

localizar el tumor.En otra realización, el paso de detección se lleva a cabo durante la cirugía, por ejemplo para detectar la ubicación del tumor antes de extirparlo, como en el caso de la cirugía radioinmunoguiada.Un anticuerpo monoclonal humano contra endoplasmina, formando un complejo con una molécula efectora, por ejemplo un isótopo radioactivo, también puede ser administrado a un sujeto tras la cirugía o el tratamiento, para determinar la efectividad del tratamiento, por ejemplo confirmando la extirpación completa del tumor, o para detectar una recurrencia del tumor.Así pues, los anticuerpos tienen utilidad como agentes terapéuticos (por ejemplo, para la inmunoterapia contra tumores) o para practicar cirugía radioinmunoguiada.

VI.Métodos y kits diagnósticos

En la presente se da a conocer un método para la detección de la expresión de endoplasmina *in vitro*.En un ejemplo, la expresión de endoplasmina se detecta en una muestra biológica.La muestra puede ser cualquier muestra, incluyendo aunque sin limitación, tejido de biopsias, autopsias y muestras de patología.Las muestras biológicas también incluyen secciones de tejidos, por ejemplo criosecciones tomadas con fines histológicos.Las muestras biológicas también incluyen fluidos corporales, tales como sangre, suero, plasma, esputo, líquido cefalorraquídeo u orina.

En varias realizaciones, se divulga un método para detectar una neoplasia maligna, como carcinoma de células escamosas (por ejemplo, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello), melanoma, cáncer renal, cáncer de pulmón, glioma, cáncer de vejiga, cáncer de ovario o cáncer de páncreas.Los anticuerpos que se unen específicamente a la endoplasmina, o fragmentos de unión al antígeno de dichos anticuerpos, se pueden utilizar para detectar endoplasmina en una muestra de suero de un sujeto para detectar cáncer en el sujeto, o para confirmar un diagnóstico de cáncer en el sujeto.

También se pueden utilizar los anticuerpos para identificar el original de una lesión metastásica.

La divulgación revela un método para detectar endoplasmina en una muestra biológica, donde el método incluye poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo humano que se une a la endoplasmina, o un fragmento de unión al antígeno de dicho anticuerpo, en condiciones propicias para la formación de un complejo inmunitario, y detectar el complejo inmunitario para detectar la endoplasmina en la muestra biológica.En un ejemplo, la detección de endoplasmina en la muestra indica que el sujeto padece una patología maligna.En otro ejemplo, la detección de endoplasmina en la muestra confirma el diagnóstico de cáncer en un sujeto.En otro ejemplo, la detección de endoplasmina confirma o detecta la presencia de metástasis.

En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal totalmente humano que se une específicamente a la endoplasmina, o el fragmento de unión al antígeno de dicho anticuerpo, se utiliza para la detección o el diagnóstico de un tumor en un sujeto, por ejemplo para confirmar el diagnóstico de un tumor en un sujeto.En otras realizaciones, el anticuerpo monoclonal totalmente humano que se une específicamente a la endoplasmina, o el fragmento de unión al antígeno de dicho anticuerpo, se utiliza para detectar la eficacia de una terapia.Por ejemplo, se administra un agente terapéutico a un sujeto con una neoplasia conocida que expresa endoplasmina.El método puede incluir poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo humano que se une a la endoplasmina, o un fragmento de unión al antígeno de dicho anticuerpo, en condiciones propicias para la formación de un complejo inmunitario, y detectar el complejo inmunitario para detectar la endoplasmina en la muestra biológica.Una disminución de la cantidad de endoplasmina en comparación con un control, como una muestra del sujeto antes del tratamiento o un estándar de referencia, indica que el agente terapéutico es efectivo para tratar la patología maligna.En algunos ejemplos, un incremento de la cantidad de endoplasmina en comparación con el control indica que el agente terapéutico no es efectivo para tratar la patología maligna.

En algunas realizaciones, la detección puede ser *in vivo*.El anticuerpo monoclonal humano que se une específicamente a la endoplasmina, o un fragmento de unión al antígeno de dicho anticuerpo, puede ser ligado a un isótopo radioactivo para formar un complejo.Una vez transcurrido un lapso de tiempo suficiente para permitir que el anticuerpo radioetiquetado administrado localice el tumor, el tumor es detectado, por ejemplo mediante MRI, escaneo CT o escaneo PET (véase arriba).

En una realización, el anticuerpo humano que se une específicamente a la endoplasmina o un fragmento de unión al antígeno de dicho anticuerpo se etiqueta directamente con una etiqueta detectable.En otra realización, el anticuerpo humano que se une específicamente a la endoplasmina o el fragmento de unión al antígeno de dicho anticuerpo (el primer anticuerpo) no está etiquetado y un segundo anticuerpo u otra molécula que puede unirse al anticuerpo humano que se une específicamente a la endoplasmina está etiquetado.Como bien conocen los expertos en la técnica, se elige un segundo anticuerpo capaz de unirse específicamente a la especie y la clase específicas del primer anticuerpo.Por ejemplo, si el primer anticuerpo es una IgG humana, el anticuerpo secundario puede ser una IgG antihumana.Otras moléculas que pueden unirse a anticuerpos incluyen, sin carácter limitativo, la proteína A y la proteína G, las cuales están disponibles comercialmente.

Más arriba se describen etiquetas adecuadas para el anticuerpo o anticuerpo secundario, e incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, agentes magnéticos y materiales radioactivos.Ejemplos no limitativos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano silvestre, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa.Ejemplos no limitativos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina.Ejemplos no limitativos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbelliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriacinilamina

fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina.Un ejemplo no limitativo de material luminiscente es el luminol; un ejemplo no limitativo de agente magnético es el gadolinio, y ejemplos no limitativos de etiquetas radioactivas incluyen ^{35}S, ^{11}C, ^{13}N, ^{15}O, ^{18}F, ^{19}F, ^{99M}Tc, ^{131}I, ^{3}H, ^{14}C, ^{15}N, 90Y, ^{99}Tc, ^{111}In e ^{125}I.

En una realización alternativa, la endoplasmina puede ensayarse en una muestra biológica con un inmunoensayo competitivo utilizando estándares de endoplasmina etiquetados con una sustancia detectable y un anticuerpo humano no etiquetado que se une específicamente a la endoplasmina.En este ensayo se combinan la muestra biológica, los estándares de endoplasmina etiquetados y el anticuerpo humano no etiquetado que se une específicamente a la endoplasmina o un fragmento de unión al antígeno de dicho anticuerpo, y se determina la cantidad de estándar de endoplasmina etiquetado unido al anticuerpo no etiquetado.La cantidad de endoplasmina en la muestra biológica es inversamente proporcional a la cantidad de estándar de endoplasmina etiquetado unido al anticuerpo que se une específicamente a la endoplasmina o al fragmento de unión al antígeno de dicho anticuerpo.

Los inmunoensayos y métodos aquí divulgados pueden utilizarse para diversos fines.En una realización, el anticuerpo humano que se une específicamente a la endoplasmina, o el fragmento de unión al antígeno de dicho anticuerpo, se puede utilizar para detectar la producción de endoplasmina en células en un cultivo celular.En otra realización, se puede utilizar el anticuerpo para detectar la cantidad de endoplasmina en una muestra biológica.

El aumento de la expresión de endoplasmina está asociado a diversos tipos de cáncer, incluyendo sin limitación, melanoma, cáncer de mama, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer renal, cáncer de pulmón, glioma, cáncer de vejiga, cáncer de ovario o cáncer de páncreas.En una realización, se suministra un kit para detectar endoplasmina en una muestra biológica, por ejemplo una muestra de suero o de tejido.Por ejemplo, para confirmar un diagnóstico de cáncer en un sujeto, se puede realizar una biopsia para obtener una muestra de tejido para su examen histológico.Alternativamente, se puede obtener una muestra de suero para detectar la presencia de proteína endoplasmina.Los kits para detectar un polipéptido comprenderán típicamente un anticuerpo humano que se une específicamente a la endoplasmina, como por ejemplo cualquiera de los anticuerpos aquí divulgados.En algunas realizaciones se incluye en el kit un fragmento de anticuerpo, por ejemplo un fragmento Fv o Fv monocatenario, o un Fab.En otra realización, el anticuerpo está etiquetado (por ejemplo, con una etiqueta fluorescente, enzimática o radioactiva).

En una realización, un kit incluye materiales instructivos que divulgan medios de uso de un anticuerpo que se une específicamente a la endoplasmina.Los materiales instructivos pueden ser escritos, en forma electrónica (como un disquete de ordenador o disco compacto) o pueden ser visuales (como archivos de vídeo).Los kits también pueden incluir componentes adicionales para facilitar la aplicación concreta para la que está diseñado el kit.Así, por ejemplo, el kit puede contener adicionalmente medios para detectar una etiqueta (como sustratos de enzima para etiquetas enzimáticas, juegos de filtros para detectar etiquetas fluorescentes, etiquetas secundarias adecuadas como un anticuerpo secundario, o similares).Los kits pueden incluir adicionalmente tampones y otros reactivos utilizados rutinariamente para la implementación de un método específico.Tales kits y los contenidos adecuados son conocidos por los expertos en la técnica.

En una realización, el kit diagnóstico comprende un inmunoensayo.Aunque los detalles de los inmunoensayos pueden variar en función del formato concreto empleado, el método para detectar endoplasmina en una muestra biológica incluye generalmente los pasos de poner la muestra biológica en contacto con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que reacciona específicamente, en condiciones inmunológicamente reactivas, para crear un polipéptido de endoplasmina.Se deja al anticuerpo que se una específicamente en condiciones inmunológicamente reactivas, para formar un complejo inmunitario, y la presencia del complejo inmunitario (anticuerpo ligado) se detecta directa o indirectamente.

Cuando se utiliza el anticuerpo para detectar cáncer o confirmar el diagnóstico de cáncer en un sujeto, la información sobre el diagnóstico puede visualizarse en un medio de expresión, por ejemplo un medio electrónico o de papel.Un medio electrónico puede incluir, por ejemplo, una base de datos informática, un monitor de visualización o un historial médico electrónico.Un medio de papel incluye, por ejemplo, un resultado de ensayo o un registro en papel registrado por un laboratorio o facultativo.

En algunas realizaciones, una vez confirmado el diagnóstico del tumor (por ejemplo, el melanoma), se trata al sujeto para combatir el tumor (por ejemplo, el melanoma).Por ejemplo, el tratamiento puede incluir la extirpación quirúrgica de una lesión primaria o metastásica y/o la administración de un régimen quimioterapéutico para el tratamiento de la enfermedad.

En la técnica se conocen métodos para determinar la presencia o ausencia de un marcador de la superficie celular. Por ejemplo, los anticuerpos pueden conjugarse con otros compuestos, incluyendo sin limitación, enzimas, nanoperlas magnéticas, nanoperlas magnéticas coloidales, haptenos, fluorocromos, compuestos metálicos, compuestos radioactivos o fármacos.Los anticuerpos también pueden utilizarse en inmunoensayos como, sin limitación, ensayos radioinmunológicos (RIA), ensayos por inmunoadsorción ligados a enzimas (ELISA) o ensayos inmunohistoquímicos).Los anticuerpos también pueden utilizarse para la microscopía de fluorescencia o la clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS).Una FACS emplea una pluralidad de canales de color, canales de detección de dispersión de luz de ángulo bajo y obtusa y canales de impedancia, entre otros niveles de detección más sofisticados, para separar o clasificar células (véase la Patente USAnº 5.061.620).En estos ensayos puede utilizarse cualquiera de los anticuerpos humanos que se unen específicamente a la endoplasmina divulgados

en el presente documento.Así pues, los anticuerpos pueden utilizarse en un inmunoensayos convencional, incluyendo sin limitación, un ELISA, un RIA, FACS, inmunohistoquímica tisular, Western blot o inmunoprecipitación.

Salvo que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la técnica a la que pertenece esta divulgación.Las formas singulares «un/a» y «el/la» incluyen referentes plurales, a no ser que el contexto dicte claramente lo contrario.Similarmente, se entiende que la palabra «o» incluye «y», a no ser que el contexto dicte claramente lo contrario.Asimismo, debe entenderse que todos los tamaños de bases o tamaños de aminoácidos, y todos los valores de peso molecular o masa molecular dados para los ácidos nucleicos o polipéptidos son aproximados, y se proporcionan con fines descriptivos.Si bien para la práctica o la prueba de la presente divulgación pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los aquí descritos, a continuación se describen métodos y materiales adecuados.El término «comprende» significa «incluye».En caso de conflicto, prevalecerá la presente especificación, incluyendo las explicaciones de términos.Además, los materiales, métodos y ejemplos tienen carácter únicamente ilustrativo y no pretenden ser limitativos.

La divulgación se ilustra mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

EJEMPLOS DE REFERENCIA

Pruebas clínicas convincentes han demostrado que la inmunoterapia basada en anticuerpos puede ser efectiva en el tratamiento de neoplasias hematológicas y tumores sólidos.Para eliminar la influencia de la inmunogenicidad de los antígenos tumorales sobre la especificidad de los anticuerpos desarrollados, se utilizó una biblioteca de región variable monocatenaria (scFv) en fagos sintéticos para aislar anticuerpos humanos que reconocen moléculas de la superficie celular que presentan niveles aumentados en células malignas.Se aislaron anticuerpos que se unen específicamente a la endoplasmina.

La inmunopurificación de la biblioteca de fagos sintéticos scFv con la línea celular humana de melanoma WM1158 ha dado como resultado el aislamiento de un fragmento de Fv monocatenario, denominado W9, que muestra una elevada reactividad con un amplio panel de líneas celulares humanas.El análisis SDS-PAGE del antígeno inmunoprecipitado por el Fv monocatenario W9 a partir de líneas celulares identificó un componente de 94-KDa.El determinante reconocido por el Fv monocatenario W9 incluye carbohidratos, puesto que su expresión se redujo significativamente en células incubadas con tunicamicina.El análisis basado en espectrometría de masas de la banda inmunoprecipitada por el Fv monocatenario W9 a partir de varias líneas celulares identificó el componente de 94-KDa como endoplasmina, un miembro de la familia de chaperonas moleculares 90-KDa.Esta conclusión se corroboró por la reactividad del Fv monocatenario W9 con la endoplasmina (Grp94) proteína canina recombinante, que presenta una homología del 98,5 % en la secuencia de aminoácidos con la endoplasmina humana (Grp94).El determinante reconocido por el Fv monocatenario W9 no se expresa en células normales.El anticuerpo fue efectivo al inducir apoptosis e inhibió el crecimiento de las células cancerosas.Así pues, los resultados aquí divulgados documentan que los anticuerpos que se unen específicamente a la endoplasmina, tales como el Fv monocatenario W9, son útiles para la inmunoterapia de enfermedades malignas.Estos anticuerpos también pueden utilizarse para detectar la enfermedad maligna.

Ejemplo 1

Materiales y métodos

En los ejemplos presentados a continuación se utilizaron los siguientes materiales y métodos:

Líneas celulares:las líneas celulares humanas del melanoma WM1158, MV3, COLO38, SK-MEL-28, M14 y FO-1, las líneas celulares humanas del carcinoma de mama SUM149, MDA- MB-435s, MCF-7, T47D, la línea celular humana del cáncer de cabeza y cuello PCI-13, las líneas celulares humanas del cáncer pancreático Pane 2.03, Pane 3.27, Pane 10.05, la línea celular humana del cáncer de colon 40-16, la línea humana celular del cáncer renal SLR21, la línea celular humana del cáncer de próstata Dul45, la línea celular humana del cáncer de ovario OVCAR3, la línea celular humana del glioma U-138 , la línea celular humana del cáncer cervical HeLa y la línea celular humana de células B linfoides LG2 fueron mantenidas en medio RPMI1640 (Cellgro, Mediatech, Washington, DC, EE.UU.) suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (FBS: BioWhittaker, Walkersville, MD, EE.UU) y 2 mM de L-glutamina (BioWhittaker).La línea celular humana del cáncer de vejiga T24, la línea celular humana del cáncer de pulmón A549, la línea celular humana del cáncer epidermoide A431, la línea celular humana del glioma A-172 y la línea celular humana 293 fueron cultivadas en medio DMEM (Lonza, Verviers, Bélgica) suplementado con un 10 % de FBS. Se cultivaron las células a 37 °C en una atmósfera con un 5 % de CO_2.

Anticuerpos monoclonales, anticuerpos Fv monocatenarios y reactivos:Ya se han descrito previamente el mAb 9E10 de ratón específico de la oncoproteína C-myc (Evan, et al., Mol Cell Biol, 1985 Dec; 5(12):3610-6) y el mAb TP25.99 de ratón específico del antígeno HLA-clase I (D'Urso et al., J Clin Invest. 1991 enero; 87(1): 284-292). The Fv monocatenario anti-anti-id nº 119 (Wang et al., 1997. The anti-idiotypic approach to active specific immunotherapy of malignant melanoma. In idiotypes in Medicine: Autoimmunity, Infection and Cancer. Y. Shoenfeld, R. Kennedy, and S. Ferrone, eds. Elsevier, Ámsterdam, p. 523) fue aislado a partir de la biblioteca de Fv monocatenarios sintéticos (nº 1) (Nissim et al., 1994. Embo J 13:692-698) mediante inmunopurificación con el mAb MK2-23 anti-id.Se purificaron mAb de ratón a partir de líquido ascítico mediante precipitación secuencial con sulfato de amonio y ácido caprílico (Temponi et al,. 1989, Hybridoma 8:85-95).La pureza y la actividad de las preparaciones de mAb se evaluaron

mediante SDS-PAGE y mediante ensayo con el antígeno correspondiente en un ensayo de unión, respectivamente.Se adquirieron anticuerpos Fc IgG HRP-antirratón de Jackson ImmunoResearch (Laboratories, Inc., West Grove, PA, EE.UU.).Se adquirieron fragmentos F(ab')2 etiquetados con R-ficoeritrina (RPE) de anticuerpos Ig de cabra antirratón de BD Pharmingen (San Diego, CA, EE.UU.).La endoplasmina (Grp94) proteína canina recombinante se adquirió a Stressgen Biothecnology Corporation (Victoria, British Columbia, Canadá).

Bibliotecas de expresión en fago:La biblioteca semisintética de fagos de anticuerpos humanos Fv monocatenarios (scFv) se construyó de la manera descrita por Nissim et al. 1994, Embo J 13:692-698).

Selección de anticuerpos Fv monocatenarios de expresión en fago:los anticuerpos Fv monocatenarios de expresión en fago que se unen a las células de melanoma se aislaron a partir de la biblioteca de anticuerpos Fv monocatenarios de expresión en fago, de la manera previamente descrita (Noronha et al. 1998, J Immunol 161:2968-2976).Se añadieron brevemente partículas de fago ($1x10^3$) al tubo de cultivo de polipropileno que contenía $1x10^7$ células de melanoma WM1158.Tras 90 min de incubación a temperatura ambiente, se eliminaron los fagos no unidos lavando las células seis veces con PBS.

Los fagos unidos se eluyeron añadiendo 200 µl de 0,1 M glicina-HCl (pH= 2,2).Tras cuatro ciclos de inmunopurificación, los clones aislados se adsorbieron con células linfoides humanas cultivadas LG2 B para eliminar los fagos unidos a los antígenos compartidos por las células del melanoma y linfoides humanas.

Ensayo de unión:el ELISA para ensayar la reactividad del anticuerpo Fv monocatenario W9 soluble a las líneas celulares tumorales y la endoplasmina (Grp94) proteína canina recombinante se llevó a cabo de la manera descrita (Noronha et al., 1998, J Immunol 161:2968-2976).

Los resultados se expresan como absorbancia de densidad óptica (O.D.) a 450 nm.

Experimentos de inmunoprecipitación:se lavaron células WM1158 (3×10^7), se peletizaron y se lisaron en 1,5 ml de tampón de lisis (50 mmol/L Tris, 4 mmol/L EDTA, 150 mmol/L NaCl, 0,5 % NP40 con 1 mmol/L de fluoruro de fenilmetilsulfonilo) que contenía inhibidores de la proteasa.Tras 30 min de incubación en hielo, se centrifugó el lisado celular a 13 000xg durante 30 min a 4 °C. Se recogió el sobrenadante, se preaclaró mediante incubación con PG-sefarosa (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia), y se transfirió a un tubo que contenía 15 µl de proteína empaquetada G sefarosa, previamente armada con 15 µg de mAb 9E10 y la preparación periplásmica de Fv monocatenario W9, y 119 (control negativo).Tras 2 h de incubación a 4 °C, se lavaron 4 veces las nanoperlas con PBS, dos veces con tampón altamente salino (350 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 10 mmol/L Tris, 0,1% de albúmina de suero bovino, 1 % de NP40) y dos veces con tampón de lisis.Las proteínas precipitadas se eluyeron en tampón de muestra SDS, se resolvieron en un gel de SDS-poliacrilamida Tris-HCl al 12 % reductor y se tiñeron con azul de Coomassie.

Tratamiento con tunicamicina:se cultivaron células COLO38 en presencia de 0,5 µg/ml de tunicamicina (MP Biomedicals, Solon, OH, EE.UU.) durante 72 horas a 37 °C en una atmósfera con un 5 % de CO_2. Se utilizaron como control células incubadas en medio con tan solo DMSO.

Transfección:se transfectaron células 293 con 3 µg de clon de ADNc Grp 94 HSP90B1 (Origene) utilizando la tecnología de nucleofección Amaxa y siguiendo las instrucciones del fabricante (Amaxa, Cologne, Alemania).Se utilizó el programa nucleofector Q-001.Tras la transfección, se suspendieron inmediatamente células en 500 µl de medio de cultivo DMEM precalentado suplementado con un 10 % de FBS y se sembraron durante 24 horas en placas de 6 pocillos en un incubador humidificado a 37 °C, 5 % CO_2.La eficiencia de la transfección se determinó mediante análisis citométrico de flujo de GFP.Se utilizó como control el vector pCMV6-XL4.La transfección con lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) se llevó a cabo conforme a las instrucciones del fabricante.La transfección de células con endoplasmina (Grp94) siRNA y el control siRNA (conjugado de fluoresceína)-A (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EE.UU.) se llevó a cabo conforme a las instrucciones del fabricante.

También se utilizaron los siguientes materiales y métodos (véanse los ejemplos 5 y 9):Líneas celulares, lisados celulares y tejidos.Las líneas celulares humanas del melanoma M21, MV3 y SK-MEL-5, las líneas celulares humanas del adenocarcinoma pancreático MiaPaCa-2 y PANC1, la línea celular humana del glioma U1338MG, las líneas celulares humanas del carcinoma de mama SUM149 y MDA-MB-231, la línea celular humana del mesotelioma Phi, la línea celular humana del cáncer de colon RKO, la línea celular humana del cáncer de ovario OVCAR3, la línea celular humana del sarcoma HT1080, la línea celular humana de células B linfoides RAJI y la línea celular de ratón de mieloma NSO fueron mantenidas en medio RPMI1640 suplementado con 2 mM de L-glutamina (Cellgro).un 10 % de suero fetal bovino (FBS) (PAA Laboratories Inc).Se cultivaron las células a 37 °C en una atmósfera con un 5 % de C02.Se prepararon los lisados celulares de la forma descrita (Desai et al.. Cancer Res 1998;58(11):2417-25).

Animales.Se obtuvieron ratones C.B-17 SCID (8-10 semanas de edad) de Taconic Farms, Inc.

Anticuerpos monoclonales y policlonales, anticuerpos Fv monocatenarios y reactivos.El mAb TP25.99 de ratón específico del antígeno HLA-clase I TP25.99 (Desai et al., J Immunol 2000; 165(6):3275-83) y el mAb TO-5 específico de calnexina (usado como control de carga) se desarrollaron y caracterizaron de la manera descrita (Ogino et al., Tissue Antigens 62:385-393, 2003).

Las inmunoglobulinas humanas purificadas se adquirieron a Sigma-Aldrich.Anticuerpos específicos de FAK y FAK fosforilada (Tyr397) y de ERK1/2 y 44/42 ERK1/2 fosforilada, AKT y 473 AKT fosforilada, MET, MET fosforilada,

PKC, β-catenina, Ras, B-Raf, C-Raf, caspasa-3 escindida, caspasa 7 escindida SHh,GLI1 y β-actina fueron adquiridos a BD Bioscience y a Cell signaling technology.El anticuerpo de rata contra endoplasmina (Grp94) fue adquirido a StressGen.Se purificaron mAb de ratón a partir de líquido ascítico mediante precipitación secuencial con sulfato de amonio y ácido caprílico (Temponi et al, Hybridoma 1989;8(l):85-95).La pureza y la actividad de las preparaciones de mAb se evaluaron mediante SDS-PAGE y mediante ensayo con el antígeno correspondiente en un ensayo de unión, respectivamente.

Los anticuerpos HRP antirratón, anticonejo y de rata y fragmentos F(ab')2 etiquetados con RPE de anticuerpo Fcγ contra IgG humana fueron adquiridos a Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc. Los F(ab')2 etiquetados con RPE de anticuerpos contra Ig de ratón fueron adquiridos a BD Pharmingen.

Construcción de mAb W9 totalmente humano.El gen que codifica las regiones variables ligera (VL) y pesada (VH) del Fv monocatenario Fv W9 se amplificaron mediante PCR y se clonaron en pFUSE2-CLIg-hk y pFUSE-CHIg-hGl, respectivamente (InvivoGen), utilizando el DNA Ligation Kit, MIGHTY MIX® (TAKARA Bio USA) conforme a las instrucciones del fabricante.

Expresión y purificación de mAb W9 totalmente humano.Los plásmidos de expresión pFUSE2-CLIg-hk y pFUSE-CHIg-hG1 se cotransfectaron en la línea celular de mieloma de ratón NSO utilizando electroporación (GENE PULSER® II Electroporation System Bio-Rad) conforme a las instrucciones del fabricante.Las células transfectadas se seleccionaron en medio RPMI 1640 suplementado con un 10 % de FCS , zeocina (50 µg/mL) y blasticidina S (10 µg/mL).A continuación, las células resistentes a la zeocina y la blasticidina S se subclonaron monocelularmente mediante dilución limitadora.Los sobrenadantes agotados de células subclonadas se cribaron mediante ELISA para determinar la expresión Fc y $(Fab')_2$ humanos y la reactividad con los antígenos correspondientes.El mAb W9 totalmente humano fue purificado a partir de sobrenadante de cultivo agotado o ascites de ratón, utilizando columnas HITRAP® protein G HP (GE healthcare) conforme a las instrucciones del fabricante.La pureza y la actividad del mAb W9 purificado se determinaron mediante SDS-PAGE y ensayos de unión de antígenos, respectivamente.

Desglicosilación de endoplasmina (Grp94).Se incubaron Grp94+ células MIAPaCa-2 ($5x10^5$) con o sin 2 µl de PNGase F, 2 µl de O-glicosidasa y 2 µl de α-2(3,6,8.9)-neuraminidasa (Enzymatic Protein Degylcosylation Kit, Sigma) en 50 µl de medio RPMI1640 durante 24 horas a 37 °C. A continuación, las células tratadas se tiñeron con mAb W9 y se analizaron mediante citometría de flujo (Cyan, Beckman Coulter).

Análisis por citometría de flujo.Se incubaron células (2×10^5) durante 30 min a 4 °C con 2 µg/ml de mAb W9 (diluido en un volumen total de 100 µl de BSA-PBS al 2 %).A continuación se lavaron dos veces las células con BSA-PBS al 5 % y se incubaron durante 30 min a 4 °C con una cantidad óptima de fragmentos F(ab')2 de anticuerpo Fcγ de cabra contra IgG humana etiquetado con RPE (Jackson ImmunoResearch, Inc).Tras tres lavados, se fijaron las células en formaldehído al 2 % y se analizaron con un citómetro de flujo CYAN™ ADP LX 9 Color (Dako). Se utilizaron como control mAb TP25.99 e inmunoglobulinas humanas.Para el ensayo de unión de células iniciadoras de cáncer, previamente se tiñeron las células con ALDEFLUOR® (Stem Cell Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Inmunohistoquímica.Se fijaron con formaldehído al 4 %/PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente criosecciones de una lesión de adenocarcinoma pancreático humano extirpada quirúrgicamente y tejido pancreático normal.La tinción IHC de portaobjetos TMA con scFv-FcC21 se llevó a cabo de la manera descrita (Wang et al., Curr. Mol. Med 2010).Se capturaron imágenes de los portaobjetos de micromatriz utilizando el microscopio OLYMPUS® BX51 (OLYMPUS UK Ltd) con 200 aumentos para el examen.

Proliferación celular y ensayos MTT.Se sembraron células con una densidad de 1×10^4 por pocillo en placas de 96 pocillos, y se incubaron durante 3 días con mAb W9 (5 µg/ml) en medio suplementado con un 1 % de FBS.Se midieron los números de células viables en diferentes momentos añadiendo 10 µl por pocillo de componente de tetrazolio bromuro de metiltiazolildifenil-tetrazolio (Sigma-Aldrich, Inc. St Louis, MO) y se incubó la mezcla durante aproximadamente 3-4 horas a 37 °C. Las células viables metabólicamente activas convirtieron el MTT en un producto de formazán coloreado que se midió en un lector de microplaca espectrofotométrico (MTX Lab System, Inc, Vienna, VA) a 540 nm.Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición de células vivas, utilizando como referencia del 100 % el número de células vivas incubadas solo con PBS.

Apoptosis.Tras una incubación de 6 horas con mAb W9 (50 µg/mL) se llevó a cabo un análisis por citometría de flujo de células MV3 y MIAPaca-2 apoptóticas y necróticas con el kit de tinción de anexina V-FTIC y yoduro de propidio (PI) (BD PharMingen), siguiendo las especificaciones del fabricante.

Western Blot.Las proteínas en lisados celulares se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico al 8 % (SDS-PAGE) y se transfirieron a membranas PVDF de 0,45 µm (tamaño de poro) (Millipore).Tras bloquear con leche deshidratada sin grasa al 5 % más BSA al 2 % durante la noche a 4 °C, se incubaron secuencialmente durante la noche las membranas con la concentración adecuada de anticuerpos primarios a 4 °C, y los respectivos anticuerpos secundarios etiquetados con HRP se incubaron durante 45 min a temperatura ambiente.Se visualizaron las bandas mediante el sistema de quimioluminiscencia ampliado (GE Life Science), y se leyó la densidad de las bandas mediante el sistema FOTO/Analyst® Investigator Eclipse (Fotodyne Incorporate).Como control de carga se utilizaron mAb TO-5 específicos de la calnexina y mAb específicos de la β-actina.

Inmunoprecipitación.Las células MV3 ($3x10^7$) se lavaron, peletizaron y lisaron en 1,5 ml de tampón de lisis (50 mmol/L Tris, 4 mmol/L EDTA, 150 mmol/L NaCl, 0,5 % NP40 con 1 mmol/L de fluoruro de fenilmetilsulfonilo) que contenía inhibidores de la proteasa.Tras 30 minutos de incubación en hielo, se centrifugó el lisado celular a 13 000xg durante 30 min a 4 °C. Se recogió el sobrenadante, se preaclaró mediante incubación con PG-sefarosa (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suecia), y se transfirió a un tubo que contenía 10 µl de proteína empaquetada G sefarosa, previamente armada con 10 µg de mAb W9.Tras 2 horas de incubación a 4 °C, se lavaron 4 veces las nanoperlas con PBS, dos veces con tampón altamente salino (350 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 10 mmol/L Tris, 0,1% de albúmina de suero bovino, 1 % de NP40) y dos veces con tampón de lisis.Las proteínas precipitadas se eluyeron en tampón de muestra SDS, se resolvieron en un gel de SDS-poliacrilamida Tris-HCl al 12 % reductor y se transfirieron a membranas PVDF de 45 µm (tamaño de poro) (Millipore).Se llevó a cabo la transferencia de la manera previamente descrita.

ADCC:Se etiquetaron células MV3 con 50 µCi de ^{51}Cr (Perkin Elmer) y se resuspendieron con una densidad de 0,4 x 10^6 células/ml.Las células etiquetadas con ^{51}Cr se mezclaron con mAb W9 (50, 10 y 2 µg/ml) en una placa de ensayo de cultivo celular con base en U de 96 pocillos (BD. Falcon).Se utilizaron como control inmunoglobulinas humanas.Tras 30 minutos de incubación a 4 °C, se añadieron PBMC (40:1 efector a diana (E:T)) y se incubaron durante 4 horas a 37 °C en un incubador de CO_2.Se determinó la liberación de ^{51}Cr contando el sobrenadante libre de células utilizando un contador de centelleo en microplaca Packard TOPCOUNT™ (Conroe).El experimento se llevó a cabo dos veces por triplicado.

CDC.Se etiquetaron células diana MV3 con 50 µCi de ^{51}Cr y se resuspendieron con una densidad de 1 x 10^6 células/ml.Se incubaron las células MV3 con mAb W9 (50, 10 y 2 µg/ml) en presencia de complemento de suero humano (Quidel) diluido cuatro veces en RPMI 1640, 10 mM HEPES, 0,1 % BSA.Se utilizaron como control inmunoglobulinas humanas.Tras 2 horas de incubación a 37 ℃ en un incubador de CO_2, se determinó la liberación de ^{51}Cr contando el sobrenadante libre de células utilizando un contador de centelleo en microplaca Packard TOPCOUNT™.El experimento se llevó a cabo dos veces por triplicado.

Tratamiento de ratones portadores de metástasis en pulmón derivada de células de melanoma humanas.Se inyectaron intravenosamente (i.v.) ratones SCID hembra de ocho semanas de edad con las células de melanoma humanas MV3 (1,4 x 10^8 células/ratón).Quince días después de la inyección i.v. de células, se dividieron aleatoriamente los ratones en dos grupos de 13 ratones cada uno.Un grupo de ratones fue inyectado i.v. con mAb W9 (100 µg/por ratón) cada 48 horas para un total de 3 inyecciones.El otro grupo de ratones fue inyectado i.v. con inmunoglobulinas humanas aplicando el mismo esquema.El día 25 se sacrificaron los ratones, se cosecharon los pulmones y se sometieron a FFPE.Se examinaron microscópicamente secciones de tejido pulmonar teñidas con H&E en busca de metástasis.

Análisis estadístico.La significación estadística de la diferencia entre los resultados obtenidos en los grupos sometidos a ensayo se analizó empleando la prueba t de Suden.

Las estadísticas de supervivencia se analizaron con el software MEDCALC® (Mariakerke, Bélgica).

Ejemplo 2

Aislamiento de fragmentos de scFv de unión a células de melanoma

La biblioteca de fagos sintéticos scFv (nº #1) se sometió a cuatro ciclos de inmunopurificación con células WM1158.Los fagos aislados se absorbieron con células linfoides B humanas cultivadas LG-2 para eliminar los fagos unidos a los antígenos compartidos por las células humanas.Se produjeron scFv a partir de 80 clones y se ensayaron en cuanto a su reactividad con células de melanoma en un ELISA celular.Entre los clones ensayados, el scFv denominado W9 reaccionó intensamente con la línea celular WM1158.La reactividad fue específica, puesto que no se detectó reactividad con células LG-2.Como control negativo se utilizó el scFv nº 119, que reconoce un antígeno irrelevante (Figura 1).

Ejemplo 3

Reactividad de scFv W9

Al ensayarlo con ELISA con un panel de líneas celulares humanas, el scFv W9 soluble reaccionó con líneas celulares de melanoma (MV3, COLO38, SK-MEL-28, M14, FO-1), de cáncer de mama basal (SUM149, MDA-MB-435s), cáncer de cabeza y cuello (PCI-13), cáncer pancreático (PANC 2.03, PANC 3.27, PANC 10.05), de vejiga (T24), de pulmón (A549), epidermoide (A431), cervical (HeLa), renal (SLR21), ovárico (OVCAR3) y glioma (U-138, A-172).El fragmento de scFv no reaccionó con las líneas celulares de cáncer de mama luminal (MCF-7, T47D), la línea celular de cáncer de colon 40-16, la línea celular de cáncer de próstata Du 145 y la línea celular B linfoide LG-2 (Figura 2).

A continuación se presentan los resultados de un análisis inmunohistoquímico de la inmunorreactividad de scFv W9 a tejidos normales.Los resultados están relacionados con biopsias de al menos dos pacientes sometidos a ensayo (+Positivo).

TEJIDOS*	W9
Piel	solo glándula sudorípara: +
Riñón	negativo
Pulmón	negativo
Hígado	negativo
Colon-recto	negativo
Páncreas	negativo
Estómago	negativo
Tiroides	negativo
Corteza cerebral	negativo
Testículo	negativo
Parótida	solo epitelio acinar: +
Mama	negativo
Próstata	negativo
Bazo	negativo

La tinción inmunohistoquímica con scFv W9 reveló que la endoplasmina (Grp94) tan solo es expresada por la glándula sudorípara y el epitelio acinar, mientras que no es expresada por diversos tejidos normales.

La tinción inmunohistoquímica con mAb W9 reveló que el epítopo de la endoplasmina (Grp94) presenta una distribución restringida en el tejido normal y es expresada en la lesión de adenocarcinoma pancreático (Figura 11).El análisis inmunohistoquímico ha revelado que el epítopo reconocido por mAb W9 presenta una distribución restringida en tejidos normales.Además, el mAb W9 tiñó únicamente la lesión de adenocarcinoma pancreático humano extirpada quirúrgicamente, mientras que no tiñó el tejido pancreático normal del mismo paciente.Además, los xenoinjertos derivados de las líneas celulares MDA-MB-231 y MV3, respectivamente, presentaron una intensa tinción por mAb W9, mientras que no se detectó tinción en el MCF-7 (Figura 12).

Ejemplo 4

Análisis inmunoquímico de la especificidad de scFv W9 e identificación de Grp94 mediante espectrometría de masas en tándem

La inmunoprecipitación de un lisado celular total obtenido de WM1158a con scFv W9 permitió identificar una única banda a aproximadamente 100 KDa (Figura 3). Como control negativo se utilizó scFv #119.Se obtuvieron los mismos resultados utilizando lisados de líneas celulares MV3 (melanoma), SUM149 (cáncer de mama basal), T24 (cáncer de vejiga) y SLR21 (cáncer renal).Se escindieron las bandas específicas de 100 KDa inmunoprecipitadas por scFv W9 a partir de los diferentes lisados celulares y se digirieron en gel con tripsina.El análisis de los péptidos trípticos resultantes mediante cromatografía de líquidos-espectrometría de masas en tándem identificó dos péptidos trípticos (ELISNASDALDK (SEC ID Nº: 7) y GVVDSDDLPLNVSR (SEC ID Nº: 8)) que se derivan exclusivamente de la endoplasmina (Grp94) (Figura 4).

El epítopo reconocido por mAb W9 depende esencialmente del residuo(s) de ácido siálico, puesto que su reactividad a células tumorales fue suprimida tras la incubación con neuraminidasa, pero no se vio afectada por otras glicosidasas (Figura 9).Para estos experimentos se incubaron células MIAPaCa-2 ($5x10^5$) de adenocarcinoma pancreático humanas con o sin 2 µl de α-2(3,6,8.9)-neuraminidasa en 50 µl de medio RPM I1640 durante 24 horas a 37 °C en un incubador de CO2 al 5 %.A continuación se tiñeron con mAb W9 las células tratadas y se analizaron mediante citometría de flujo.Se utilizaron como control células tratadas con mAb TP25.99.

Se incubaron con ALDEFLUOR® células de adenocarcinoma pancreático humanas MIAPaCa-2 para detectar actividad ALDH (TEST) y se tiñeron con mAb W9.Se utilizaron como referencia (CONTROL) células incubadas con ALDEFLUOR® + inhibidor DAEB y teñidas con mAb W9.Se utilizaron como control Ig humanas (IgH).Se indica el

porcentaje de células cancerosas, identificadas como células ALDH^{bright}.

El análisis de flujo reveló que el epítopo reconocido por mAb W9 es expresado por células iniciadoras de cáncer, puesto que el mismo anticuerpo se unió a la población de células ALDH^{bright} identificada (Figura 10).

Ejemplo 5

Efecto de la tunicamicina sobre la expresión del determinante reconocido por scFv W9 y caracterización adicional del epítopo

La glicosilación desempeña un papel en la expresión del epítopo reconocido por scFv W9 en endoplasmina (Grp94), puesto que este fragmento de scFv no reaccionó con células COLO38 tratadas con tunicamicina, un inhibidor de la *N*-glicosilación de las glicoproteínas (Figura 4).No se observó inhibición con DMSO solo.

Además, no se observó inhibición para mAb TP25.99 (control) bajo las mismas condiciones.Estos datos sugieren que los carbohidratos son esenciales para el reconocimiento de la endoplasmina (Grp94) por el scFv W9.

El epítopo reconocido por mAb W9 depende esencialmente del/los residuo/s de ácido siálico, puesto que su reactividad a células tumorales fue suprimida tras la incubación con neuraminidasa, pero no se vio afectada por otras glicosidasas (Figura 9).

Ejemplo 6

Reactividad de scFv W9 con endoplasmina (Grp94) proteína recombinante canina

scFv W9 reaccionó específicamente con la endoplasmina (Grp94) proteína recombinante canina (RC-Grp94) de una forma dependiente de la dosis (Figura 5A), puesto que no se detectó unión con BSA (control negativo, Figura 5B).Además, la RC-Grp94 afectó específicamente a la unión de scFv W9 a las células COLO38 de una forma dependiente de la dosis.La inhibición fue dependiente de la dosis y específica, puesto que la β2-microglobulina (control negativo) no mostró ningún efecto inhibidor (Figura 6).

Ejemplo 7

Efecto de la electroporación sobre la unión de scFv W9

Células 293 electroporadas fueron transfectadas transitoriamente con ADNc completo de endoplasmina (Grp94) o únicamente con el vector (pCMV-XL4, control negativo).La eficiencia de la transfección (94 %) se determinó mediante expresión de GFP.Las células recogidas 24 horas después de la transfección se incubaron con Fv monocatenario W9 y mAb 9E10, seguido de incubación con anticuerpos FITC de cabra anti IgG de ratón.Se analizaron las células mediante citometría de flujo.Se utilizaron como control células no transfectadas.Se observó un fuerte aumento de la unión del scFv W9 en células tratadas con endoplasmina (Grp94) (Figura 7A) y únicamente con el plásmido (Figura 7B).Estos datos sugieren que la unión de scFv se incrementó por electroporación y que el choque térmico regula la expresión del antígeno reconocido por scFv W9.

Ejemplo 8

Efecto de ARNhc dirigido contra endoplasmina (Grp94) sobre la unión de scFv W9

Células FO-1 fueron transducidas con ARNhc para reducir la expresión de endoplasmina (Grp94), o con ABCB5 ARNhc como control.Las células recogidas 72 horas después de la transducción se incubaron con Fv monocatenario W9 y mAb 9E10, seguido de incubación con anticuerpos FITC de cabra anti IgG de ratón.Se analizaron las células mediante citometría de flujo.El ARNhc Grp94 (Figura 8A) inhibió significativamente la unión del Fv monocatenario W9 en comparación con el ARNhc de control (Figura 8B).

Ejemplo 9

Efecto de mAb W9 sobre células cancerosas

Se evaluó el efecto de mAb W9 sobre células cancerosas.Específicamente, el análisis MTT ha revelado que el mAb W9 inhibió significativamente el crecimiento de todas las líneas celulares tumorales positivas de endoplasmina (Grp94+).Sin embargo, no se observó efecto alguno en una línea celular Grp94 Raji.El efecto antiproliferativo fue específico, puesto que no se observó inhibición del crecimiento con las inmunoglobulinas humanas utilizadas como control (Figura 13).Así pues, mAb W9 inhibió la proliferación de células cancerosas.

El análisis de flujo ha revelado que mAb W9 indujo apoptosis en células humanas de melanoma MV3 y de cáncer pancreático MIAPaCa-2 (48,90 % y 53,56 % de apoptosis, respectivamente).Además, los análisis Western blot revelaron un incremento significativo de la expresión de caspasa-3 escindida y de PARP escindida en células tratadas con mAb W9 (Figuras 14, 15 y 16).Así pues, mAb W9 indujo apoptosis en células cancerosas.Sin embargo, mAb W9 no medió la lisis de células diana dependiente de la célula ni del complemento (Figuras 17 y 18).

Además, mAb W9 inhibió la proliferación de células iniciadoras de adenocarcinoma pancreático humanas MIAPaCa-2.El análisis de flujo ha revelado que en células tratadas con mAb W9, el porcentaje de células iniciadoras de cáncer, definidas como células ALDH^{bright}, se redujo en un 50 % en comparación con inmunoglobulinas humanas (control negativo) (Figura 19). Las células tratadas con mAb W9 presentaban un nivel reducido de Ras, C-Raf,

PCKα, β-catenina y Bcl-2. Además, el tratamiento con mAb W9 inhibió la activación de Akt, Erk, Mek, Fak y Met (Figuras 20-22).

En un ensayo *pull-down* utilizando mAb W9, se co-inmunoprecipitó la endoplasmina (Grp94) con Met, Ras y C-Raf (Figura 23).

Utilizando un microscopio OLYMPUS® BX51 (OLYMPUS® UK Ltd.), se analizaron secciones tisulares teñidas con H&E para determinar el área acumulativa de los nódulos metastásicos presentes en 5 campos 200x/sección seleccionados aleatoriamente.Se utilizó SPOT IMAGING SOFTWARE® Advanced (Diagnostic Instruments, Inc.) para medir y calcular el área promedio de tumor para cada grupo, y estos valores para el tumor MV3 se presentan en los gráficos de barras ± SD. Los ratones tratados con mAbW9 presentaron una reducción estadísticamente significativa (aproximadamente del 50 %) en el área de las metástasis en comparación con los ratones tratados con el anticuerpo de control de isotipo (Figura 24).

La expresión de endoplasmina (Grp94) se incrementó mediante agentes quimioterapéuticos.El análisis de flujo reveló que el tratamiento con 5-fluorouracilo (FU), cisplatina y paclitaxel incrementó la expresión superficial de endoplasmina (Grp94).El efecto fue específico (Figura 25).Los resultados del MTT revelaron que el mAb W9 en combinación con 5-FU y ciclopamina, respectivamente, es más efectivo que cada agente por sí solo para inhibir el crecimiento de células de adenocarcinoma pancreático (Figura 26).El análisis de flujo también reveló que la inhibición del crecimiento de células iniciadoras de cáncer por mAb W9 fue potenciada por la ciclopamina y el 5-FU.Se detectó una inhibición del crecimiento de células $ALDH^{bright}$ de aproximadamente el 90 % tras la incubación con mAb W9, ciclopamina y 5-FU.En contraste, la inhibición fue de tan solo el 50 % en los cultivos incubados individualmente con mAb W9 o ciclopamina, del 20 % en el cultivo incubado con 5-FU y del 70 % en los cultivos incubados con mAb W9 en combinación con ciclopamina o 5-FU (Figura 27).El análisis de flujo también reveló que la inducción de apoptosis por mAb fue potenciada por la ciclopamina y el 5-FU.Mediante mAb W9 en combinación con ciclopamina y 5-FU se indujo apoptosis en el 70 % de las células.Sin embargo, se indujo apoptosis en menos del 35 % de las células tratadas con 5-FU, ciclopamina o una combinación de 5-FU y ciclopamina (Figura 28).

El análisis de flujo también reveló que la inhibición del crecimiento de células iniciadoras de cáncer por mAb W9 fue potenciada por radiación y ciclopamina.Se detectó una inhibición del crecimiento de células $ALDH^{bright}$ de aproximadamente el 90 % tras el tratamiento con mAb W9 en combinación con radiación y ciclopamina.En contraste, la inhibición fue de tan solo aproximadamente el 50 % en los cultivos tratados individualmente con mAb W9 o ciclopamina, y de menos del 30 % en los cultivos tratados exclusivamente con radiación (Figura 29).El análisis de flujo reveló que la inducción de apoptosis por mAb fue potenciada por la radiación y la ciclopamina.Mediante mAb W9 en combinación con radiación y ciclopamina se indujo apoptosis en el 73,87 % de las células, pero en menos del 25 % utilizando únicamente mAb W9 (Figura 30).

También se examinó el efecto del tratamiento con mAb W9 sobre los niveles de proteínas Ras y C-Raf.Los niveles de proteínas Ras y C-Raf se incrementaron mediante ciclopamina y 5-FU.Se observó un efecto sinérgico en la inhibición de la activación de Mek, Erk y Akt (Figura 31).El efecto del tratamiento con mAb W9 sobre la inhibición de los niveles de proteínas Ras y GLI1, así como sobre la activación de Erk y Akt fue potenciado mediante radiación y ciclopamina (Figura 32).

Ejemplo 10

Anticuerpos monoclonales específicos de endoplasmina para el tratamiento del cáncer

Este ejemplo describe el uso de anticuerpos monoclonales humanos específicos de la endoplasmina para el tratamiento de cánceres que presentan un incremento de la expresión de endoplasmina (en lo sucesivo denominados cáncer «positivo para endoplasmina»), incluyendo sin limitación, melanoma, cáncer de mama, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, cáncer renal, cáncer de pulmón, glioma, cáncer de vejiga, cáncer de ovario o cáncer de páncreas.Los pacientes diagnosticados con cáncer positivo para endoplasmina pueden ser tratados conforme a procedimientos estándar en la técnica. Generalmente, las opciones de tratamiento incluyen cirugía, radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia o terapia con interferón.

En este ejemplo, a los pacientes diagnosticados con un melanoma positivo de endoplasmina se les administra un inmunoconjugado que comprende un anticuerpo monoclonal humano específico de la endoplasmina ligado a exotoxina de Pseudomonas (PE).La preparación de inmunoconjugados de PE ha sido descrita (véanse, por ejemplo, la Patente USAnº 7.081.518 y la Publicación preconcesión USAnº 2005/0214304.

En algunos pacientes, el inmunoconjugado se administra mediante inyección de bolo intravenoso en días alternos para un total de tres a seis dosis.En otros pacientes, el inmunoconjugado se administra por infusión intravenosa continua a lo largo de diez días.La dosis de inmunoconjugado administrada a un paciente varía dependiendo del peso y el sexo del paciente, y del modo y la cronología de la administración.

Después del tratamiento, se evalúan los pacientes para determinar la progresión del cáncer (incluyendo el crecimiento tumoral y lametástasis) y otros signos clínicos de enfermedad.Los pacientes pueden ser tratados con el inmunoconjugado solo o en combinación con uno o varios tratamientos estándar contra el cáncer.Por ejemplo, un paciente que se ha sometido a cirugía para extirpar el melanoma puede ser tratado posteriormente con el inmunoconjugado.

Se pondrá de manifiesto que los detalles exactos de los métodos o las composiciones descritas pueden variarse o modificarse sin desviarse de la invención reivindicada.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> UNIVERSITY OF PITTSBURGH OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION
Ferrone, Soldano
Wang, Xinhui
Conrads, Thomas P.
Favoino, Elvira
Hood, Brian L

<120> ANTICUERPOS CONTRA ENDOPLASMINA Y SU USO

<130> 8123-85229-02

<150> US 61/355,516
<151> 2010-06-16

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 445
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ala His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
115 120 125

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
165 170 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
180 185 190

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
195 200 205

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
210 215 220

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
275 280 285

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
305 310 315 320

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
325 330 335

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
340 345 350

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met Glu Thr His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

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

<400> 2

Glu Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 3
<211> 1332

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 3

caggtgcagc tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctggggcctc agtgaaggtt 60

tcctgcaagg cttctggata caccttcact agctatgcta tgcattgggt gcgccaggcc 120

cccggacaaa ggcttgagtg gatgggatgg atcaacgctg gcaatggtaa cacaaaatat 180

tcacagaagt tccagggcag agtcaccatt accagggaca catccgcgag cacagcctac 240

atggagctga gcagcctgag atctgaagac acggccgtgt attactgtgc aagggcccat 300

tttgactact ggggccaagg taccctggtc accgtctcgg ctagcaccaa gggcccatcg 360

gtcttccccc tggcaccctc ctccaagagc acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc 420

ctggtcaagg actacttccc cgaaccggtg acggtgtcgt ggaactcagg cgccctgacc 480

agcggcgtgc acaccttccc ggctgtccta cagtcctcag gactctactc cctcagcagc 540

gtggtgaccg tgccctccag cagcttgggc acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac 600

aagcccagca acaccaaggt ggacaagaaa gttgagccca aatcttgtga caaaactcac 660

acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc ctgggggggac cgtcagtctt cctcttcccc 720

ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg 780

gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg 840

cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc 900

gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc 960

aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 1020

gaaccacagg tgtacaccct gcccccatcc cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtcagc 1080

ctgacctgcc tggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat 1140

gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1200

ttcctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1260

tgctccgtga tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct 1320

ccgggtaaat ga 1332

<210> 4
<211> 642
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 4
gaaattgagc tcacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctacttaa attggtatca gcagaaacca 120

gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta cccctccaac gttcggccaa 300

gggaccaagg tggagatcaa aacggtggct gcaccatctg tcttcatctt cccgccatct 360

gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc 420

agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag 480

agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg 540

agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg 600

agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt ag 642

<210> 5
<211> 803
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Arg Ala Leu Trp Val Leu Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Thr Phe
1 5 10 15

Gly Ser Val Arg Ala Asp Asp Glu Val Asp Val Asp Gly Thr Val Glu
20 25 30

Glu Asp Leu Gly Lys Ser Arg Glu Gly Ser Arg Thr Asp Asp Glu Val
35 40 45

Val Gln Arg Glu Glu Glu Ala Ile Gln Leu Asp Gly Leu Asn Ala Ser
50 55 60

Gln Ile Arg Glu Leu Arg Glu Lys Ser Glu Lys Phe Ala Phe Gln Ala
65 70 75 80

Glu Val Asn Arg Met Met Lys Leu Ile Ile Asn Ser Leu Tyr Lys Asn
85 90 95

Lys Glu Ile Phe Leu Arg Glu Leu Ile Ser Asn Ala Ser Asp Ala Leu
100 105 110

Asp Lys Ile Arg Leu Ile Ser Leu Thr Asp Glu Asn Ala Leu Ser Gly
115 120 125

Asn Glu Glu Leu Thr Val Lys Ile Lys Cys Asp Lys Glu Lys Asn Leu
130 135 140

Leu His Val Thr Asp Thr Gly Val Gly Met Thr Arg Glu Glu Leu Val
145 150 155 160

Lys Asn Leu Gly Thr Ile Ala Lys Ser Gly Thr Ser Glu Phe Leu Asn
165 170 175

Lys Met Thr Glu Ala Gln Glu Asp Gly Gln Ser Thr Ser Glu Leu Ile
180 185 190

Gly Gln Phe Gly Val Gly Phe Tyr Ser Ala Phe Leu Val Ala Asp Lys
195 200 205

Val Ile Val Thr Ser Lys His Asn Asn Asp Thr Gln His Ile Trp Glu
210 215 220

Ser Asp Ser Asn Glu Phe Ser Val Ile Ala Asp Pro Arg Gly Asn Thr
225 230 235 240

Leu Gly Arg Gly Thr Thr Ile Thr Leu Val Leu Lys Glu Glu Ala Ser
245 250 255

Asp Tyr Leu Glu Leu Asp Thr Ile Lys Asn Leu Val Lys Lys Tyr Ser
260 265 270

Gln Phe Ile Asn Phe Pro Ile Tyr Val Trp Ser Ser Lys Thr Glu Thr
275 280 285

Val Glu Glu Pro Met Glu Glu Glu Glu Ala Ala Lys Glu Glu Lys Glu
290 295 300

Glu Ser Asp Asp Glu Ala Ala Val Glu Glu Glu Glu Glu Glu Lys Lys
305 310 315 320

Pro Lys Thr Lys Lys Val Glu Lys Thr Val Trp Asp Trp Glu Leu Met
325 330 335

Asn Asp Ile Lys Pro Ile Trp Gln Arg Pro Ser Lys Glu Val Glu Glu
340 345 350

Asp Glu Tyr Lys Ala Phe Tyr Lys Ser Phe Ser Lys Glu Ser Asp Asp
355 360 365

Pro Met Ala Tyr Ile His Phe Thr Ala Glu Gly Glu Val Thr Phe Lys
370 375 380

Ser Ile Leu Phe Val Pro Thr Ser Ala Pro Arg Gly Leu Phe Asp Glu
385 390 395 400

Tyr Gly Ser Lys Lys Ser Asp Tyr Ile Lys Leu Tyr Val Arg Arg Val
405 410 415

Phe Ile Thr Asp Asp Phe His Asp Met Met Pro Lys Tyr Leu Asn Phe
420 425 430

Val Lys Gly Val Val Asp Ser Asp Asp Leu Pro Leu Asn Val Ser Arg
435 440 445

Glu Thr Leu Gln Gln His Lys Leu Leu Lys Val Ile Arg Lys Lys Leu
450 455 460

Val Arg Lys Thr Leu Asp Met Ile Lys Lys Ile Ala Asp Asp Lys Tyr
465 470 475 480

Asn Asp Thr Phe Trp Lys Glu Phe Gly Thr Asn Ile Lys Leu Gly Val
485 490 495

Ile Glu Asp His Ser Asn Arg Thr Arg Leu Ala Lys Leu Leu Arg Phe
500 505 510

Gln Ser Ser His His Pro Thr Asp Ile Thr Ser Leu Asp Gln Tyr Val
515 520 525

Glu Arg Met Lys Glu Lys Gln Asp Lys Ile Tyr Phe Met Ala Gly Ser
530 535 540

Ser Arg Lys Glu Ala Glu Ser Ser Pro Phe Val Glu Arg Leu Leu Lys
545 550 555 560

Lys Gly Tyr Glu Val Ile Tyr Leu Thr Glu Pro Val Asp Glu Tyr Cys
565 570 575

Ile Gln Ala Leu Pro Glu Phe Asp Gly Lys Arg Phe Gln Asn Val Ala
580 585 590

Lys Glu Gly Val Lys Phe Asp Glu Ser Glu Lys Thr Lys Glu Ser Arg
595 600 605

Glu Ala Val Glu Lys Glu Phe Glu Pro Leu Leu Asn Trp Met Lys Asp
610 615 620

Lys Ala Leu Lys Asp Lys Ile Glu Lys Ala Val Val Ser Gln Arg Leu
625 630 635 640

Thr Glu Ser Pro Cys Ala Leu Val Ala Ser Gln Tyr Gly Trp Ser Gly
645 650 655

Asn Met Glu Arg Ile Met Lys Ala Gln Ala Tyr Gln Thr Gly Lys Asp
660 665 670

Ile Ser Thr Asn Tyr Tyr Ala Ser Gln Lys Lys Thr Phe Glu Ile Asn
675 680 685

Pro Arg His Pro Leu Ile Arg Asp Met Leu Arg Arg Ile Lys Glu Asp
690 695 700

Glu Asp Asp Lys Thr Val Leu Asp Leu Ala Val Val Leu Phe Glu Thr
705 710 715 720

Ala Thr Leu Arg Ser Gly Tyr Leu Leu Pro Asp Thr Lys Ala Tyr Gly
725 730 735

Asp Arg Ile Glu Arg Met Leu Arg Leu Ser Leu Asn Ile Asp Pro Asp
740 745 750

Ala Lys Val Glu Glu Glu Pro Glu Glu Glu Pro Glu Glu Thr Ala Glu
755 760 765

Asp Thr Thr Glu Asp Thr Glu Gln Asp Glu Asp Glu Glu Met Asp Val
770 775 780

Gly Thr Asp Glu Glu Glu Glu Thr Ala Lys Glu Ser Thr Ala Glu Lys
785 790 795 800

Asp Glu Leu

<210> 6
<211> 2780
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 6
gtgggcggac cgcgcggctg gaggtgtgag gatccgaacc caggggtggg gggtggaggc 60

ggctcctgcg atcgaagggg acttgagact caccggccgc acgccatgag ggccctgtgg 120

gtgctgggcc tctgctgcgt cctgctgacc ttcgggtcgg tcagagctga cgatgaagtt 180

gatgtggatg gtacagtaga agaggatctg ggtaaaagta gagaaggatc aaggacggat 240

gatgaagtag tacagagaga ggaagaagct attcagttgg atggattaaa tgcatcacaa 300

ataagagaac ttagagagaa gtcggaaaag tttgccttcc aagccgaagt taacagaatg 360

atgaaactta tcatcaattc attgtataaa aataaagaga ttttcctgag agaactgatt 420

tcaaatgctt ctgatgcttt agataagata aggctaatat cactgactga tgaaaatgct 480

ctttctggaa atgaggaact aacagtcaaa attaagtgtg ataaggagaa gaacctgctg 540

catgtcacag acaccggtgt aggaatgacc agagaagagt tggttaaaaa ccttggtacc 600

atagccaaat ctgggacaag cgagttttta aacaaaatga ctgaagcaca ggaagatggc 660

cagtcaactt ctgaattgat tggccagttt ggtgtcggtt tctattccgc cttccttgta 720

gcagataagg ttattgtcac ttcaaaacac aacaacgata cccagcacat ctgggagtct 780

gactccaatg aattttctgt aattgctgac ccaagaggaa acactctagg acggggaacg 840

acaattaccc ttgtcttaaa agaagaagca tctgattacc ttgaattgga tacaattaaa 900

aatctcgtca aaaaatattc acagttcata aactttccta tttatgtatg gagcagcaag 960

actgaaactg ttgaggagcc catggaggaa gaagaagcag ccaaagaaga gaaagaagaa 1020

tctgatgatg aagctgcagt agaggaagaa gaagaagaaa agaaaccaaa gactaaaaaa 1080

gttgaaaaaa ctgtctggga ctgggaactt atgaatgata tcaaaccaat atggcagaga 1140

ccatcaaaag aagtagaaga agatgaatac aaagctttct acaaatcatt ttcaaaggaa 1200

agtgatgacc ccatggctta tattcacttt actgctgaag gggaagttac cttcaaatca 1260

attttatttg tacccacatc tgctccacgt ggtctgtttg acgaatatgg atctaaaaag 1320

agcgattaca ttaagctcta tgtgcgccgt gtattcatca cagacgactt ccatgatatg 1380

atgcctaaat acctcaattt tgtcaagggt gtggtggact cagatgatct ccccttgaat 1440

gtttcccgcg agactcttca gcaacataaa ctgcttaagg tgattaggaa gaagcttgtt 1500

cgtaaaacgc tggacatgat caagaagatt gctgatgata aatacaatga tacttttgg 1560

aaagaatttg gtaccaacat caagcttggt gtgattgaag accactcgaa tcgaacacgt 1620

cttgctaaac ttcttaggtt ccagtcttct catcatccaa ctgacattac tagcctagac 1680

cagtatgtgg aaagaatgaa ggaaaaacaa gacaaaatct acttcatggc tgggtccagc 1740

agaaaagagg ctgaatcttc tccatttgtt gagcgacttc tgaaaaaggg ctatgaagtt 1800

atttacctca cagaacctgt ggatgaatac tgtattcagg cccttcccga atttgatggg 1860

aagaggttcc agaatgttgc caaggaagga gtgaagttcg atgaaagtga gaaaactaag 1920

gagagtcgtg aagcagttga gaaagaattt gagcctctgc tgaattggat gaaagataaa 1980

gcccttaagg acaagattga aaaggctgtg gtgtctcagc gcctgacaga atctccgtgt 2040

gctttggtgg ccagccagta cggatggtct ggcaacatgg agagaatcat gaaagcacaa 2100

gcgtaccaaa cgggcaagga catctctaca aattactatg cgagtcagaa gaaaacattt 2160

gaaattaatc ccagacaccc gctgatcaga gacatgcttc gacgaattaa ggaagatgaa 2220

gatgataaaa cagttttgga tcttgctgtg gttttgtttg aaacagcaac gcttcggtca 2280

gggtatcttt taccagacac taaagcatat ggagatagaa tagaaagaat gcttcgcctc 2340

agtttgaaca ttgaccctga tgcaaaggtg gaagaagagc ccgaagaaga acctgaagag 2400

acagcagaag acacaacaga agacacagag caagacgaag atgaagaaat ggatgtggga 2460

acagatgaag aagaagaaac agcaaaggaa tctacagctg aaaaagatga attgtaaatt 2520

atactctcac catttggatc ctgtgtggag agggaatgtg aaatttacat catttctttt 2580

tgggagagac ttgttttgga tgccccctaa tccccttctc ccctgcactg taaaatgtgg 2640

gattatgggt cacaggaaaa agtgggtttt ttagttgaat ttttttaac attcctcatg 2700

aatgtaaatt tgtactattt aactgactat tcttgatgta aaatcttgtc atgtgtataa 2760

aaataaaaaa gatcccaaat 2780

<210> 7
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

Glu Leu Ile Ser Asn Ala Ser Asp Ala Leu Asp Lys
1 5 10

<210> 8
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Gly Val Val Asp Ser Asp Asp Leu Pro Leu Asn Val Ser Arg
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Una molécula quimérica aislada comprendiendo un anticuerpo monoclonal humano, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, que comprende un dominio variable de la cadena pesada, y un dominio variable de cadena ligera, donde el dominio variable dE cadena pesada comprende los aminoácidos 26-33 de SEC ID Nº: 1 (CDR 1), los aminoácidos 51-58 de SEC ID Nº: 1 (CDR2), los aminoácidos 97-103 de SEC ID Nº: 1 (CDR3), y donde el dominio variable de cadena ligera comprende los aminoácidos 27-32 de SEC ID Nº: 2 (CDR1), los aminoácidos 50-52 de SEC ID Nº: 2 (CDR2), los aminoácidos 89-97 de SEC ID Nº: 2 (CDR3), donde el anticuerpo monoclonal humano o el fragmento de unión al antígeno se une específicamente a la endoplasmina humana, y donde el anticuerpo monoclonal humano o el fragmento de unión al antígeno del mismo va unido a una molécula efectora, donde la molécula efectora es un interferón.

2. La molécula quimérica aislada de la reivindicación 1, donde la cadena pesada del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos establecida como SEC ID Nº: 1.

3. La molécula quimérica aislada de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde la cadena ligera del anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos establecida como SEC ID Nº: 2.

4. La molécula quimérica aislada de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, comprendiendo el fragmento de unión al antígeno, donde el fragmento de unión al antígeno es un Fab, un Fab', un F(ab)'2, un Fv (scFv) de cadena simple o un Fv(dsFv) estabilizado con disulfuro.

5. La molécula quimérica aislada de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, comprendiendo el anticuerpo monoclonal humano, donde el anticuerpo es una IgG.

6. La molécula quimérica aislada de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde la molécula efectora es interferón alfa.

7. La molécula quimérica aislada de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde la molécula efectora es interferón beta.

8. La molécula quimérica aislada de la reivindicación 6 o la reivindicación 7, donde el interferón alfa o el interferón beta está unido al anticuerpo monoclonal humano, o al fragmento de unión al anticuerpo del mismo con un enlace de péptidos.

9. Una composición comprendiendo la molécula quimérica aislada de cualquiera de las reivindicaciones 1-8 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10. La composición de la reivindicación 9, para su uso en el tratamiento de un cáncer que expresa endoplasmina en el sujeto.

11. La composición para el uso según la reivindicación 10, donde el cáncer es un melanoma, un cáncer de mama, un carcinoma de cabeza y cuello de célula escamosa, un cáncer renal, un cáncer de pulmón, un glioma, un cáncer de ovario, un cáncer de vejiga o un adenocarcinoma pancreático.

12. La composición para el uso según la reivindicación 10, donde el cáncer es cáncer de pulmón.

13. La composición para el uso según la reivindicación 10, donde el cáncer es un melanoma.

FIG. 1A

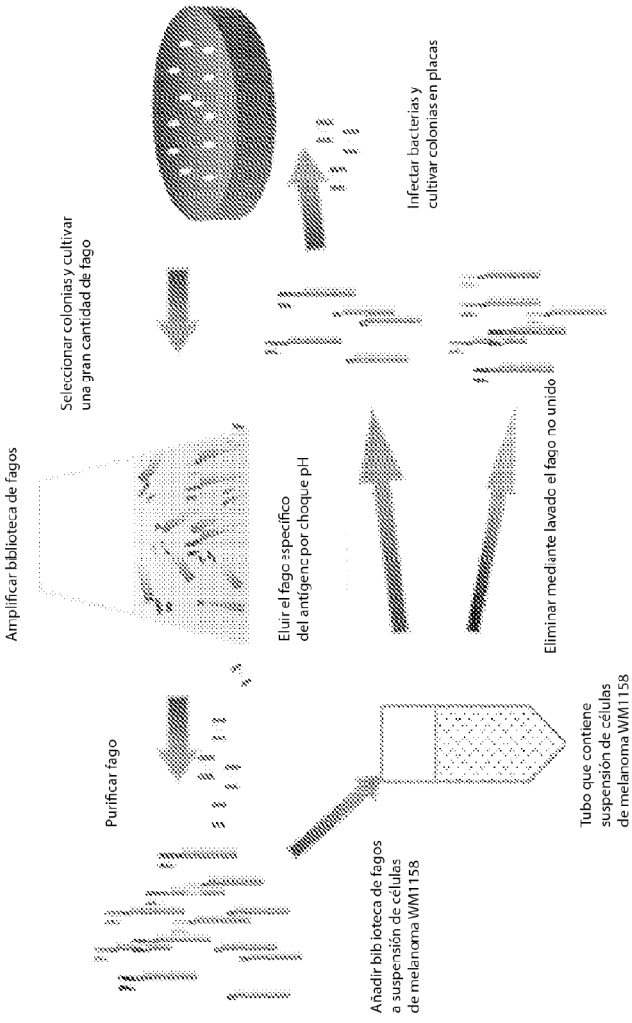

Amplificar biblioteca de fagos
Seleccionar colonias y cultivar una gran cantidad de fago
Purificar fago
Eluir el fago específico del antígeno por choque pH
Infectar bacterias y cultivar colonias en placas
Añadir bib ioteca de fagos a suspensión de células de melanoma WM1158
Eliminar mediante lavado el fago no unido
Tubo que contiene suspensión de células de melanoma WM1158

FIG. 1B

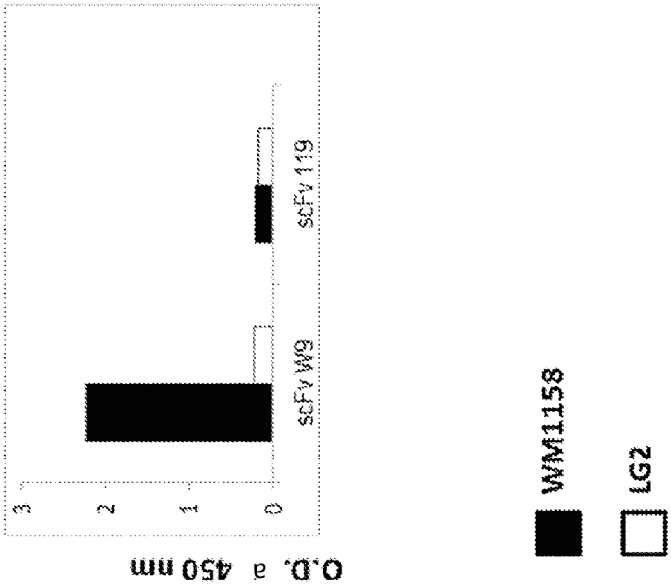

O.D. a 450 nm
3
2
1
0
scFv W9
scFv 119
WM1158
LG2

FIG. 2

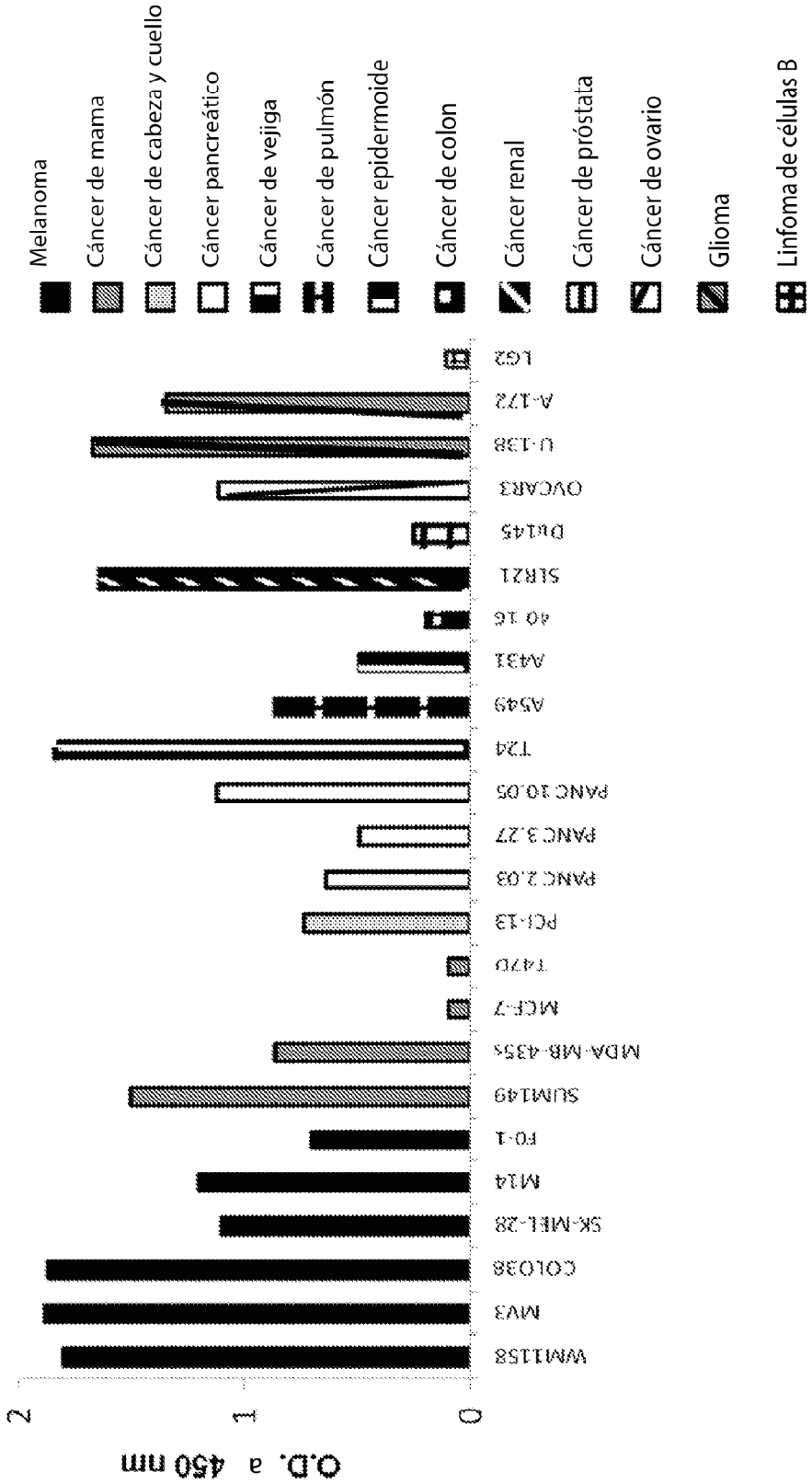

Melanoma
Cáncer de mama
Cáncer de cabeza y cuello
Cáncer pancreático
Cáncer de vejiga
Cáncer de pulmón
Cáncer epidermoide
Cáncer de colon
Cáncer renal
Cáncer de próstata
Cáncer de ovario
Glioma
Linfoma de células B
O.D. a 450 nm
0
1
2
WM1158
MV3
COLO38
SK-MEL-28
M14
FO-1
SUM149
MDA-MB-435s
MCF-7
T47D
PCI-13
PANC 2.03
PANC 3.27
PANC 10.05
T24
A549
A431
40 16
SLR21
Du145
OVCAR3
U-138
A-172
LG2

FIG. 3A

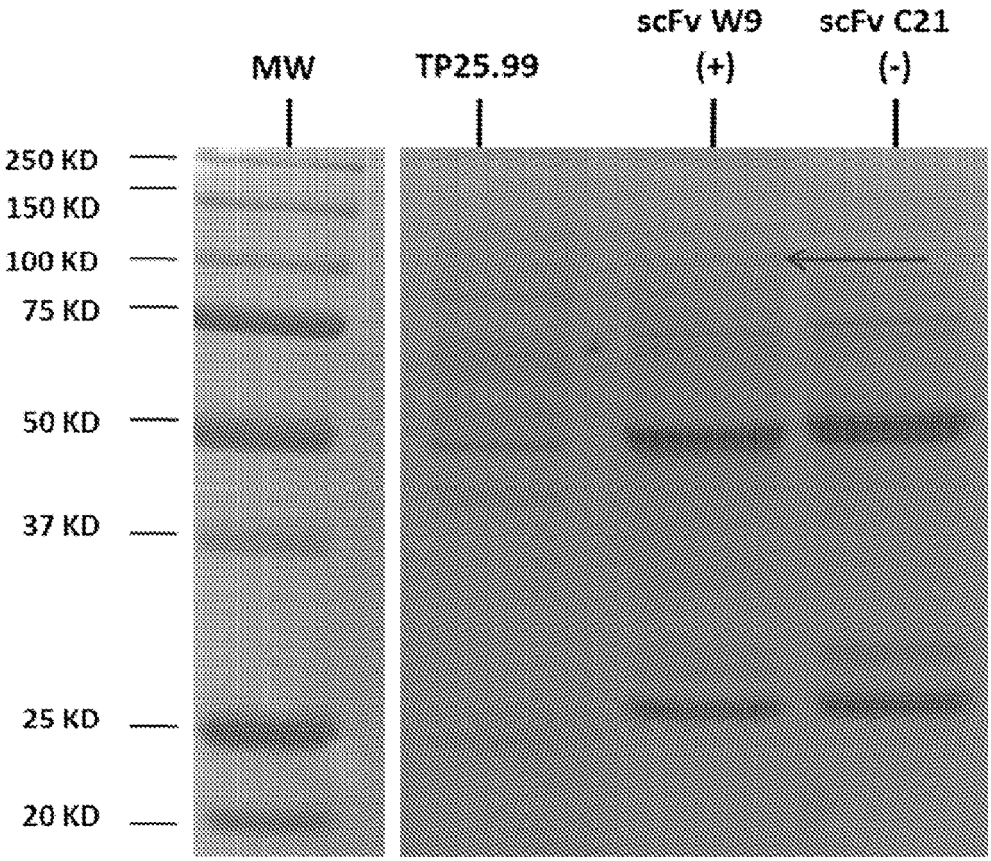

MW
TP25.99
scFv W9
(+)
scFv C21
(-)
250 KD
150 KD
100 KD
75 KD
50 KD
37 KD
25 KD
20 KD

FIG. 3B

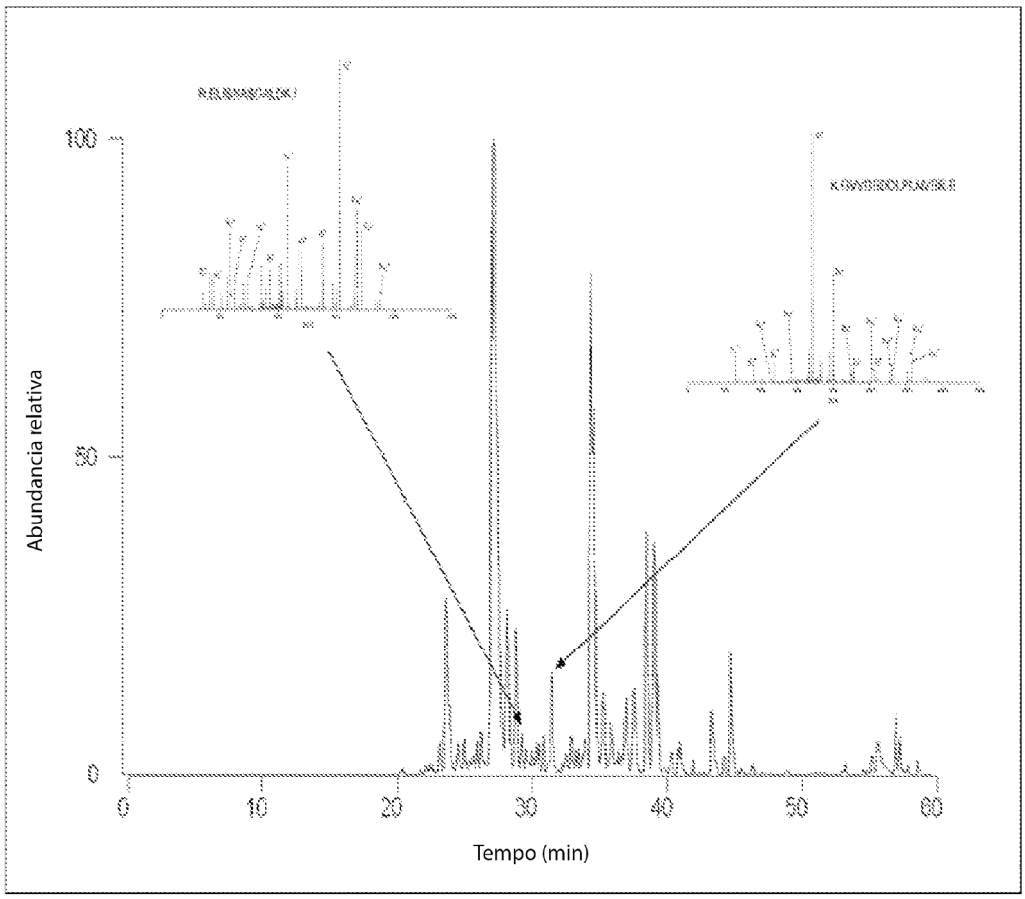


FIG. 4

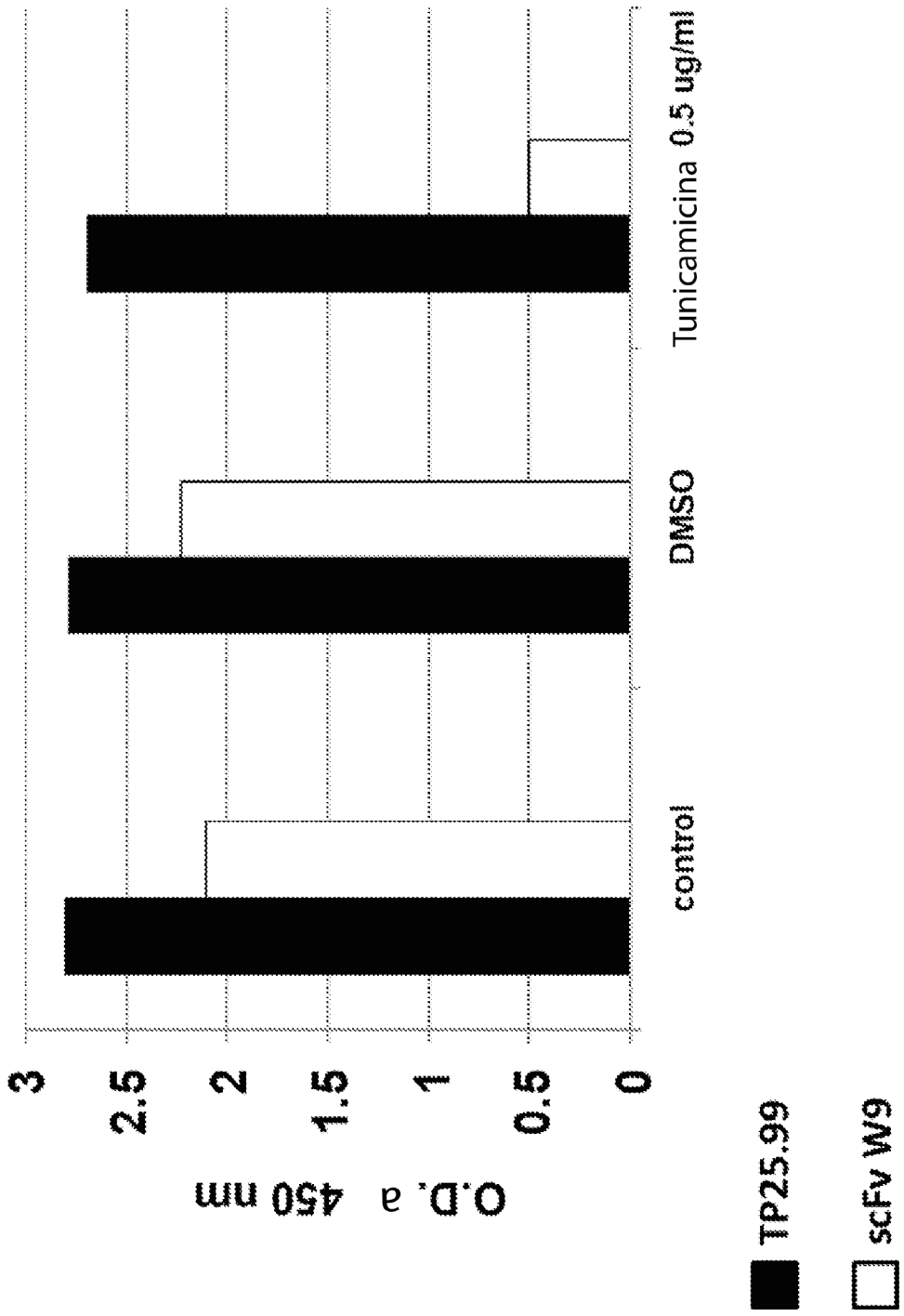

O.D. a 450 nm
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
control
DMSO
Tunicamicina 0.5 ug/ml
TP25.99
scFv W9

FIG. 5A

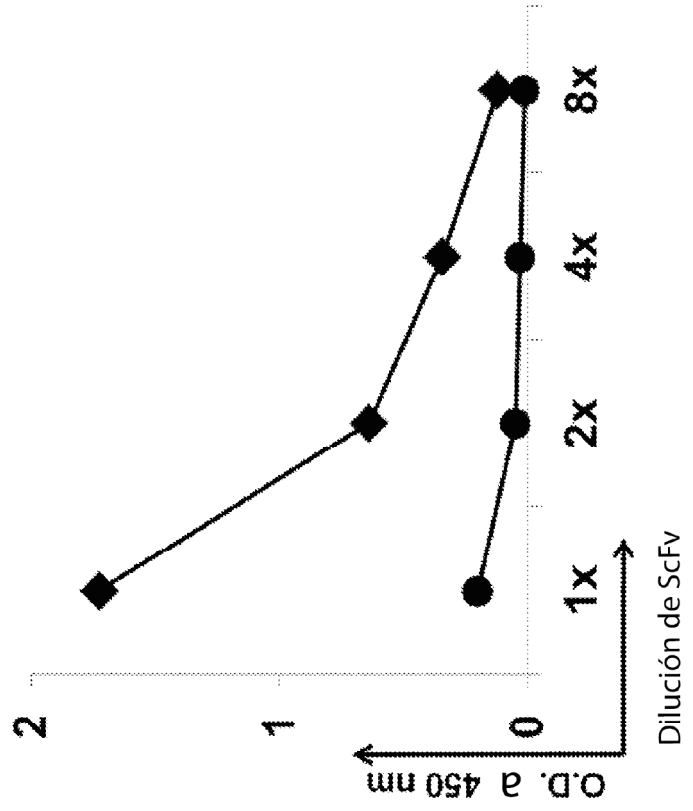

O.D. a 450 nm
2
1
0
1x
2x
4x
8x
Dilución de ScFv

FIG. 5B

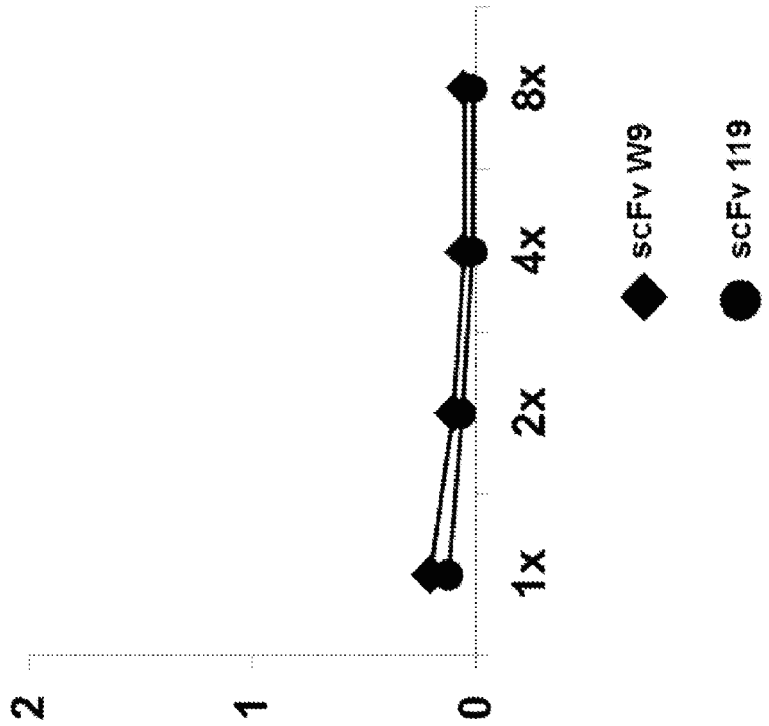

2
1
0
1x
2x
4x
8x
scFv W9
scFv 119

FIG. 6

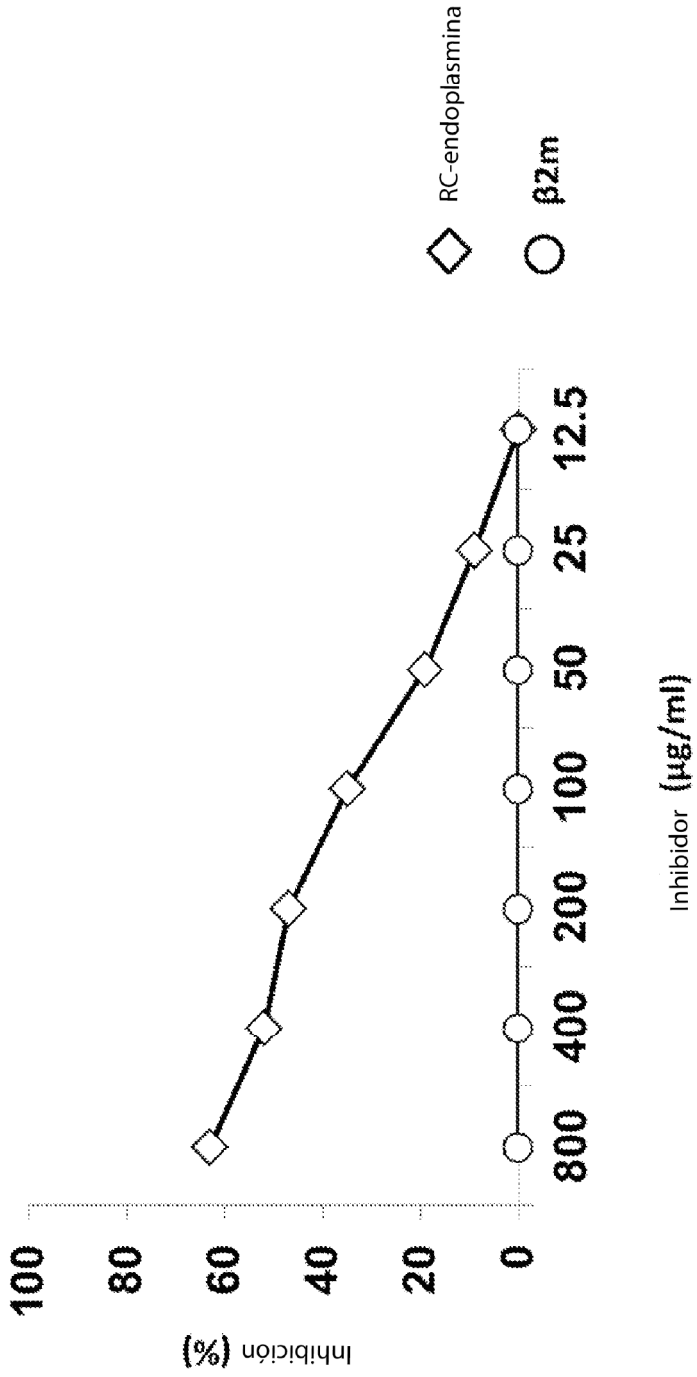

RC-endoplasmina
β2m
Inhibición (%)
100
80
60
40
20
0
800
400
200
100
50
25
12.5
Inhibidor (µg/ml)

FIG. 7B

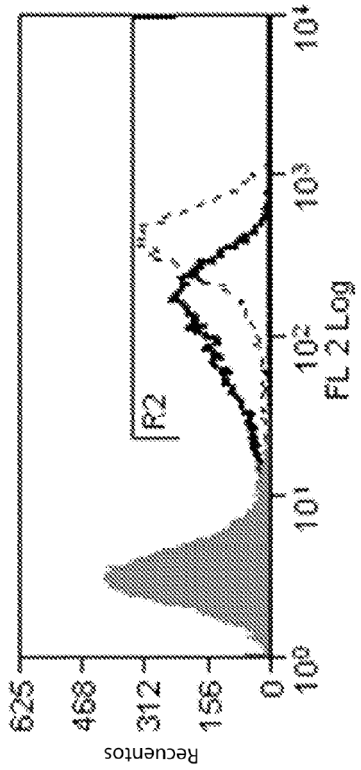
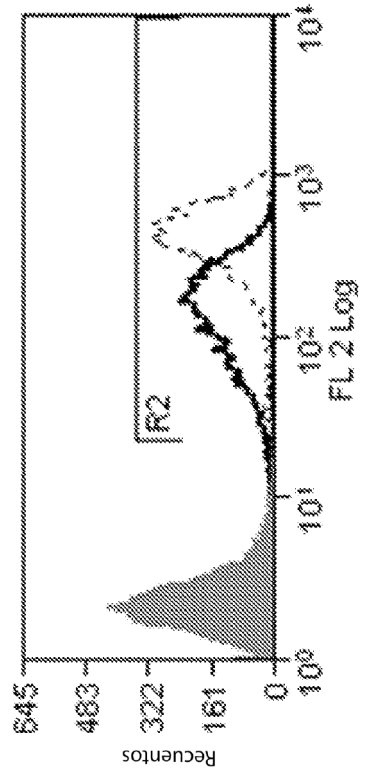


FIG. 7A



No transfectadas

Transfectadas

FIG. 8B

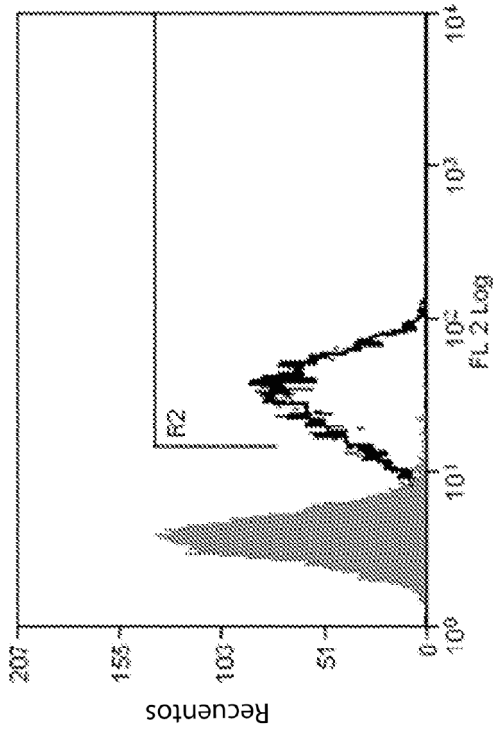
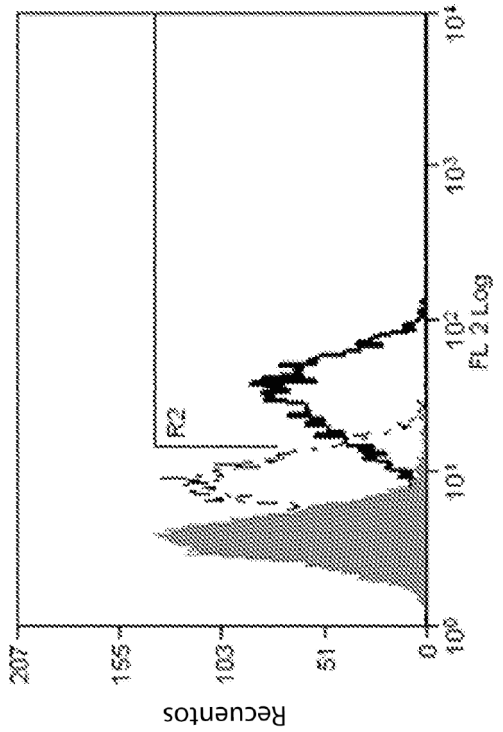


FIG. 8A



No transfectadas

Transfectadas

FIG. 9

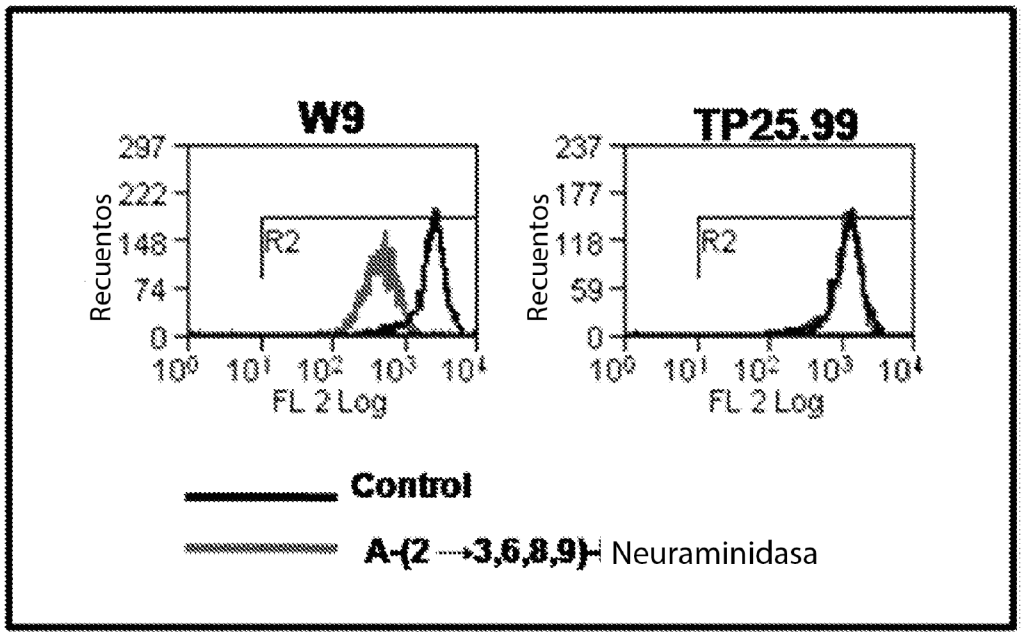

W9
TP25.99
Recuentos
297
222
148
74
0
237
177
118
59
R2
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4
FL 2 Log
Control
A-(2→3,6,8,9)-Neuraminidasa

FIG. 10

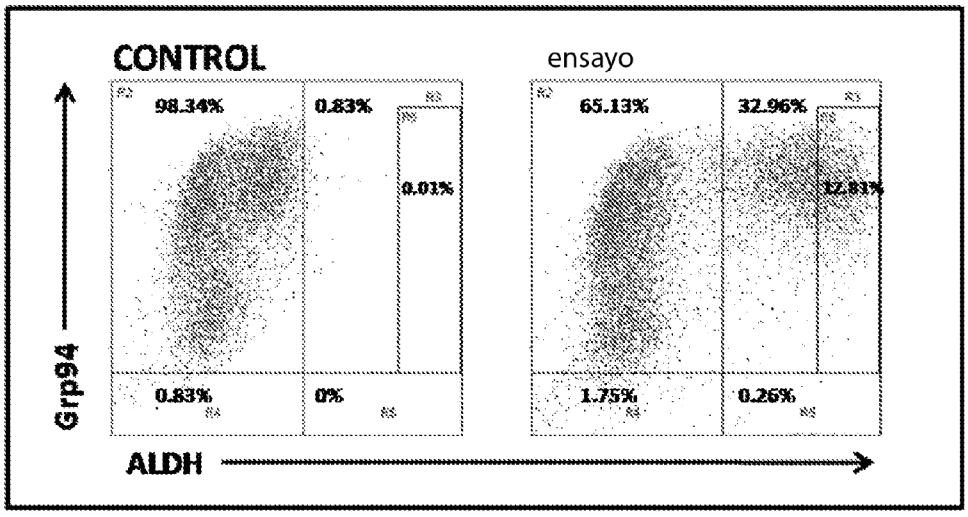

CONTROL
ensayo
98.34%
0.83%
0.01%
0.83%
0%
65.13%
32.96%
1.75%
0.26%
Grp94
ALDH

FIG. 11

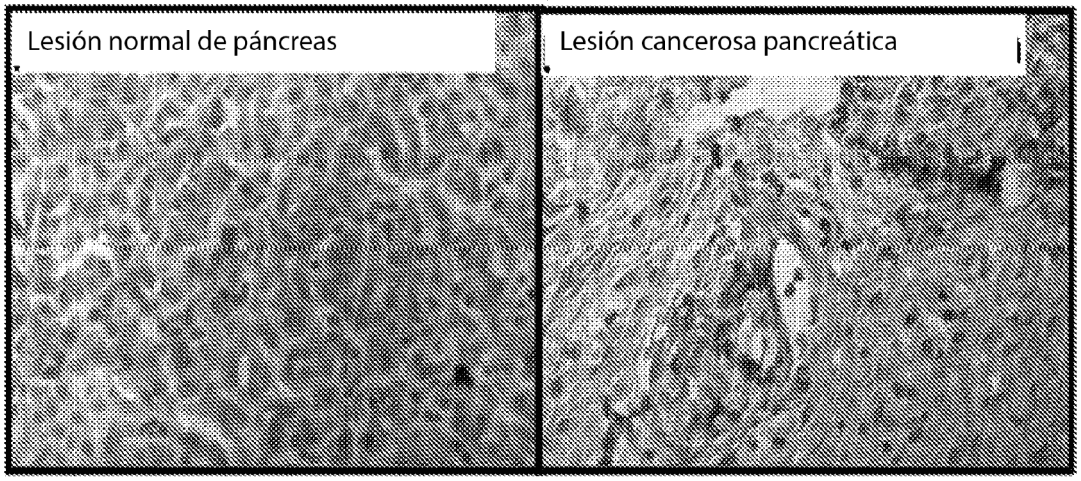
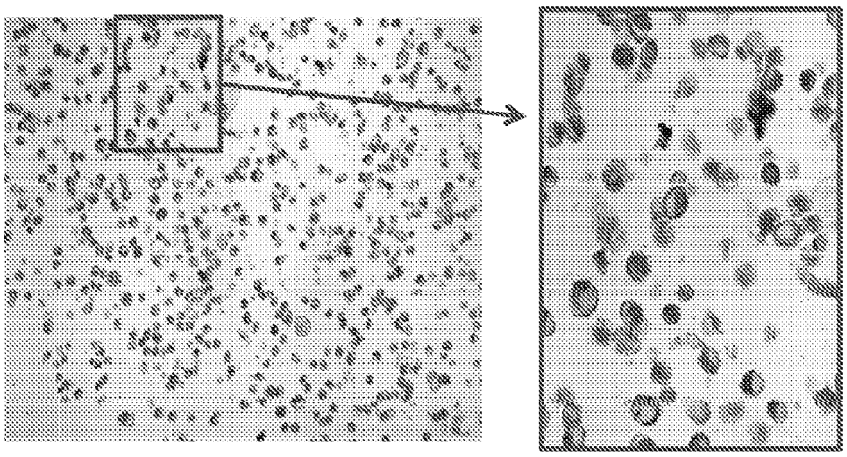
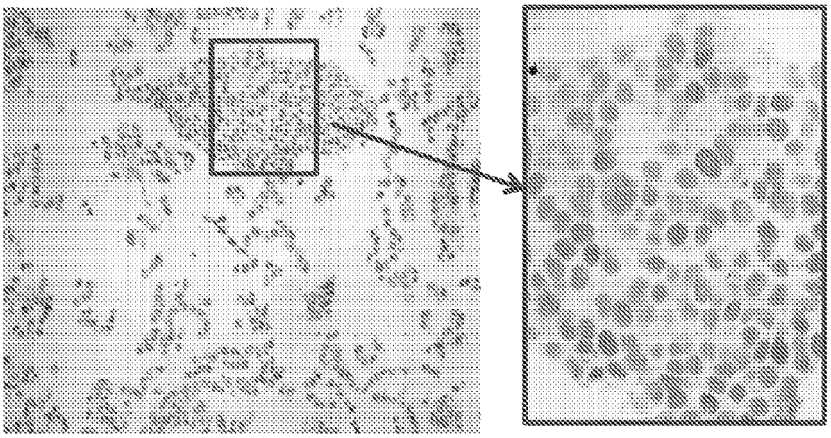


FIG. 12

MDA-MB-231



MCF-7 (Control negativo)



MV3 Xenoinjerto

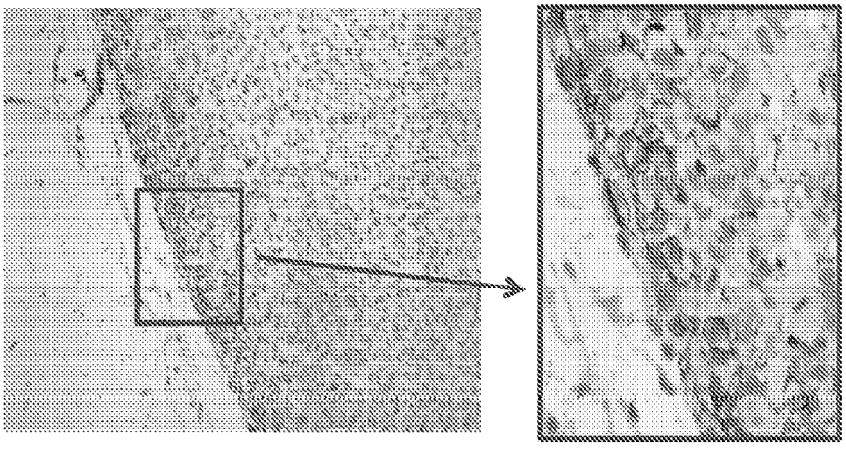


FIG. 13

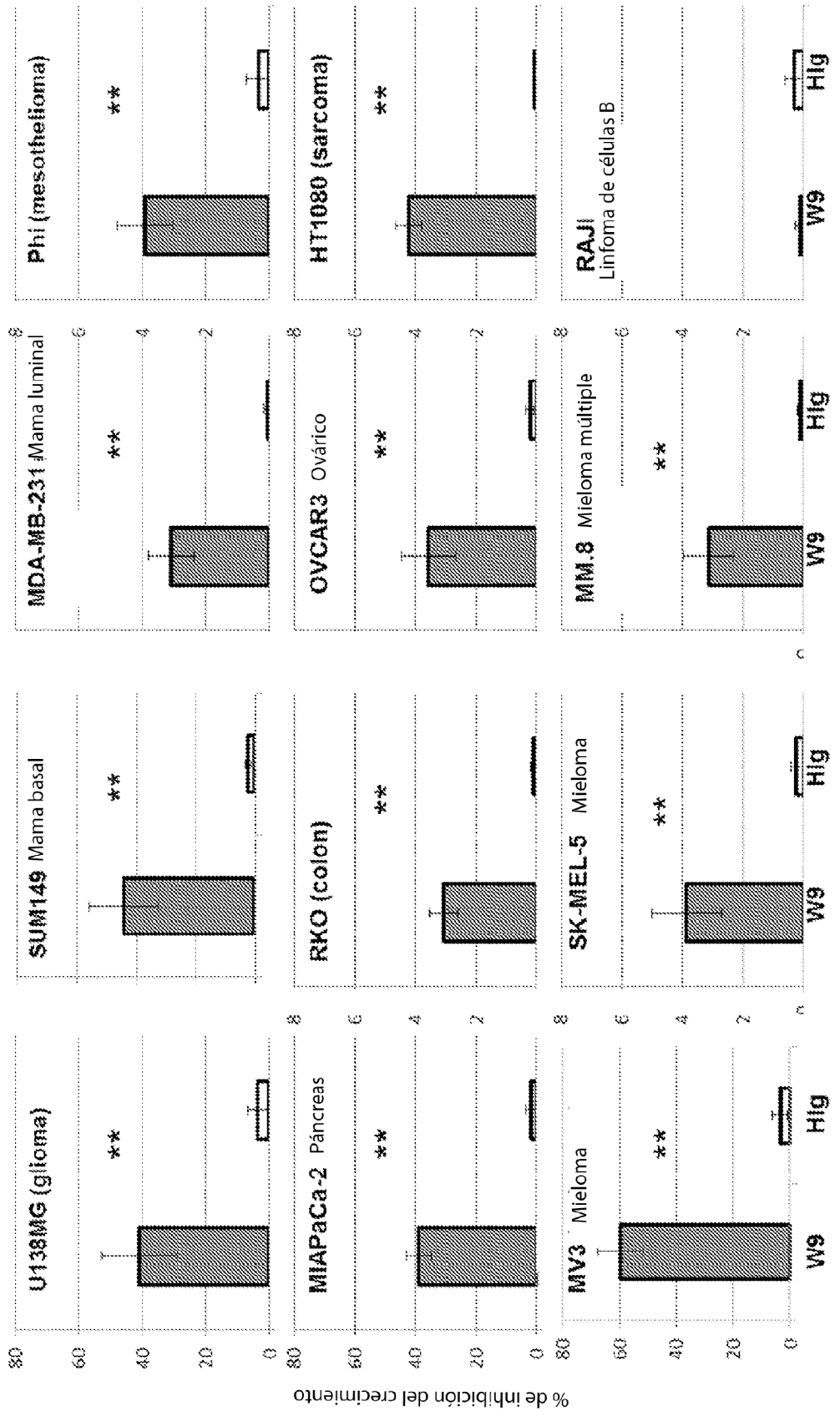

% de inhibición del crecimiento
U138MG (glioma)
SUM149 Mama basal
MDA-MB-231 Mama luminal
Phi (mesothelioma)
MIAPaCa-2 Páncreas
RKO (colon)
OVCAR3 Ovárico
HT1080 (sarcoma)
MV3 Mieloma
SK-MEL-5 Mieloma
MM.8 Mieloma múltiple
RAJI
Linfoma de células B
W9
Hig
**

FIG. 14

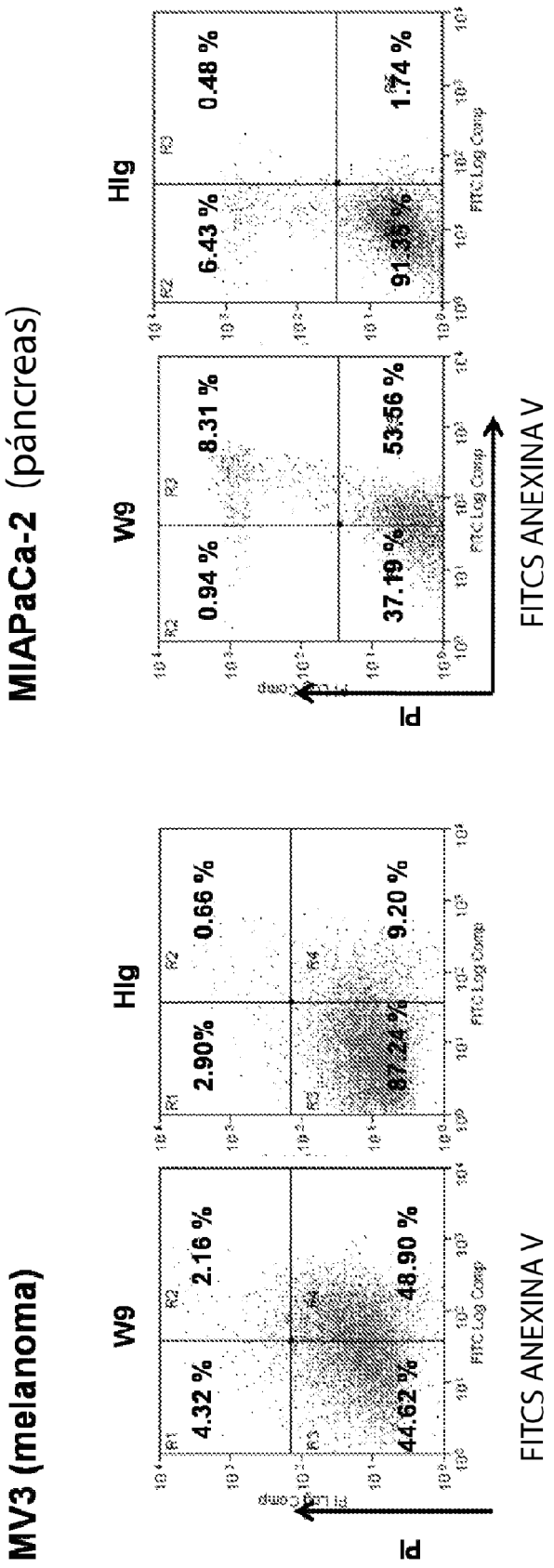
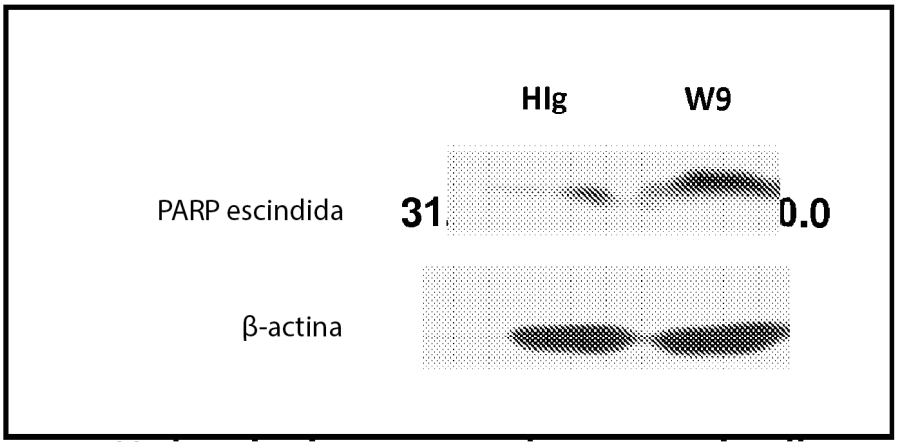

MIAPaCa-2 (páncreas)
W9
Hlg
0.94 %
8.31 %
37.19 %
53.56 %
6.43 %
0.48 %
91.35 %
1.74 %
FITCS ANEXINA V
MV3 (melanoma)
W9
Hlg
4.32 %
2.16 %
44.62 %
48.90 %
2.90%
0.66 %
87.24 %
9.20 %
FITCS ANEXINA V

FIG. 15



a. % de aumento de densidad usando células de control como referencia

FIG. 16

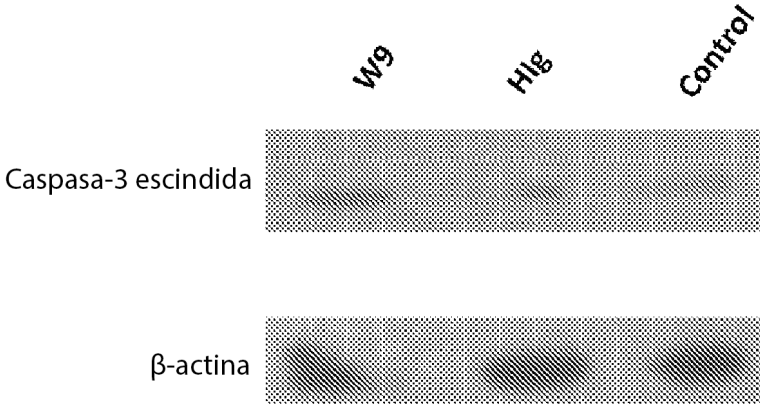


FIG. 17

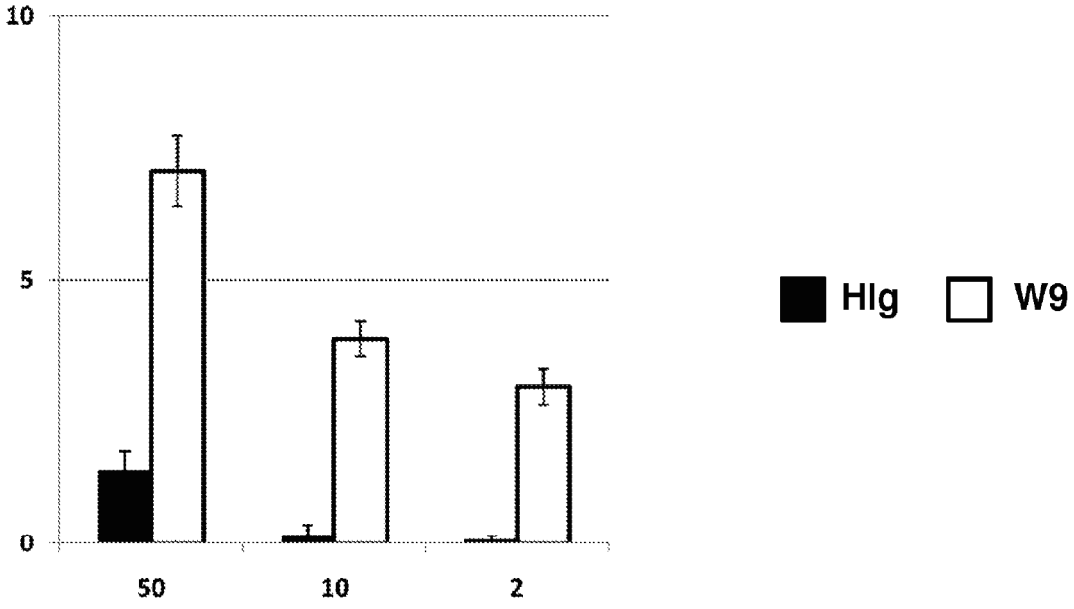

10
5
0
50
10
2
Hlg
W9

FIG. 18

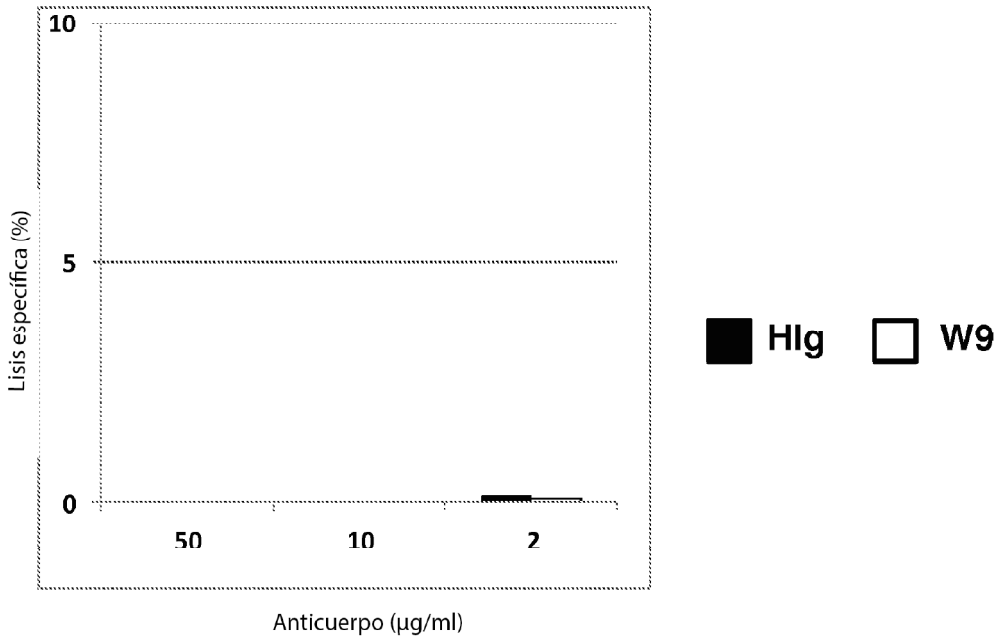

10
5
0
Lisis específica (%)
50
10
2
Anticuerpo (µg/ml)
Hlg
W9

FIG. 19

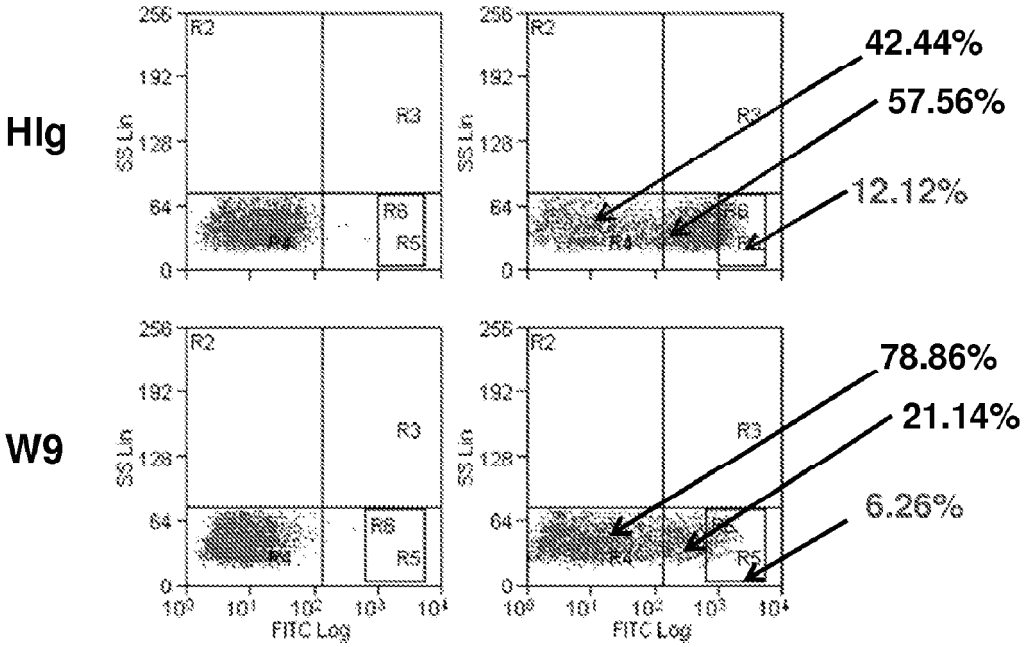

Hlg
W9
SS Lin
FITC Log
R2
R3
R4
R5
R6
42.44%
57.56%
12.12%
78.86%
21.14%
6.26%

FIG. 20

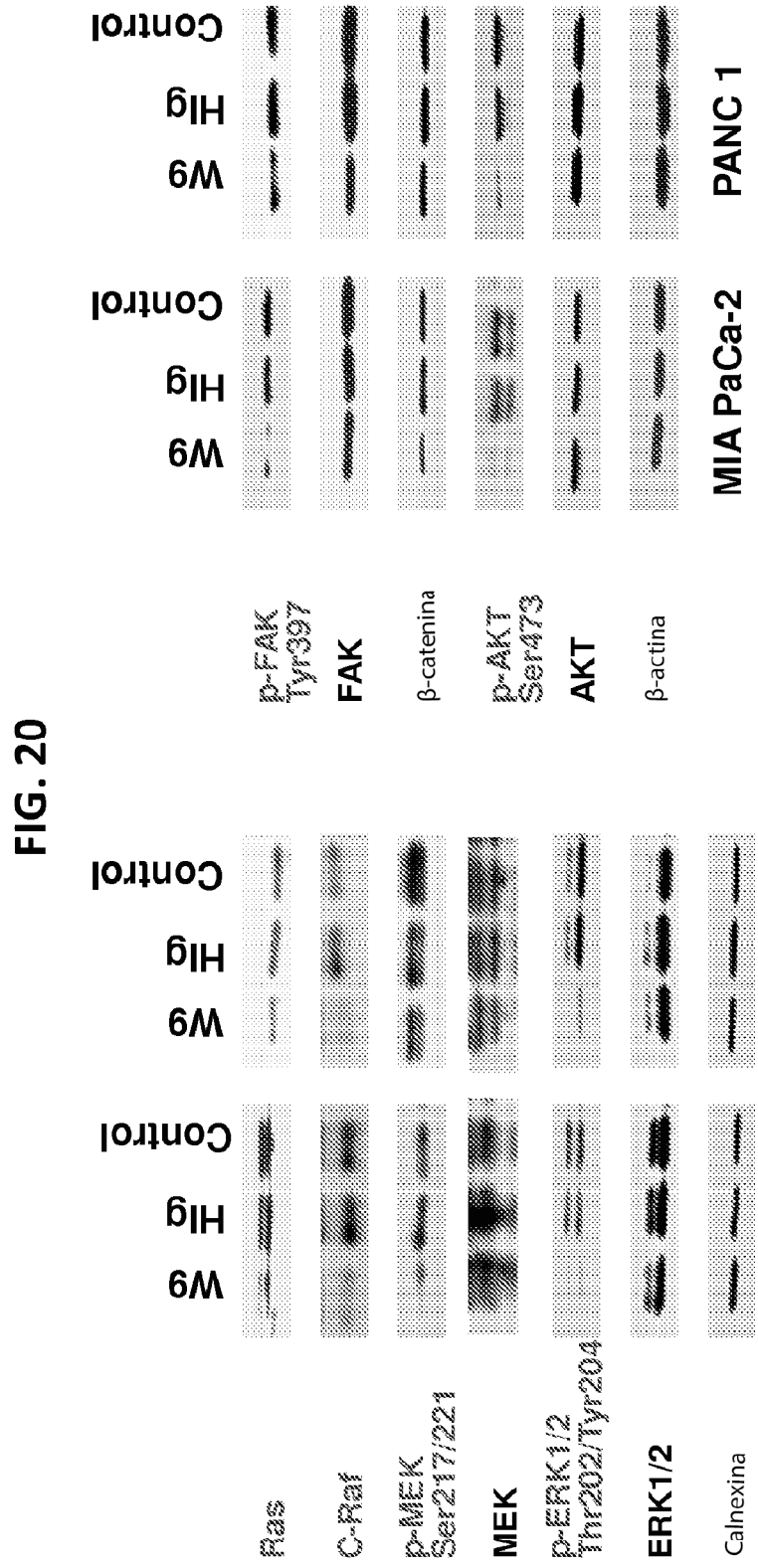

Ras
C-Raf
p-MEK Ser217/221
MEK
p-ERK1/2 Thr202/Tyr204
ERK1/2
Calnexina
p-FAK Tyr397
FAK
β-catenina
p-AKT Ser473
AKT
β-actina
W9
Hlg
Control
MIA PaCa-2
PANC 1

FIG. 21

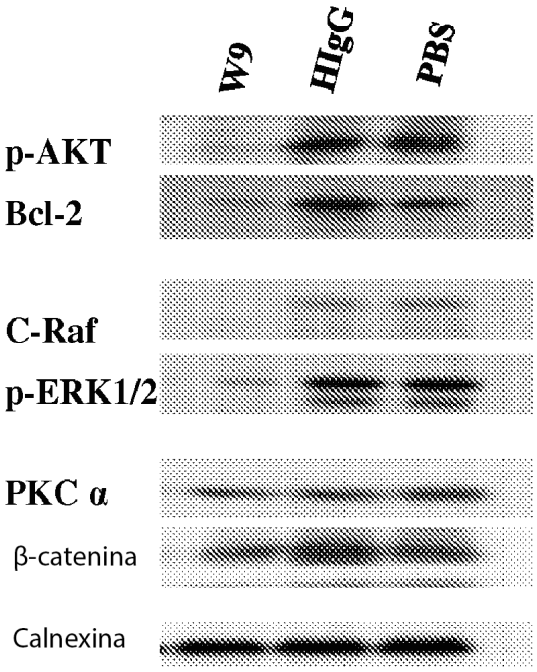

W9
HIgG
PBS
p-AKT
Bcl-2
C-Raf
p-ERK1/2
PKC α
β-catenina
Calnexina

FIG. 22

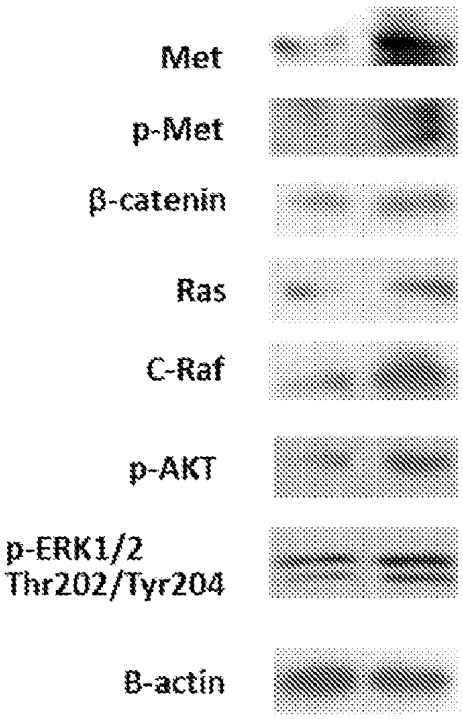
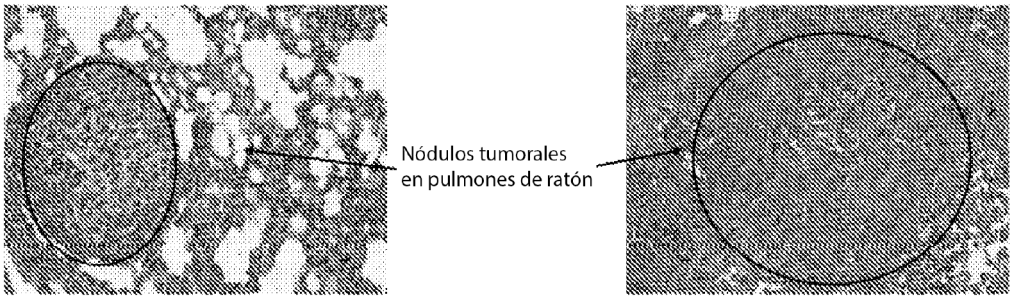

Met
p-Met
β-catenin
Ras
C-Raf
p-AKT
p-ERK1/2
Thr202/Tyr204
B-actin

FIG. 23


Nódulos tumorales
en pulmones de ratón

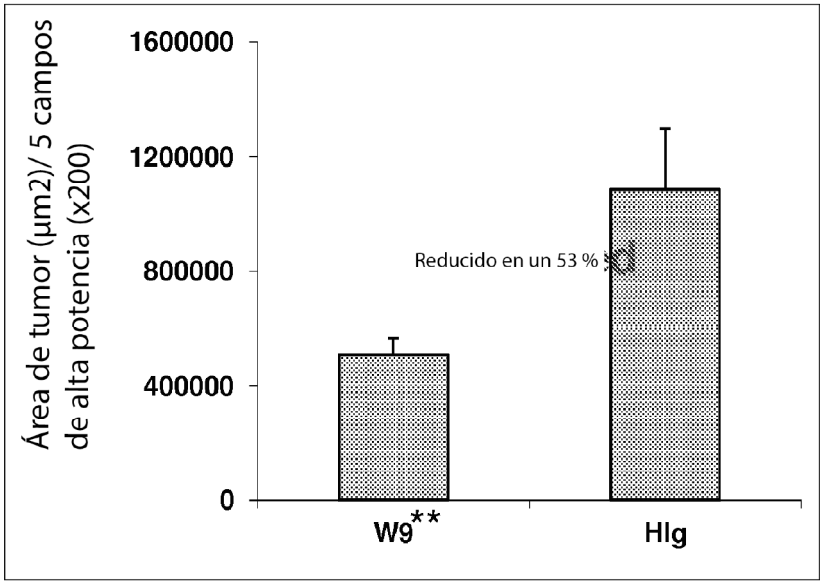
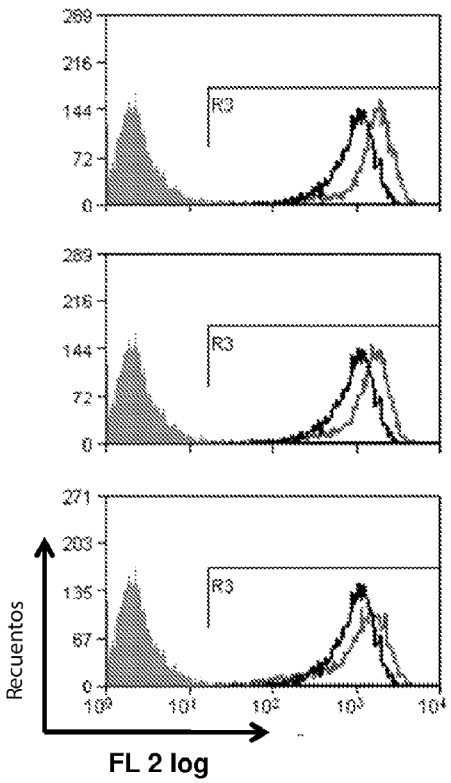

Área de tumor (µm2)/ 5 campos de alta potencia (x200)
1600000
1200000
800000
400000
0
Reducido en un 53 %
W9**
Hlg

FIG. 24



	%	MFI
Control	97.59	1041.89
5-FU (300microM)	91.63	1632.56

	%	MFI
Control	97.59	1041.89
Cisplatina 10microM	91.61	1452.59

	%	MFI
Control	97.59	1041.89
Paclitaxel (20nM)	91.61	1256.23

FIG. 25A

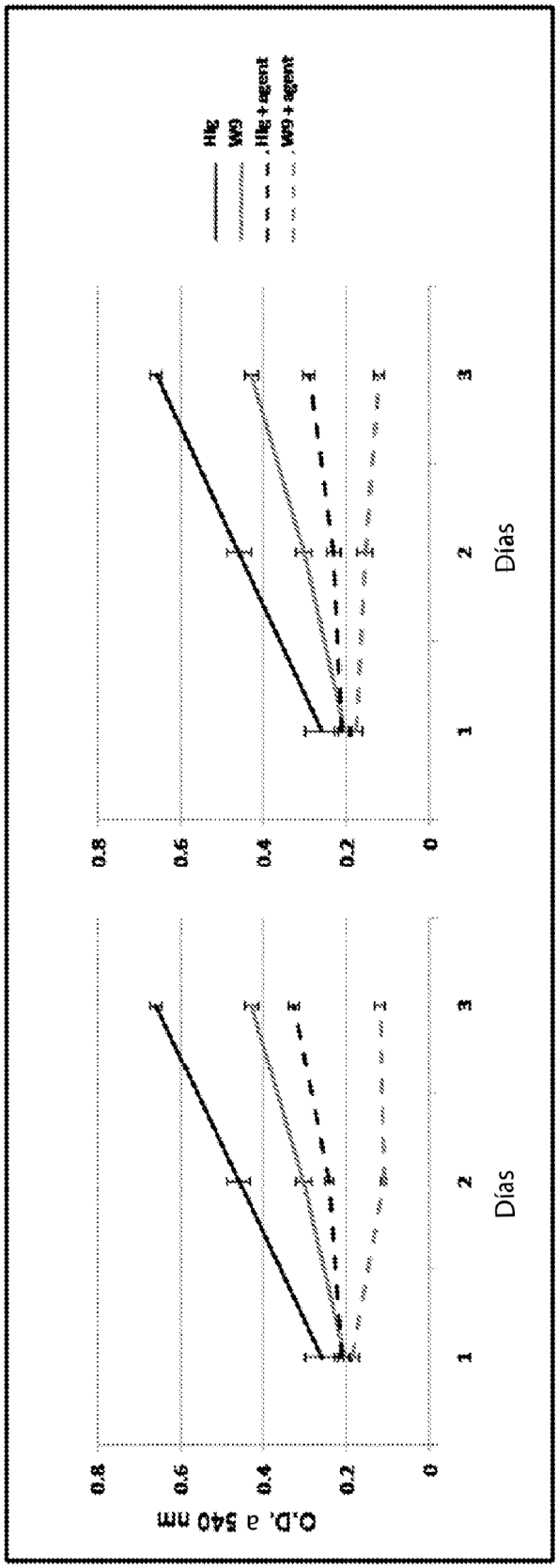


FIG. 25B

FIG. 26

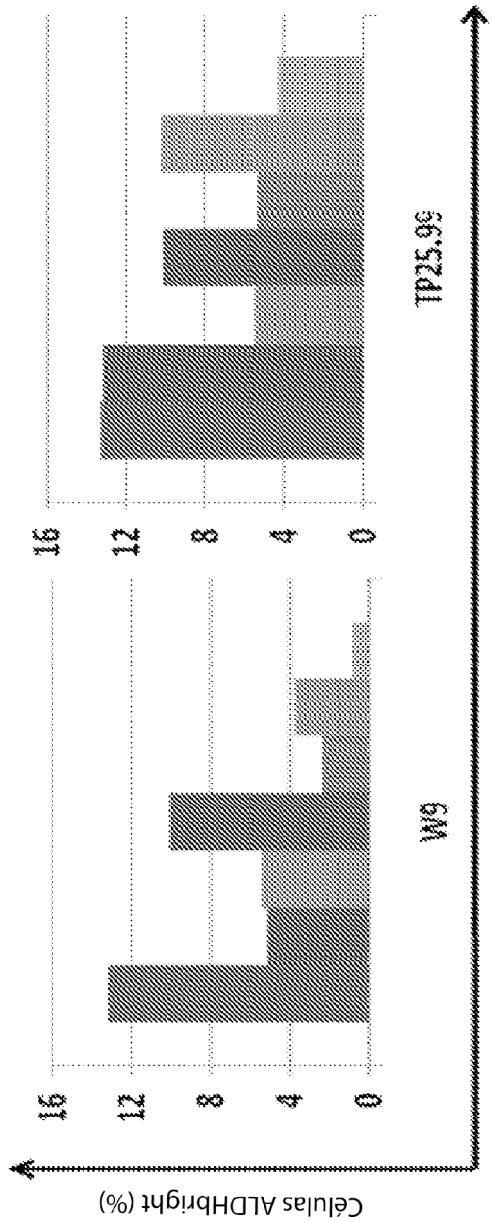

Control
Ab
Ciclopamina
5-FU
Ab + Ciclopamina
Ab + 5-FU
Ab + Ciclopamina + 5FU
Células ALDHbright (%)
16
12
8
4
0
W9
TP25.9$

FIG. 27

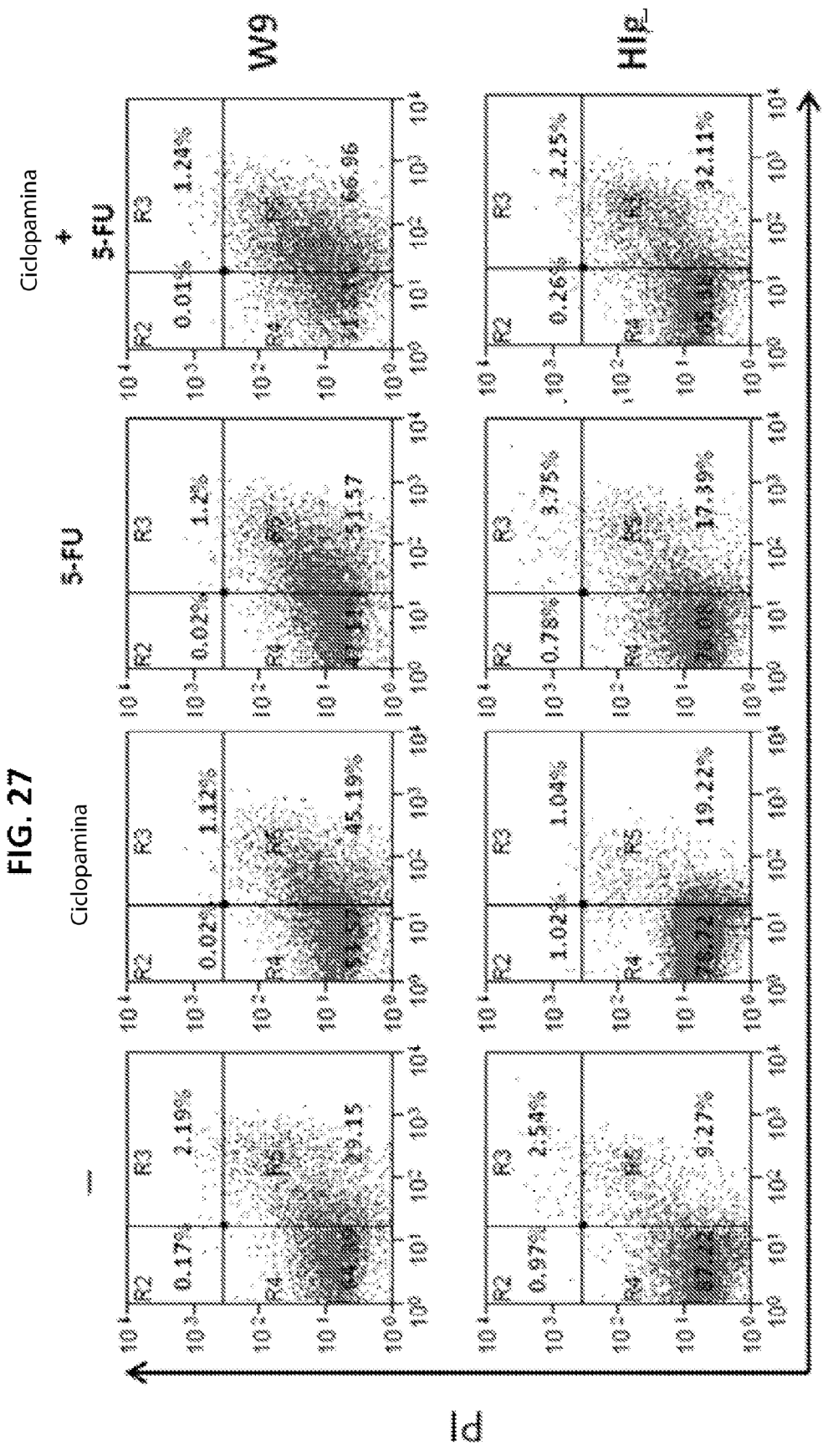


FIG. 28A

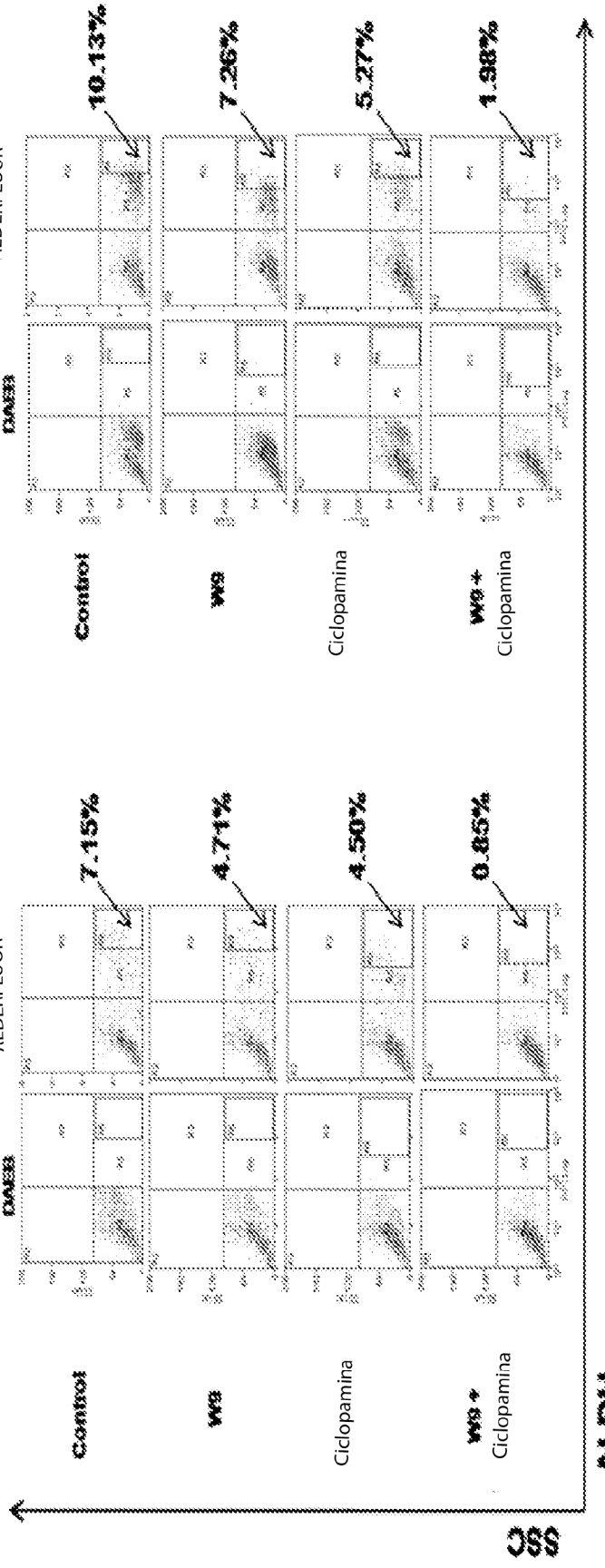


FIG. 28B

FIG. 29

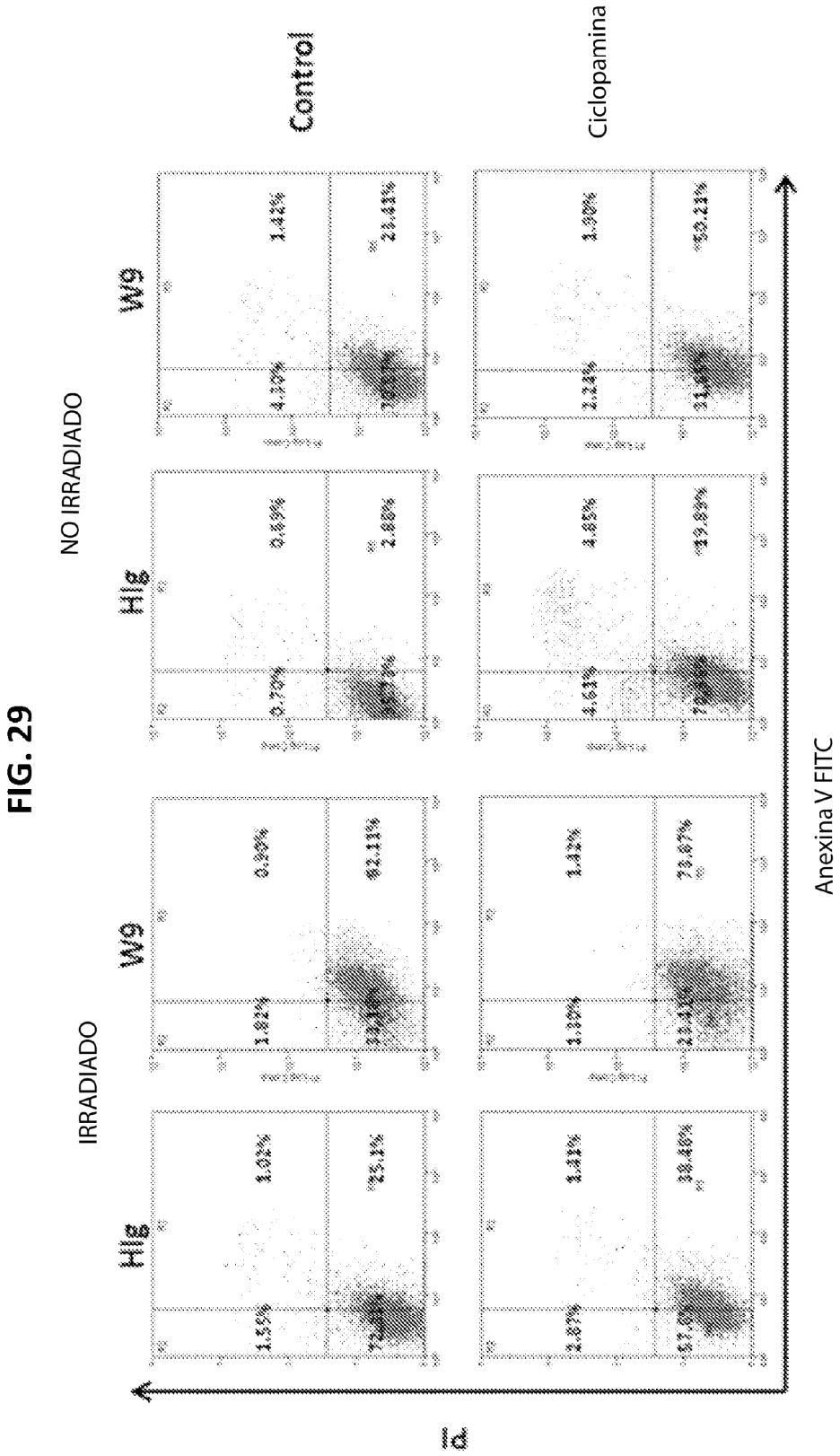

Control
Ciclopamina
NO IRRADIADO
IRRADIADO
Hlg
W9
Hlg
W9
PI
Anexina V FITC

FIG. 30

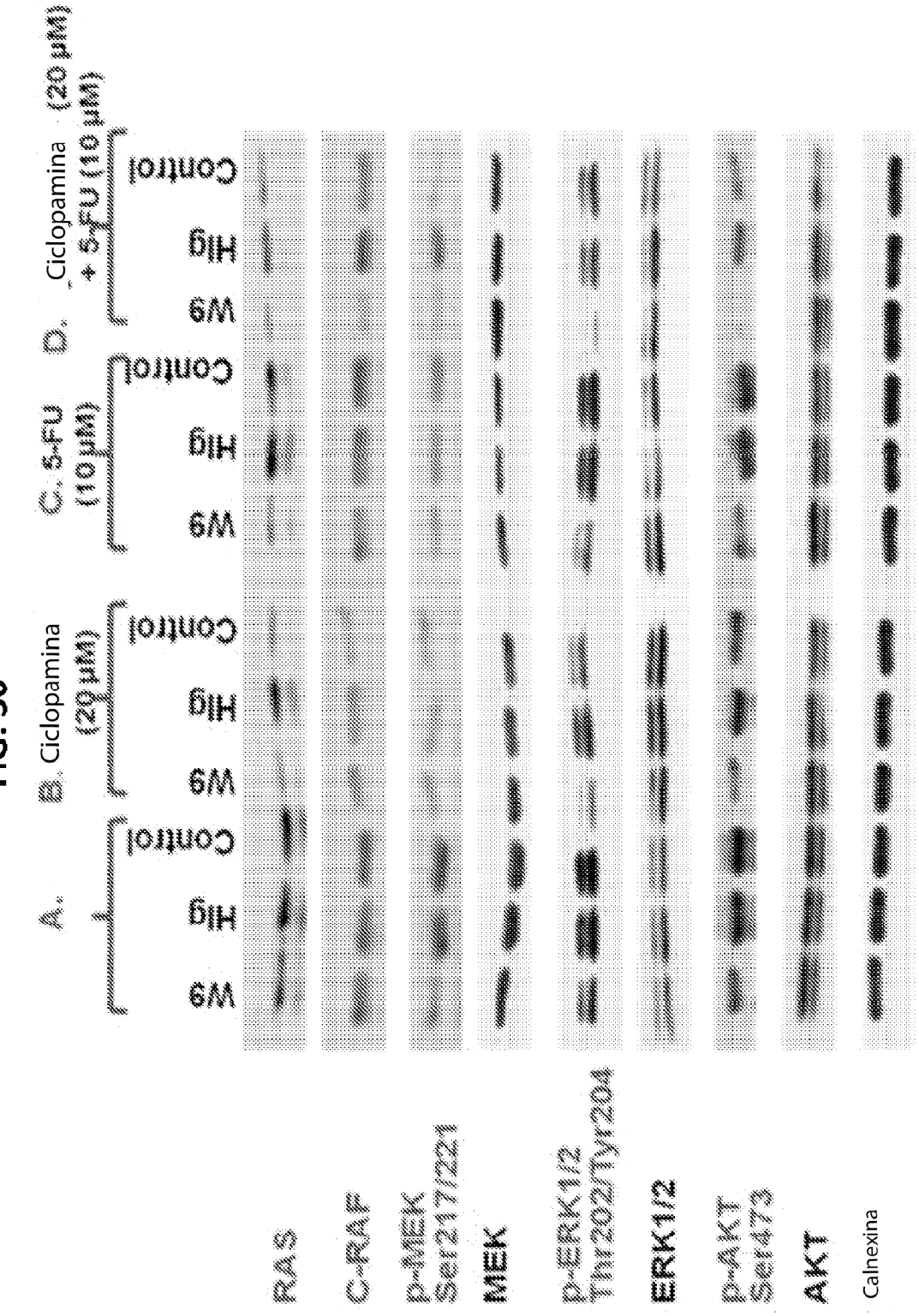
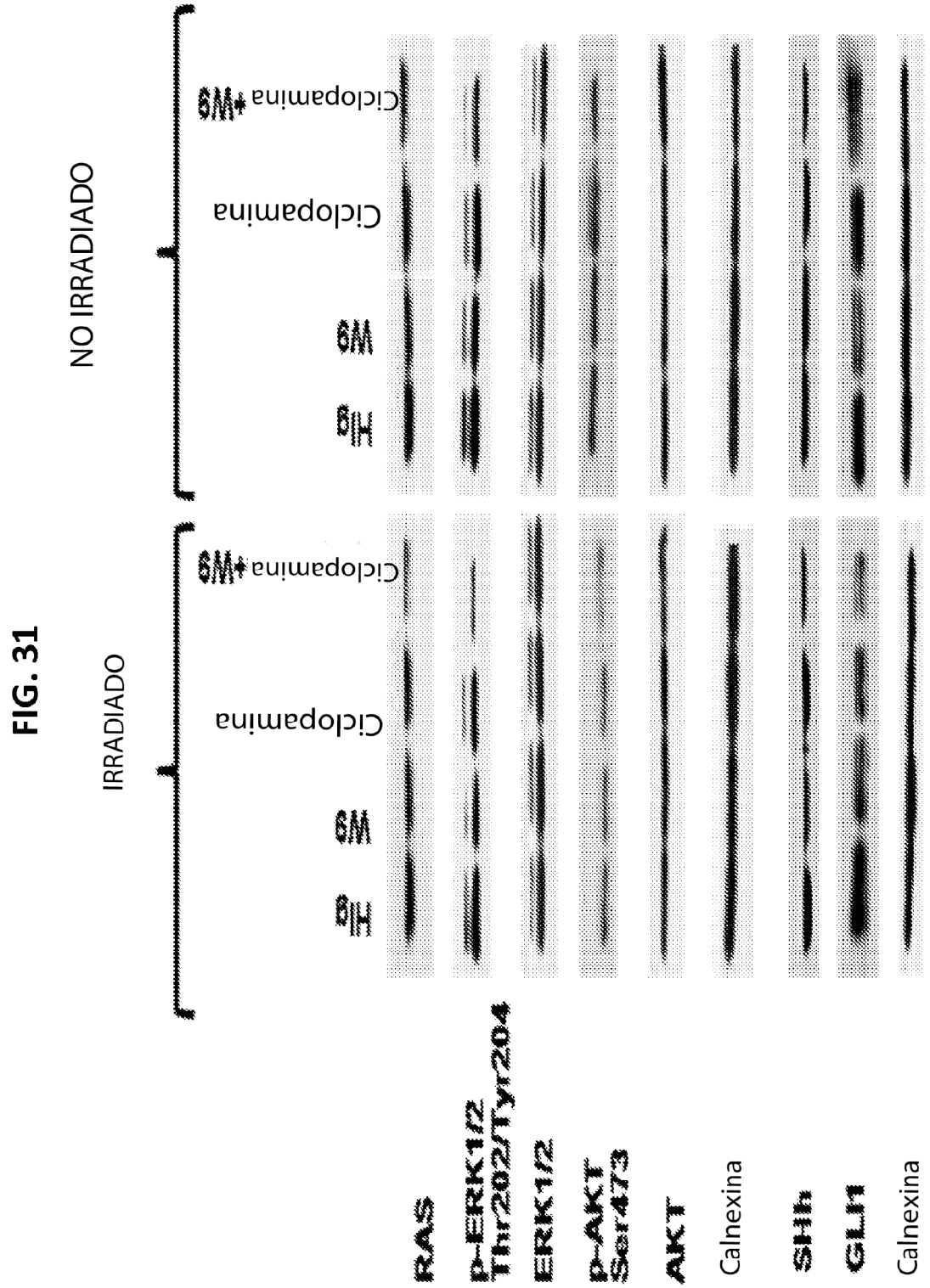

A.
B. Ciclopamina (20 µM)
C. 5-FU (10 µM)
D. Ciclopamina (20 µM) + 5-FU (10 µM)
Control
Hlg
W9
RAS
C-RAF
p-MEK Ser217/221
MEK
p-ERK1/2 Thr202/Tyr204
ERK1/2
p-AKT Ser473
AKT
Calnexina

FIG. 31


IRRADIADO
NO IRRADIADO
H9
M9
Ciclopamina
Ciclopamina +M9
RAS
p-ERK1/2 Thr202/Tyr204
ERK1/2
p-AKT Ser473
AKT
Calnexina
SHh
GLI1
Calnexina