

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 696 518**

51 Int. Cl.:

C07K 16/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.03.2011 PCT/EP2011/001198**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.09.2011 WO11116885**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2011 E 11708201 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018 EP 2550296**

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

30 Prioridad:

23.03.2010 US 316662 P
23.03.2010 EP 10003082

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.01.2019

73 Titular/es:

ASTELLAS PHARMA INC. (50.0%)
5-1, Nihonbashi-Honcho 2-Chome
Chuo-kuTokyo 103-8411, JP y
TRON - TRANSLATIONALE ONKOLOGIE AN DER
UNIVERSITÄTSMEDIZIN DER JOHANNES
GUTENBERG- UNIVERSITÄT MAINZ
GEMEINNÜTZIGE GMBH (50.0%)

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 696 518 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos monoclonales para el tratamiento de cáncer

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

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

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

20 Otros objetivos de anticuerpos que ya están aprobados o en desarrollo clínico para una terapia tumoral tienen cualidades distintivas, que no se basan en una sobreexpresión numérica de las moléculas objetivo en las células tumorales. En el caso de los anticuerpos contra el proteoglicano MUC-1, un epitopo peptídico de repeticiones en la cadena principal del objetivo está poco glicosilado en las células tumorales y por lo tanto está alterado con relación a su contraparte normal.

25 En el caso de anticuerpos contra CD20 (rituximab), CD52 (Campath-1H) y CD22 (epratuzumab), los objetivos de los anticuerpos tienen niveles de expresión comparables en las células tumorales y los linfocitos normales. Aquí, la ablación de células normales por el anticuerpo es tolerable porque las células madre negativas para el objetivo restauran el repertorio normal de linfocitos. Otros ejemplos de accesibilidad diferencial de los objetivos de los anticuerpos son el antígeno carcinoembrionario (CEA) y la carboanhidrasa IX (CA9). Ambos antígenos se expresan en los epitelios normales de colon y riñón, respectivamente. Sin embargo, los anticuerpos para imágenes, marcados radioactivamente, distinguen bien entre el tejido tumoral y el normal, y los anticuerpos citotóxicos se toleran bien. Esto se debe muy probablemente a una expresión restringida de CA9 y CEA en el lado luminal del tejido epitelial normal donde los anticuerpos IgG no tienen acceso. También el antígeno de la molécula de adhesión celular epitelial (Ep-CAM) pertenece a esta categoría. Como una molécula de adhesión celular homotípica para las células epiteliales se localiza en el espacio intercelular. Resulta intrigante el hecho de que aunque los anticuerpos anti-Ep-CAM de alta afinidad son muy tóxicos, los anticuerpos de afinidad intermedia se toleran bien. Esto sugiere la accesibilidad del objetivo de Ep-CAM en las células normales pero también indica que la cinética de la unión del anticuerpo puede abrir una ventana terapéutica.

40 Se han aprobado ocho anticuerpos para el tratamiento de enfermedades neoplásicas, la mayoría de ellos, sin embargo en linfoma y leucemia (Adams, G. P. y Weiner, L. M. (2005) Nat. Biotechnol. 23, 1147-1157). Solo tres AcM, específicamente Herceptin, Avastin y Erbitux, se dirigen a tipos de cáncer sólidos, que representan más del 90 % de la mortalidad provocada por cáncer. La gran necesidad médica existente, el beneficio clínico significativo que los AcM aprobados ya han proporcionado y su considerable éxito comercial han motivado una ola de enfoques innovadores preparados no solo para desarrollar terapias basadas en anticuerpos para grandes grupos de pacientes sino además para mejorar su eficacia (Brekke, O. H. y Sandlie, I. (2003) Nat. Rev. Drug Discov. 2, 52-62; Carter, P. (2001) Nat. Rev. Cancer 1, 118-129).

50 Uno de los retos a dominar para el advenimiento de la próxima generación de mejores compuestos terapéuticos contra el cáncer, basados en anticuerpos es la selección de moléculas objetivo adecuadas, lo cual es la clave para un perfil de toxicidad/eficacia favorable.

55 Los anticuerpos actuales disponibles para el tratamiento de cánceres sólidos, sobre la base de la expresión de sus objetivos en tejidos normales, no explotan suficientemente el poder acumulativo de los mecanismos de acción que se encuentran en las moléculas de anticuerpos. Her2/neu, por ejemplo, el objetivo de Herceptin, se expresa en muchos tejidos humanos normales que incluyen el músculo cardíaco (Crone, S. A., Zhao, Y. Y., Fan, L., Gu, Y., Minamisawa, S., Liu, Y., Peterson, K. L., Chen, J., Kahn, R., Condorelli, G. y otros (2002) Nat. Med. 8, 459-465). Como consecuencia, Herceptin se diseñó con una potencia inmunológica reducida y no puede administrarse a la dosis eficaz máxima, debido a una toxicidad de otra manera inaceptable. Este "despunte de un cuchillo potencialmente filoso" limita la eficacia terapéutica de Herceptin.

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

65 Con el uso de un enfoque integrado de validación experimental y de minería de datos para el descubrimiento de nuevos objetivos para la terapia de cáncer con anticuerpos identificamos a GT468. GT468 es un gen específico de la placenta

que con frecuencia se activa de manera aberrante y se expresa altamente en una variedad de tipos de tumores, en particular cáncer de mama. El silenciamiento de GT468 mediado por iRNA en células de cáncer de mama MCF-7 y BT-549 afecta profundamente la motilidad, la migración y la invasión e induce un bloqueo del ciclo celular en G1/S con abolición casi completa de la proliferación. La disminución de GT468 se asocia con una expresión disminuida de la ciclina D1 y una fosforilación reducida de la AKT quinasa. Además, GT468 se localiza en la superficie de las células cancerosas y está accesible para los anticuerpos que antagonizan las funciones biológicas de esta molécula.

GT468 tiene numerosas propiedades que lo convierten en un objetivo muy atractivo para anticuerpos terapéuticos. Dado que es un antígeno de diferenciación de un linaje celular que aparece en el cuerpo humano solo en un estado excepcional como el embarazo, está tan ausente de los tejidos saludables relevantes para la toxicidad como un autoantígeno puede estarlo. Su alta prevalencia en una variedad de entidades tumorales haría posible que un amplio número de pacientes fuesen elegibles para el tratamiento con terapias dirigidas a GT468. En el caso del cáncer de mama, por ejemplo, el 82 % de los pacientes portan este objetivo. En cambio, Her2/neu, el objetivo del Herceptin, el único anticuerpo monoclonal (AcM) disponible para el tratamiento de este tipo de cáncer, se sobreexpresa en solo el 20-25 % de los pacientes con cáncer de mama (Slamon, D. J., Godolphin, W., Jones, L. A., Holt, J. A., Wong, S. G., Keith, D. E., Levin, W. J., Stuart, S. G., Udove, J., Ullrich, A. y otros, (1989) Science 244, 707-712). Para el cáncer de pulmón y para el cáncer gástrico, en donde GT468 se expresa en el 42 y el 58 % de los casos respectivamente, no existe un tratamiento de AcM aprobado hasta ahora, debido a la carencia de objetivos apropiados en estos tipos de cáncer.

GT468 es susceptible de ser modulado por anticuerpos en las células vivas y tales anticuerpos pueden precipitar los efectos antitumorales como la inhibición de la proliferación, como se mostró recientemente *in vitro* en el documento EP 1 970 384. GT468 participa no solo en la proliferación, sino también en la motilidad celular, la migración y la invasión. Lo más interesante es que todos estos atributos no solo contribuyen sustancialmente al fenotipo tumoral sino que también son propiedades inherentes del trofoblasto humano, cuyas características fisiológicas son un crecimiento rápido y la invasión eficiente en el tejido uterino. Se espera que puedan diseñarse AcM contra GT468, que intervengan con todas estas funciones a la vez en la cima de su potencial para mediar las funciones efectoras inmunitarias tal como ADCC y CDC.

Resumen de la invención

La presente enseñanza describe generalmente anticuerpos útiles como compuestos terapéuticos para tratar y/o prevenir enfermedades asociadas con células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular, que incluyen enfermedades relacionadas con tumores tales como cáncer, en particular cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de ovario, cáncer hepatocelular, cáncer de colon, cáncer pancreático, cáncer de esófago, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, en particular, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, cáncer de hígado, melanoma, sarcoma, mieloma, neuroblastoma, coriocarcinoma placentario, cáncer de cuello uterino y cáncer de tiroides, y las formas metastásicas de estos. En una modalidad, la enfermedad cancerosa es cáncer metastásico en el pulmón.

En un aspecto la enseñanza se refiere a un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a GT468. Los anticuerpos descritos en la presente preferentemente son anticuerpos monoclonales aislados que se unen específicamente a un epítipo presente en GT468, preferentemente un epítipo ubicado dentro del dominio extracelular de GT468, con mayor preferencia las secs. con núms. de ident.: 3-10 y 35-82. Preferentemente, el anticuerpo tiene la capacidad de unirse al GT468 ubicado en la superficie celular y preferentemente se une a uno o más epítopos ubicados dentro del dominio extracelular de GT468, preferentemente dentro de los residuos de aminoácidos 23-212 de GT468, y con la máxima preferencia se une a un epítipo ubicado dentro de una de las secuencias de aminoácidos de las secs. con núms. de ident.: 3-10 y 35-82. En una modalidad preferida, el anticuerpo es específico para una o más de las secuencias de aminoácidos de las secs. con núms. de ident.: 3-10 y 35-82. En diversas modalidades, el anticuerpo tiene la capacidad de unirse a un péptido que comprende los aminoácidos 29 a 119, preferentemente los aminoácidos 29 a 212 y con mayor preferencia los aminoácidos 23 a 212 de la sec. con núm. de ident.: 2.

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

En una modalidad, el anticuerpo de la enseñanza se une a uno o más de los péptidos de acuerdo con las secs. con núms. de ident.: 75-79. En una modalidad, el anticuerpo se une al péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 75 y/o el péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 76, con mayor preferencia se une al péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 75 y el péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 76. En otra modalidad, el anticuerpo se une al péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 77 y/o el péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 78 y/o el péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 79, con mayor preferencia se une al péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 78 y el péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 79 o se une al péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 77, el péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 78 y el péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 79.

5 En una modalidad, el anticuerpo de la enseñanza se obtiene mediante el uso del péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 4 o el péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 80 para la inmunización. En otra modalidad, el anticuerpo de la enseñanza se obtiene mediante el uso del péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 6 o el péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 81 para la inmunización. Preferentemente, el anticuerpo de la enseñanza se une a uno o más de dichos péptidos.

10 En una modalidad adicional, el anticuerpo que se une al péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 75 y/o el péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 76, con mayor preferencia se une al péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 75 y el péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 76 se obtiene mediante el uso del péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 4 o el péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 80 para la inmunización. En otra modalidad, el anticuerpo que se une al péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 77 y/o el péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 78 y/o el péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 79, con mayor preferencia se une al péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 78 y el péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 79 o se une al péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 77, el péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 78 y el péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 79 se obtiene mediante el uso del péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 6 o el péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 81 para la inmunización.

20 En una modalidad, el anticuerpo de la enseñanza se une a uno o más de los péptidos de acuerdo con las secs. con núms. de ident.: 60-66, preferentemente de acuerdo con las secs. con núms. de ident.: 61-66. En una modalidad, el anticuerpo se une al péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 60 y/o el péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 61 y/o el péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 62, con mayor preferencia se une al péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 60 y el péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 61 y el péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 62. En una modalidad, el anticuerpo se une al péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 61 y/o el péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 62, con mayor preferencia se une al péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 61 y el péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 62. En otra modalidad, el anticuerpo se une al péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 64 y/o el péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 65, con mayor preferencia se une al péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 64 y el péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 65. En otra modalidad, el anticuerpo se une al péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 65 y/o el péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 66, con mayor preferencia se une al péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 65 y el péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 66.

35 En una modalidad, el anticuerpo de la enseñanza se obtiene mediante el uso del péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 82 para la inmunización. Preferentemente, el anticuerpo de la enseñanza se une a dicho péptido. El péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 82 tiene un enlazador GS C-terminal que se ha añadido para ayudar en la formación de un enlace disulfuro entre los aminoácidos 1 y 16 del péptido. Este péptido presumiblemente se asemeja a la conformación nativa de GT468. Los anticuerpos producidos por el hibridoma 51-1A-1 que se ha obtenido mediante el uso del péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 82 para la inmunización mostraron fuerte actividad inhibitoria sobre la proliferación y la formación de colonias de células cancerosas que expresan GT468.

40 En una modalidad adicional, el anticuerpo que se une al péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 64 y/o el péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 65, con mayor preferencia se une al péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 64 y el péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 65 o el anticuerpo que se une al péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 65 y/o el péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 66, con mayor preferencia se une al péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 65 y el péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 66 se obtiene mediante el uso del péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 82 para la inmunización.

50 En una modalidad, el anticuerpo de la enseñanza se une a uno o más de los péptidos de acuerdo con las secs. con núms. de ident.: 57-60. En una modalidad, el anticuerpo se une al péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 57 y/o el péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 58 y/o el péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 59, con mayor preferencia se une al péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 57 y el péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 58 o se une al péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 57 y el péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 58 y el péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 59. En otra modalidad, el anticuerpo se une al péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 59 y/o el péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 60, con mayor preferencia se une al péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 59 y el péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 60.

60 En una modalidad, el anticuerpo de la enseñanza se obtiene mediante el uso del péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 3 para la inmunización. Preferentemente, el anticuerpo de la enseñanza se une a dicho péptido.

65 Preferentemente, el anticuerpo de la enseñanza se une a células cancerosas, en particular células de los tipos de cáncer mencionados en la presente y, preferentemente, no se une sustancialmente a células no cancerosas, con mayor preferencia no se une sustancialmente a células no cancerosas aparte de las células de la placenta y células de los testículos. Preferentemente, la unión de dicho anticuerpo a las células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular tal como las células cancerosas, media la destrucción de dichas células

y/o inhibe una o más actividades de tales células como la motilidad, la migración, la invasión, la proliferación y/o la formación de colonias. Preferentemente, el anticuerpo inhibe la proliferación y/o la formación de colonias de dichas células.

La destrucción de las células y/o la inhibición de una o más actividades de las células, en particular la proliferación celular y la formación de colonias, por el anticuerpo de la enseñanza se induce preferentemente por la unión del anticuerpo al GT468 expresado por dichas células y/o que se asocia con la superficie celular de dichas células. Tal destrucción de células y/o inhibición de una o más actividades de las células pueden utilizarse terapéuticamente como se describe en la presente descripción. En particular, la destrucción de las células y/o la inhibición de la proliferación de las células y/o la inhibición de la formación de colonias de las células pueden utilizarse para tratar o prevenir un cáncer, incluyendo la metástasis del cáncer. La inhibición de la motilidad, la migración, la invasión, la proliferación y/o la formación de colonias de células pueden utilizarse, en particular, para tratar o prevenir la metástasis de un cáncer y la diseminación metastásica de las células cancerosas.

Las células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular son preferentemente células cancerosas y, en particular, se seleccionan del grupo que consiste en células cancerosas tumorigénicas de las siguientes enfermedades cancerosas: cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de ovario, cáncer hepatocelular, cáncer de colon, cáncer pancreático, cáncer de esófago, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, en particular, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, cáncer de hígado, melanoma, sarcoma, mieloma, neuroblastoma, coriocarcinoma placentario, cáncer de cuello uterino y cáncer de tiroides, y las formas metastásicas de estos. En una modalidad, la enfermedad cancerosa es cáncer metastásico en el pulmón.

El anticuerpo de la invención se puede unir a uno o más restos efectores terapéuticos, por ejemplo, radiomarcadores, citotoxinas, enzimas terapéuticas, agentes que inducen apoptosis y similares para proporcionar una citotoxicidad dirigida, es decir, destrucción de las células tumorales.

Preferentemente, el anticuerpo descrito en la presente media la destrucción de las células mediante la inducción de lisis mediada por la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), lisis mediada por la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), apoptosis, adhesión homotípica y/o fagocitosis, preferentemente mediante la inducción de lisis mediada por CDC y/o lisis mediada por ADCC. Sin embargo, la presente enseñanza incluye, además, modalidades en las que el anticuerpo ejerce su actividad como se describe en la presente descripción tal como la destrucción de las células y/o la inhibición de una o más actividades de las células, por ejemplo, proliferación celular y/o formación de colonias, sin inducir lisis mediada por la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), lisis mediada por la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), apoptosis, adhesión homotípica y/o fagocitosis. Por ejemplo, el anticuerpo de la enseñanza puede ejercer, además, un efecto simplemente al unirse a GT468 en la superficie celular, por ejemplo, bloqueando la proliferación de las células. En una modalidad el anticuerpo de la enseñanza no induce lisis de las células mediada por CDC.

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

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

En una modalidad particularmente preferida, el anticuerpo de la enseñanza tiene la actividad de inhibir o reducir la formación de colonias de células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular, preferentemente células cancerosas tal como células de cáncer de mama. Esta actividad puede medirse in vitro en un ensayo clonogénico. Las líneas celulares BT-549, Caov-3, EFO-21, SK-BR-3, MCF-7, MDA-MB-468 y MDA-MB-231 pueden usarse como células cancerosas que expresan GT468. Un ensayo clonogénico es una técnica de microbiología para estudiar la efectividad de agentes específicos en la supervivencia y proliferación de las células. Se usa con frecuencia en los laboratorios de investigación del cáncer para determinar el efecto de los fármacos o la radiación sobre las células tumorales en proliferación. El experimento implica tres etapas principales: (i) aplicar un tratamiento a una muestra de células, en particular células cancerosas, (ii) sembrar las células en un recipiente de cultivo tisular y (iii) dejar las células crecer. Las colonias producidas son fijadas, teñidas y contadas. La formación de colonias es importante con respecto a la formación de metástasis si las células tumorales individuales colonizan los órganos. La actividad inhibidora de los anticuerpos indica su potencial para suprimir la formación de metástasis. Los anticuerpos que tienen la actividad de inhibir o reducir la formación de colonias en un ensayo clonogénico son, particularmente, útiles para tratar o prevenir la metástasis y la diseminación metastásica de células cancerosas, en particular, de los tipos de cáncer mencionados en la presente descripción. Los anticuerpos preferidos en este sentido se seleccionan del grupo que consiste en (i) anticuerpos producidos y/o que pueden obtenerse de los hibridomas 51G6 2H3 2B4, 78H11 1H6, 16-5B-1, 22-1A-1, 29-8B-1, y 51-1A-1, (ii) anticuerpos que son formas quiméricas o humanizadas de los anticuerpos en (i), y (iii) anticuerpos que tienen la especificidad de los anticuerpos en (i) y, en particular, anticuerpos que comprenden la porción de unión al antígeno o el sitio de unión al antígeno, en particular la región variable, de los anticuerpos en (i). Los anticuerpos particularmente preferidos en este sentido se seleccionan del grupo que consiste en (i) anticuerpos producidos y/o que pueden obtenerse de los hibridomas 51G6 2H3 2B4, 29-8B-1, y 51-1A-1, (ii) anticuerpos que son formas quiméricas o humanizadas de los anticuerpos en (i), y (iii) anticuerpos que tienen la especificidad de los anticuerpos en (i) y, en particular, anticuerpos que comprenden la porción de unión al antígeno o el sitio de unión al antígeno, en particular la región variable, de los anticuerpos en (i).

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

En una modalidad la enseñanza se refiere a anticuerpos que (i) se unen a células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular, y (ii) no se unen a las células que no expresan GT468 y/o que no se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular. Los anticuerpos de la enseñanza preferentemente (i) median la destrucción y/o inhibición de la proliferación de células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular, y (ii) no median la destrucción y/o no inhiben la proliferación de células que no expresan GT468 y/o que no se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular.

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

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

La unión de un anticuerpo de la enseñanza al antígeno de GT468 puede mediar la destrucción de células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular (por ejemplo una célula tumoral), por ejemplo mediante la activación del sistema del complemento, y/o puede inhibir la proliferación de células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular (por ejemplo una célula tumoral). Alternativamente o además de mediar la destrucción de células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular y/o inhibir la proliferación de células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular, la unión de un anticuerpo de la enseñanza al antígeno de GT468 puede inhibir la motilidad, la migración, la formación de colonias y/o la invasión de células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular (por ejemplo una célula tumoral), y por lo tanto, puede inhibir la dispersión metastásica de células tumorales. La destrucción de células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular puede ocurrir mediante uno o más de los siguientes mecanismos: citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) de las células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular; apoptosis de las células que expresan GT468 y/o

que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular; fagocitosis por células efectoras de las células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular; o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos de células efectoras (ADCC) de las células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular.

De acuerdo con todos los aspectos de la enseñanza, GT468 es preferentemente GT468 humano, preferentemente con la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 2, con mayor preferencia con la secuencia de aminoácidos del dominio extracelular de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 2, en particular con la secuencia de aminoácidos que abarca de los aminoácidos 23 a 212 de la sec. con núm. de ident.: 2.

En modalidades preferidas particulares, el anticuerpo de la enseñanza se une a epítomos nativos de GT468 presentes en la superficie de las células vivas, tales como los de las secs. con núms. de ident.: 3-10 y 35-82. En modalidades preferidas adicionales, el anticuerpo de la invención es específico para células cancerosas, preferentemente células de cáncer de mama. Preferentemente, el anticuerpo de la enseñanza es específico para células cancerosas que expresan GT468 tal como las líneas celulares BT-549, Caov-3, EFO-21, SK-BR-3, MCF-7, MDA-MB-468 y MDA-MB-231 y no se une a las células cancerosas que no expresan GT468 tal como las células cancerosas gástricas NUG-C4.

En determinadas modalidades de la enseñanza, GT468 se expresa sobre y/o se asocia con la superficie de células.

Los anticuerpos de la enseñanza pueden obtenerse mediante un método que comprende la etapa de inmunizar un animal con una proteína o péptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secs. con núms. de ident.: 2-10 y 35-82, o un fragmento inmunogénico o derivado de estos, o un ácido nucleico o célula huésped que expresa dicha proteína o péptido, o fragmento inmunogénico o derivado de estos. Preferentemente, un anticuerpo de la enseñanza es específico para las proteínas, péptidos o fragmentos inmunogénicos antes mencionados o derivados de estos. En el contexto de una proteína o péptido utilizado en la inmunización, un derivado se refiere a una variante de dicha proteína o péptido que tiene las mismas propiedades inmunogénicas que la proteína o péptido a partir del cual se deriva. En particular, el derivado de una proteína o péptido cuando se utiliza en la inmunización para la producción de anticuerpos, en particular anticuerpos monoclonales, proporciona anticuerpos que tienen la misma especificidad que los anticuerpos obtenidos cuando se usa la proteína o péptido en la inmunización. Por ejemplo, un derivado de este tipo puede incluir la delección, sustitución o adición de uno o más aminoácidos. En particular, puede incluir la adición de uno o más aminoácidos tal como cisteína en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal o ambos.

En una modalidad particularmente preferida, el anticuerpo de la enseñanza se produce mediante un clon que tiene el núm. de acceso. DSM ACC2822 (4E9-1H9), DSM ACC2826 (9B6-2A9), DSM ACC2824 (59D6-2F2), DSM ACC2825 (61C11-2B5), DSM ACC2823 (78H11-1H6), DSM ACC2895 (22-1A-1), DSM ACC2893 (22-2A-1), DSM ACC2896 (22-9B-1), DSM ACC2897 (23-33A-1), DSM ACC2891 (23-19A-1), DSM ACC2894 (F11#33F7D12), DSM ACC2892 (4A12 2D4 1A10), DSM ACC2898 (4E9 1D12 2D4), DSM ACC2961 (42H11 1C11 2B2), DSM ACC2962 (51G6 2H3 2B4), DSM ACC2943 (16-5B-1), DSM ACC2956 (20-11A-1), DSM ACC2947 (29-1A-2), DSM ACC2964 (29-8B-1), DSM ACC2959 (35-48B-1), DSM ACC2963 (35-50A-2a), DSM ACC2957 (38-10B-1), DSM ACC2958 (38-1A-1), DSM ACC2948 (44-3A-2), DSM ACC2949 (45-2A-1), DSM ACC2950 (45-8A-2), DSM ACC2951 (48-3B-1), DSM ACC2952 (48-4A-1), DSM ACC2946 (49-3A-1), DSM ACC2945 (49-8A-1), DSM ACC2944 (51-1A-1), DSM ACC2953 (53-13A-2), DSM ACC2955 (53-29A-1), DSM ACC2960 (54-4B-2), DSM ACC2954 (56-4A-2), DSM ACC3001 (62-9B-1), DSM ACC3039 (4A5 1E11 1B7), DSM ACC3037 (7H12 2E6 2C4), DSM ACC3036 (11D7 1G10 2B4), DSM ACC3038 (18-2A-1), DSM ACC3040 (63-1A-2), o DSM ACC3042 (3E5 2G4).

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

En otro aspecto la enseñanza se refiere a un hibridoma capaz de producir el anticuerpo de la enseñanza. Los hibridomas preferidos son los que tienen el núm. de acceso. DSM ACC2822 (4E9-1H9), DSM ACC2826 (9B6-2A9), DSM ACC2824 (59D6-2F2), DSM ACC2825 (61C11-2B5), DSM ACC2823 (78H11-1H6), DSM ACC2895 (22-1A-1), DSM ACC2893 (22-2A-1), DSM ACC2896 (22-9B-1), DSM ACC2897 (23-33A-1), DSM ACC2891 (23-19A-1), DSM ACC2894 (F11#33F7D12), DSM ACC2892 (4A12 2D4 1A10), DSM ACC2898 (4E9 1D12 2D4), DSM ACC2961 (42H11 1C11 2B2), DSM ACC2962 (51G6 2H3 2B4), DSM ACC2943 (16-5B-1), DSM ACC2956 (20-11A-1), DSM ACC2947 (29-1A-2), DSM ACC2964 (29-8B-1), DSM ACC2959 (35-48B-1), DSM ACC2963 (35-50A-2a), DSM ACC2957 (38-10B-1), DSM ACC2958 (38-1A-1), DSM ACC2948 (44-3A-2), DSM ACC2949 (45-2A-1), DSM ACC2950 (45-8A-2), DSM ACC2951 (48-3B-1), DSM ACC2952 (48-4A-1), DSM ACC2946 (49-3A-1), DSM ACC2945 (49-8A-1), DSM ACC2944 (51-1A-1), DSM ACC2953 (53-13A-2), DSM ACC2955 (53-29A-1), DSM ACC2960 (54-4B-2), DSM ACC2954 (56-4A-2), DSM ACC3001 (62-9B-1), DSM ACC3039 (4A5 1E11 1B7), DSM ACC3037 (7H12 2E6 2C4), DSM ACC3036 (11D7 1G10 2B4), DSM ACC3038 (18-2A-1), DSM ACC3040 (63-1A-2), o DSM ACC3042 (3E5 2G4).

Los anticuerpos de la enseñanza se designan en la presente descripción mediante la referencia a la designación del anticuerpo y/o mediante la referencia al clon que produce el anticuerpo, por ejemplo, 4E9-1H9.

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

Los anticuerpos de la enseñanza preferentemente median la destrucción de las células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular mediante la unión a GT468. Preferentemente GT468 se expresa en la superficie de dichas células. En una modalidad, los anticuerpos de la invención inducen una citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), por ejemplo al menos aproximadamente 20-40 % de lisis mediada por CDC, preferentemente aproximadamente 40-50 % de lisis mediada por CDC, y con mayor preferencia más de 50 % de lisis mediada por CDC en las células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular. Alternativamente o además de inducir CDC, los anticuerpos de la invención pueden inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) en las células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular en presencia de células efectoras (por ejemplo, monocitos, células mononucleares, células NK y PMN). Los anticuerpos de la enseñanza pueden tener la capacidad de inducir apoptosis de las células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular, inducir adhesión homotípica de las células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular y/o inducir fagocitosis de las células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular en presencia de macrófagos. Los anticuerpos de la invención pueden tener una o más de las propiedades funcionales descritas anteriormente. Preferentemente, los anticuerpos de la enseñanza inducen lisis mediada por CDC y lisis mediada por ADCC en las células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular y con mayor preferencia inducen lisis mediada por ADCC en las células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular a la vez que no inducen lisis mediada por CDC de dichas células. Las células objetivo ilustrativas para los anticuerpos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, células cancerosas que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular. En una modalidad particular preferida, la destrucción de células mediada por los anticuerpos de la invención es específica de GT468, es decir los anticuerpos de la invención median la destrucción, preferentemente la lisis mediada por CDC y/o ADCC, de las células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular pero no median la destrucción de las células que no expresan GT468 y/o que no se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular. Los anticuerpos descritos anteriormente pueden utilizarse para mediar la destrucción de células tumorales en el tratamiento o prevención de un cáncer tal como cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de ovario, cáncer hepatocelular, cáncer de colon, cáncer de páncreas, cáncer de esófago, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, en particular carcinoma de células renales, cáncer de próstata, cáncer de hígado, melanoma, sarcoma, mieloma, neuroblastoma, coriocarcinoma placentario, cáncer de cuello uterino y cáncer de tiroides, y las formas metastásicas de estos. En una modalidad, la enfermedad cancerosa es cáncer metastásico en el pulmón.

Los anticuerpos de la enseñanza pueden derivarse de diferentes especies, que incluyen, pero no se limitan a, ratón, rata, conejo, conejillo de indias y ser humano. Los anticuerpos de la enseñanza incluyen, además, moléculas quiméricas en las que una región constante del anticuerpo derivada de una especie, preferentemente humana, se combina con el sitio de unión al antígeno derivado de otra especie. Además, los anticuerpos de la enseñanza incluyen moléculas humanizadas en las que los sitios de unión al antígeno de un anticuerpo derivado de una especie no humana se combinan con las regiones constantes y un marco de origen humano.

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

Los anticuerpos de la presente enseñanza preferentemente se disocian del GT468 con una constante de equilibrio de disociación (KD) de aproximadamente 1-100 nM o menos. Preferentemente, los anticuerpos de la enseñanza no reaccionan de forma cruzada con antígenos de la superficie celular relacionados y, por lo tanto, no inhiben su función.

En modalidades preferidas, los anticuerpos de la presente enseñanza pueden caracterizarse por una o más de las siguientes propiedades:

- a) especificidad por GT468;
- b) una afinidad de unión a GT468 de aproximadamente 100 nM o menos, preferentemente, de aproximadamente 5-10 nM o menos y, con mayor preferencia, de aproximadamente 1-3 nM o menos,
- c) la capacidad de mediar un alto nivel de CDC en células negativas a CD55/59 o positivas a CD55/59;
- d) la capacidad de inhibir el crecimiento de células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular;
- e) la capacidad de inducir apoptosis de células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular;

- f) la capacidad de inducir adhesión homotípica de células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular;
- g) la capacidad de inducir ADCC de células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular en presencia de células efectoras;
- 5 h) la capacidad de prolongar la supervivencia de un sujeto que tiene células tumorales que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular;
- i) la capacidad de agotar las células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular;
- 10 j) la capacidad de agotar las células que expresan bajos niveles de GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular y/o
- k) la capacidad de agregar GT468 en la superficie de las células vivas.

Los anticuerpos anti-GT468 de la presente enseñanza pueden derivarse, enlazarse o coexpresarse con otras especificidades de unión. En una modalidad particular, la enseñanza proporciona una molécula biespecífica o multiespecífica que comprende al menos una primera especificidad de unión para GT468 (por ejemplo, un anticuerpo anti-GT468 o mimético de este), y una segunda especificidad de unión para una célula efectora, tal como una especificidad de unión para un receptor de Fc (por ejemplo, un receptor Fc gamma, tal como RI Fc gamma, o cualquier otro receptor de Fc) o un receptor de células T, por ejemplo, CD3.

En consecuencia, la presente enseñanza incluye moléculas biespecíficas y multiespecíficas que se unen tanto a GT468 como a un receptor de Fc o un receptor de células T, por ejemplo, CD3. Ejemplos de receptores de Fc son el receptor de IgG, el receptor de Fc gamma (FcγR), tal como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), y FcγRIII (CD16). Otros receptores de Fc, tal como los receptores de IgA (por ejemplo, FcαRI), pueden orientarse también. El receptor de Fc se localiza, preferentemente, en la superficie de una célula efectora, por ejemplo, un monocito, macrófago o una célula mononuclear activada. En una modalidad preferida, las moléculas biespecíficas y multiespecíficas se unen a un receptor de Fc en un sitio que es distinto al sitio del receptor para la unión al Fc de la inmunoglobulina (por ejemplo, IgG o IgA). Por lo tanto, la unión de las moléculas biespecíficas y multiespecíficas no se bloquea con los niveles fisiológicos de las inmunoglobulinas.

En aún otro aspecto, los anticuerpos anti-GT468 de la enseñanza se derivan, enlazan o coexpresan con otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, un fragmento Fab'). Por ejemplo, un anticuerpo de la enseñanza puede unirse funcionalmente (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de cualquier otra manera) a una u otras muchas entidades moleculares, tales como otro anticuerpo (por ejemplo, para producir un anticuerpo biespecífico o uno multiespecífico), una citotoxina, antígeno o ligando celular (por ejemplo, para producir un inmunoconjugado, tal como una inmunotoxina). Un anticuerpo de la presente enseñanza puede unirse a otros restos terapéuticos, por ejemplo, un radioisótopo, un fármaco anticancerígeno de molécula pequeña, una citocina o quimioterapia recombinante. En consecuencia, la presente enseñanza abarca una gran variedad de conjugados de anticuerpos, moléculas biespecíficas y multiespecíficas, y proteínas de fusión, las cuales se unen a las células que expresan GT468 y/o a las células que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular y que pueden usarse para dirigir otras moléculas a células de este tipo.

Generalmente, para los propósitos de la presente enseñanza, todos los derivados de anticuerpos tales como conjugados de anticuerpos, moléculas biespecíficas y multiespecíficas, y proteínas de fusión descritos en la presente descripción se incluyen en el término "anticuerpo".

En un aspecto adicional, la enseñanza prevé, además, proteínas que se unen a GT468 derivadas de dominios no inmunoglobulínicos, en particular, proteínas monocatenarias. Tales proteínas de unión y los métodos para su producción se describen, por ejemplo, en Binz y otros, (2005) Nature Biotechnology 23 (10): 1257-1268, que se incorpora en la presente descripción como referencia. Debe entenderse que las enseñanzas dadas en la presente descripción con respecto a las moléculas de unión de la inmunoglobulina o derivadas de la inmunoglobulina se aplican, además, en correspondencia con las moléculas de unión derivadas de dominios no inmunoglobulínicos. En particular, por medio del uso de tales moléculas de unión derivadas de dominios no inmunoglobulínicos es posible bloquear GT468 de las células que expresan dicho objetivo y/o que se caracterizan por la asociación de dicho objetivo con su superficie celular y así, producir efectos terapéuticos como se describe en la presente descripción por los anticuerpos de la enseñanza, en particular, la inhibición de una o más actividades de las células tumorales como se describe en la presente descripción tal como la proliferación.

Aunque no es obligatorio, es posible conferir funciones efectoras de anticuerpos a tales moléculas que no se unen a las inmunoglobulinas, por ejemplo, fusión a la región Fc de anticuerpos.

La presente enseñanza generalmente abarca el tratamiento y/o diagnóstico de enfermedades, en particular, enfermedades tumorales, mediante la orientación a GT468 expresado por las células y/o que se asocia con la superficie de las células. Estos métodos proporcionan la detección y/o erradicación selectivas de tales células minimizando de este modo, los efectos adversos para las células normales que no expresan GT468 y/o que no se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular. Las enfermedades preferidas para una terapia o diagnóstico son aquellas en las que están involucradas las células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie

celular, tales como las enfermedades tumorales, en particular, las enfermedades cancerosas tales como las descritas en la presente descripción.

5 En un aspecto, la enseñanza proporciona composiciones, por ejemplo, composiciones/estuches farmacéuticos y de diagnóstico, que comprenden un anticuerpo o una combinación de anticuerpos de la enseñanza. Una composición farmacéutica de la enseñanza puede comprender un portador farmacéuticamente aceptable y opcionalmente, puede comprender uno o más adyuvantes, estabilizantes, etcétera. En una modalidad particular, la composición incluye una combinación de anticuerpos que se unen a epítomos distintos o que poseen características funcionales distintas, tales como inducir CDC y/o ADCC e inducir apoptosis. En esta modalidad de la enseñanza, los anticuerpos pueden usarse en combinación, por ejemplo, como una composición farmacéutica que comprende dos o más anticuerpos monoclonales anti-GT468. Por ejemplo, los anticuerpos anti-GT468 que tienen actividades diferentes pero complementarias pueden combinarse en una única terapia para lograr un efecto terapéutico deseado. En una modalidad preferida, la composición incluye un anticuerpo anti-GT468 que media la CDC combinado con otro anticuerpo anti-GT468 que induce apoptosis. En otra modalidad, la composición incluye un anticuerpo anti-GT468 que media una destrucción altamente efectiva de células objetivo en presencia de células efectoras, combinado con otro anticuerpo anti-GT468 que inhibe el crecimiento de células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular.

20 La presente enseñanza incluye además la administración simultánea o secuencial de dos o más anticuerpos anti-GT468 de la enseñanza, en donde preferentemente al menos uno de dichos anticuerpos es un anticuerpo anti-GT468 quimérico y al menos otro anticuerpo es un anticuerpo anti-GT468 humano, donde los anticuerpos se unen a los mismos epítomos de GT468 o a epítomos diferentes. Preferentemente, un anticuerpo contra GT468 quimérico de la enseñanza se administra primero seguido por la administración de un anticuerpo anti-GT468 humano de la enseñanza, en donde el anticuerpo anti-GT468 humano se administra preferentemente durante un periodo de tiempo prolongado, es decir como terapia de mantenimiento.

25 Los anticuerpos, los conjugados, las moléculas biespecíficas/multiespecíficas y las composiciones de la presente enseñanza pueden usarse en una variedad de métodos para inhibir el crecimiento de células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular y/o para destruir selectivamente las células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular al poner en contacto las células con una cantidad efectiva del anticuerpo, conjugado, molécula biespecífica/multiespecífica o composición, de manera que se inhibe el crecimiento de la célula y/o se destruye la célula. En una modalidad, el método incluye la destrucción de la célula que expresa GT468 y/o que se caracteriza por la asociación de GT468 con su superficie celular, opcionalmente en presencia de células efectoras, por ejemplo, mediante CDC, apoptosis, ADCC, fagocitosis o mediante una combinación de dos o más de estos mecanismos. Las células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular, las cuales pueden inhibirse o destruirse mediante el uso de los anticuerpos de la enseñanza incluyen las células cancerosas.

40 Los anticuerpos, conjugados, y moléculas biespecíficas/multiespecíficas y composiciones de la presente enseñanza pueden usarse para tratar y/o prevenir una variedad de enfermedades que involucran células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular mediante la administración de los anticuerpos a pacientes que padecen de tales enfermedades. Las enfermedades ejemplares que pueden tratarse (por ejemplo, mejorarse) o prevenirse incluyen, pero no se limitan a, las enfermedades tumorigénicas. Los ejemplos de enfermedades tumorigénicas que pueden tratarse y/o prevenirse, incluyen enfermedades cancerosas tales como cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de ovario, cáncer hepatocelular, cáncer de colon, cáncer pancreático, cáncer de esófago, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, en particular, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, cáncer de hígado, melanoma, sarcoma, mieloma, neuroblastoma, coriocarcinoma placentario, cáncer de cuello uterino y cáncer de tiroides, y las formas metastásicas de estos. En una modalidad, la enfermedad cancerosa es cáncer metastásico en el pulmón.

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

60 En un aspecto adicional, la enseñanza se refiere a un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno que involucra células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular, que comprende administrar a un sujeto un anticuerpo, conjugado, molécula biespecífica/multiespecífica o composición de la enseñanza. Preferentemente, la enfermedad o trastorno es una enfermedad relacionada con un tumor y en modalidades particulares se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de ovario, cáncer hepatocelular, cáncer de colon, cáncer pancreático, cáncer de esófago, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, en particular, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, cáncer de hígado, melanoma, sarcoma, mieloma, neuroblastoma, coriocarcinoma placentario, cáncer de cuello uterino y cáncer de tiroides, y las formas metastásicas de estos. En una modalidad, la enfermedad cancerosa es cáncer metastásico en el pulmón. GT468 se expresa preferentemente en la superficie de dichas células.

5 La enseñanza puede implicar el uso de los agentes y composiciones descritos en la presente descripción para un tratamiento profiláctico y/o terapéutico de enfermedades tumorales, es decir, para tratar a un paciente que tiene una enfermedad tumoral o que está en riesgo de desarrollar una enfermedad tumoral. En un aspecto, la enseñanza proporciona métodos para inhibir el crecimiento tumoral, que comprenden la administración de uno o más de los agentes y composiciones descritos en la presente descripción.

10 Preferentemente, los agentes y composiciones descritos en la presente descripción se administran de manera que la sustancia terapéuticamente activa no se suministra o no se suministra sustancialmente a un tejido u órgano en el cual, cuando el tejido u órgano está libre de tumores, las células expresan sustancialmente GT468 y/o se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular, tal como el tejido placentario y/o el tejido testicular. Para este fin, los agentes y composiciones descritos en la presente descripción pueden administrarse localmente.

15 En un aspecto, la enseñanza proporciona un anticuerpo como se describe en la presente descripción para usar en los métodos de tratamiento descritos en la presente descripción. En una modalidad, la enseñanza proporciona una composición farmacéutica como se describe en la presente para usar en los métodos de tratamiento descritos en la presente descripción.

20 En una modalidad particular de la enseñanza, el sujeto al que se administra el anticuerpo puede tratarse adicionalmente con un agente quimioterapéutico, radiación o un agente que modula, por ejemplo, potencia o inhibe, la expresión o actividad de un receptor de Fc, por ejemplo, un receptor de Fc gamma, tal como una citocina. Las citocinas típicas para la administración durante el tratamiento incluyen el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), interferón- γ (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral (TNF). Los agentes terapéuticos típicos incluyen, entre otros, agentes antineoplásicos tales como doxorubicina, cisplatino, taxotere, 5-fluoruracilo, metotrexato, gemzitabina y ciclofosfamida.

30 En aún otro aspecto, la enseñanza se refiere a una estrategia de inmunización para inmunizar animales no humanos como ratones con GT468 humano o un fragmento peptídico de este para obtener anticuerpos. Los péptidos preferidos para la inmunización son los seleccionados del grupo que consiste en la sec. con núm. de ident.: 2-10 y 35-82, o derivados de estos. En consecuencia, en modalidades preferidas, los anticuerpos de la enseñanza son los obtenidos mediante inmunización con el uso de péptidos seleccionados del grupo que consiste en la sec. con núm. de ident.: 2-10 y 35-82, o derivados de estos. Análogamente, los anticuerpos contra GT468 pueden generarse en un animal no humano transgénico, tal como un ratón transgénico. El animal no humano transgénico puede ser un ratón transgénico que tenga un genoma que comprenda un transgén de cadena pesada y un transgén de cadena ligera que codifica todos o una parte de un anticuerpo.

40 Los animales no humanos de tipo silvestre así como los transgénicos pueden inmunizarse con una preparación purificada o enriquecida de antígeno GT468 y/o ácidos nucleicos y/o células que expresan GT468 o un fragmento peptídico de este. Preferentemente, el animal no humano es capaz de producir múltiples isotipos de anticuerpos monoclonales humanos contra GT468 (por ejemplo, IgG, IgA y/o IgM) mediante la recombinación V-D-J y el cambio de isotipo. El cambio de isotipo puede producirse, por ejemplo, mediante el cambio de isotipo clásico o no clásico.

45 En consecuencia, aún en otro aspecto, la enseñanza proporciona células B aisladas de un animal no humano como se describió anteriormente. Las células B aisladas pueden immortalizarse después por fusión a una célula immortalizada para proporcionar una fuente (por ejemplo, un hibridoma) de anticuerpos de la enseñanza. Tales hibridomas (es decir, que producen anticuerpos de la enseñanza) también se incluyen dentro del alcance de la enseñanza.

50 En otro aspecto, la presente enseñanza se refiere a métodos para el diagnóstico, la detección o el seguimiento de una enfermedad tumoral que comprende la detección y/o la determinación de la cantidad de GT468 o células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular en una muestra biológica aislada de un paciente mediante el uso de un anticuerpo de la enseñanza. La muestra biológica puede aislarse de un paciente que tiene una enfermedad tumoral, que se sospecha que tiene o se enferma con una enfermedad tumoral o que tiene una predisposición potencial para una enfermedad tumoral.

55 En una modalidad del método para el diagnóstico, la detección o el seguimiento de una enfermedad tumoral de acuerdo con la enseñanza, una muestra biológica y/o una muestra de control/referencia es de un tejido u órgano correspondiente al tejido u órgano que se debe diagnosticar, detectar o dar seguimiento con respecto a la afección por una enfermedad tumoral, por ejemplo, la enfermedad tumoral que se debe diagnosticar, detectar o dar seguimiento es cáncer de mama y la muestra biológica y/o la muestra de control/referencia es tejido mamario. Tales tejidos y órganos se describen en la presente descripción, por ejemplo, en relación con diferentes enfermedades tumorales y cánceres.

60 En una modalidad de los métodos para el diagnóstico, la detección o el seguimiento de una enfermedad tumoral, la muestra biológica es de un tejido u órgano en donde las células, cuando el tejido u órgano está libre de tumores, no expresan sustancialmente GT468 y/o no se caracterizan por una asociación sustancial de GT468 con su superficie celular. Preferentemente, dicho tejido es un tejido diferente al tejido placentario o al tejido testicular.

5 Típicamente, el nivel de una molécula objetivo en una muestra biológica se compara con un nivel de referencia, en donde una desviación de dicho nivel de referencia es indicativa de la presencia y/o etapa de una enfermedad tumoral en un sujeto. El nivel de referencia puede ser un nivel determinado en una muestra de control (por ejemplo, de un tejido o sujeto sano) o un nivel mediano de sujetos sanos. Una "desviación" de dicho nivel de referencia designa cualquier cambio significativo, tal como un aumento o disminución en al menos 10 %, 20 % o 30 %, preferentemente en al menos 40 % o 50 %, o incluso más. Preferentemente, la presencia de GT468 o de células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular en dicha muestra biológica o una cantidad de GT468 o células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular en la muestra biológica que aumenta en comparación con un nivel de referencia indica la presencia de una enfermedad tumoral.

10 Típicamente, la detección y/o determinación de la cantidad en los métodos de la enseñanza implica el uso de anticuerpos marcados que se unen específicamente a una molécula objetivo.

15 En un aspecto particular, la enseñanza se refiere a un método para la detección, es decir, determinar la posición o el sitio, de una enfermedad tumoral, por ejemplo, un tejido u órgano particular, que comprende administrar un anticuerpo de la presente enseñanza que se acopla a un marcador detectable en un paciente. El marcaje de un tejido u órgano en dicho paciente puede indicar la presencia o el riesgo de una enfermedad tumoral en dicho tejido u órgano.

20 Como se ejemplifica en la presente descripción, los anticuerpos de la enseñanza pueden obtenerse directamente de hibridomas que expresan el anticuerpo, o pueden clonarse y expresarse por vía recombinante en una célula huésped (por ejemplo, una célula CHO o una célula linfocítica). Otros ejemplos de células huésped son los microorganismos, tales como E. coli, y los hongos, tales como levadura. Alternativamente, pueden producirse por vía recombinante en un animal o planta transgénica no humana. Sin embargo, la presente enseñanza prevé, además, las modalidades en donde los anticuerpos se producen mediante inmunización o vacunación por medio del uso de estrategias de inmunización in situ en un paciente como se describe en la presente descripción.

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

- 30 1. 4E9-1H9, núm. de acceso DSM ACC2822, depositadas el 13 de marzo de 2007
 2. 9B6-2A9, núm. de acceso DSM ACC2826, depositadas el 13 de marzo de 2007
 3. 59D6-2F2, núm. de acceso DSM ACC2824, depositadas el 13 de marzo de 2007
 4. 61C11-2B5, núm. de acceso DSM ACC2825, depositadas el 13 de marzo de 2007
 5. 78H11-1H6, núm. de acceso DSM ACC2823, depositadas el 13 de marzo de 2007
 35 6. 22-1A-1, núm. de acceso DSM ACC2895, depositadas el 11 de marzo de 2008
 7. 22-2A-1, núm. de acceso DSM ACC2893, depositadas el 11 de marzo de 2008
 8. 22-9B-1, núm. de acceso DSM ACC2896, depositadas el 11 de marzo de 2008
 9. 23-33A-1, núm. de acceso DSM ACC2897, depositadas el 11 de marzo de 2008
 10. 23-19A-1, núm. de acceso DSM ACC2891, depositadas el 11 de marzo de 2008
 40 11. F11#33F7D12, núm. de acceso DSM ACC2894, depositadas el 11 de marzo de 2008
 12. 4A12 2D4 1A10, núm. de acceso DSM ACC2892, depositadas el 11 de marzo de 2008
 13. 4E9 1D12 2D4, núm. de acceso DSM ACC2898, depositadas el 11 de marzo de 2008
 14. 42H11 1C11 2B2, núm. de acceso DSM ACC2961, depositadas el 1 de septiembre de 2008
 15. 51G6 2H3 2B4, núm. de acceso DSM ACC2962, depositadas el 1 de septiembre de 2008
 45 16. 16-5B-1, núm. de acceso DSM ACC2943, depositadas el 1 de septiembre de 2008
 17. 20-11A-1, núm. de acceso DSM ACC2956, depositadas el 1 de septiembre de 2008
 18. 29-1A-2, núm. de acceso DSM ACC2947, depositadas el 1 de septiembre de 2008
 19. 29-8B-1, núm. de acceso DSM ACC2964, depositadas el 2 de septiembre de 2008
 20. 35-48B-1, núm. de acceso DSM ACC2959, depositadas el 1 de septiembre de 2008
 50 21. 35-50A-2a, núm. de acceso DSM ACC2963, depositadas el 1 de septiembre de 2008
 22. 38-10B-1, núm. de acceso DSM ACC2957, depositadas el 1 de septiembre de 2008
 23. 38-1A-1, núm. de acceso DSM ACC2958, depositadas el 1 de septiembre de 2008
 24. 44-3A-2, núm. de acceso DSM ACC2948, depositadas el 1 de septiembre de 2008
 25. 45-2A-1, núm. de acceso DSM ACC2949, depositadas el 1 de septiembre de 2008
 55 26. 45-8A-2, núm. de acceso DSM ACC2950, depositadas el 1 de septiembre de 2008
 27. 48-3B-1, núm. de acceso DSM ACC2951, depositadas el 1 de septiembre de 2008
 28. 48-4A-1, núm. de acceso DSM ACC2952, depositadas el 1 de septiembre de 2008
 29. 49-3A-1, núm. de acceso DSM ACC2946, depositadas el 1 de septiembre de 2008
 30. 49-8A-1, núm. de acceso DSM ACC2945, depositadas el 1 de septiembre de 2008
 60 31. 51-1A-1, núm. de acceso DSM ACC2944, depositadas el 1 de septiembre de 2008
 32. 53-13A-2, núm. de acceso DSM ACC2953, depositadas el 1 de septiembre de 2008
 33. 53-29A-1, núm. de acceso DSM ACC2955, depositadas el 1 de septiembre de 2008
 34. 54-4B-2, núm. de acceso DSM ACC2960, depositadas el 1 de septiembre de 2008
 35. 56-4A-2, núm. de acceso DSM ACC2954, depositadas el 1 de septiembre de 2008
 65 36. 62-9B-1, núm. de acceso DSM ACC3001, depositadas el 16 de julio de 2009
 37. 4A5 1E11 1B7, núm. de acceso DSM ACC3039, depositadas el 18 de febrero de 2010

38. 7H12 2E6 2C4, núm. de acceso DSM ACC3037, depositadas el 18 de febrero de 2010
 39. 11D7 1G10 2B4, núm. de acceso DSM ACC3036, depositadas el 18 de febrero de 2010
 40. 18-2A-1, núm. de acceso DSM ACC3038, depositadas el 18 de febrero de 2010
 41. 63-1A-2, núm. de acceso DSM ACC3040, depositadas el 18 de febrero de 2010
 5 42. 3E5 2G4, núm. de acceso DSM ACC3042, depositadas el 3 de marzo de 2010

Los anticuerpos preferidos de la enseñanza son los producidos y los que pueden obtenerse a partir de los hibridomas descritos anteriormente y las formas quimerizadas y humanizadas de estos. Otros anticuerpos preferidos de la enseñanza son los que tienen la especificidad de los anticuerpos producidos y los que pueden obtenerse a partir de los hibridomas descritos anteriormente y, en particular, los que comprenden la porción de unión al antígeno o el sitio de unión al antígeno, en particular, la región variable, de los anticuerpos producidos y los que pueden obtenerse a partir de los hibridomas descritos anteriormente.

En modalidades preferidas, los anticuerpos, en particular las formas quimerizadas de los anticuerpos de acuerdo con la enseñanza incluyen anticuerpos que comprenden una región constante de cadena pesada (CH) que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de una región constante de cadena pesada humana tal como la secuencia de aminoácidos representada por la sec. con núm. de ident.: 17 o 24 o un fragmento de estas. En otras modalidades preferidas, los anticuerpos, en particular las formas quimerizadas de los anticuerpos de acuerdo con la enseñanza incluyen anticuerpos que comprenden una región constante de cadena ligera (CL) que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de una región constante de cadena ligera humana tal como la secuencia de aminoácidos representada por la sec. con núm. de ident.: 18 o 22 o un fragmento de estas. En una modalidad particular preferida, los anticuerpos, en particular las formas quimerizadas de los anticuerpos de acuerdo con la enseñanza incluyen anticuerpos que comprenden una CH que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de una CH humana tal como la secuencia de aminoácidos representada por la sec. con núm. de ident.: 17 o 24 o un fragmento de estas y que comprenden una CL que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de una CL humana tal como la secuencia de aminoácidos representada por la sec. con núm. de ident.: 18 o 22 o un fragmento de estas.

Una CH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la sec. con núm. de ident.: 17 puede estar codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por la sec. con núm. de ident.: 20. Una CH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la sec. con núm. de ident.: 24 puede estar codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por la sec. con núm. de ident.: 23. Una CL que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la sec. con núm. de ident.: 18 puede estar codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por la sec. con núm. de ident.: 19. Una CL que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la sec. con núm. de ident.: 22 puede estar codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por la sec. con núm. de ident.: 21.

"Fragmento" o "fragmento de una secuencia de aminoácidos" como se usó anteriormente se refiere a una parte de una secuencia del anticuerpo, es decir una secuencia que representa la secuencia del anticuerpo acortada en el extremo N-y/o C-terminal, que cuando reemplaza dicha secuencia de anticuerpo en un anticuerpo conserva la unión de dicho anticuerpo a GT468 y preferentemente las funciones de dicho anticuerpo como se describe en la presente, por ejemplo la lisis mediada por CDC o la lisis mediada por ADCC. Preferentemente, un fragmento de una secuencia de aminoácidos comprende al menos 80 %, preferentemente al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de los residuos de aminoácidos de dicha secuencia de aminoácidos. Los fragmentos de secuencias de aminoácidos descritos en la presente pueden estar codificados por fragmentos respectivos de secuencias de ácido nucleico que codifican dichas secuencias de aminoácidos.

La presente enseñanza se refiere, además, a los ácidos nucleicos que comprenden los genes o las secuencias de los ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o sus partes, por ejemplo, una cadena de anticuerpo, como se describe en la presente descripción. Los ácidos nucleicos pueden comprenderse en un vector, por ejemplo, un plásmido, cósmido, virus, bacteriófago u otro vector usado, por ejemplo, convencionalmente en ingeniería genética. El vector puede comprender otros genes tales como genes marcadores que permiten la selección del vector en una célula huésped adecuada y en condiciones adecuadas. Además, los vectores pueden comprender elementos de control de la expresión que permiten la expresión adecuada de las regiones codificantes en los huéspedes adecuados. Tales elementos de control se conocen por el técnico y pueden incluir un promotor, un casete de empalme y un codón de iniciación de la traducción.

Preferentemente, el ácido nucleico de la enseñanza está unido operativamente a las secuencias control de la expresión anteriores permitiendo la expresión en células eucariotas y procariotas. Los elementos de control que aseguran la expresión en las células eucariotas y procariotas se conocen bien por aquellos con experiencia en la materia.

Los métodos para la construcción de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente enseñanza, para la construcción de vectores que comprenden las moléculas de ácido nucleico anteriores, para la introducción de los vectores en células huésped seleccionadas apropiadamente, para provocar o lograr la expresión se conocen bien en la materia.

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

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

5 Breve descripción de los dibujos

Figura 1. GT468 es un marcador del linaje trofoblástico activado de manera aberrante en células cancerosas. (A) Criterio de valoración ciclo 35 de la RT-PCR en tejidos normales, muestras de cáncer de mama primario y líneas de células cancerosas (1, MCF-7; 2, MDA-MB-435S; 3, BT-549; 4, MDA-MB-231; 5, SNU-16; 6, LCLC-103H; 7, KYSE-510; 8, KYSE-30; 9, EFO-27; 10, TOV-21G; 11, TOV-112D; 12, CAO-V-3; 13, EFO-21; 14, FU-OV-1; 15, LNCAP; 16, CAPAN-2). (B) RT-PCR cuantitativa en tiempo real ciclo 40 en tejidos normales (1, testículos; 2, placenta; 3, cerebro; 4, pulmón; 5, mama; 6, colon; 7, hígado; 8, estómago; 9, riñón; 10, próstata; 11, páncreas; 12, ovario; 13, bazo; 14, piel; 15, miocardio; 16, endometrio; 17, PBMC en rep.; 18, PBMC en prolif.; 19, glándula adrenal), muestras de cáncer de mama primario y (C) líneas de células cancerosas. (D) Análisis de RT-PCR cuantitativa en tiempo real del silenciamiento de GT468 mediado por siRNA en células de cáncer de mama MCF-7 y BT-549. (E) Análisis por transferencia Western de la disminución de la expresión de proteínas GT468 mediada por siRNA. Las células control no se trataron o se transfectaron con un dúplex desordenado que no produce silenciamiento (ns-siRNA). (F) Análisis por transferencia Western de los niveles de proteínas GT468 en tejidos humanos normales y neoplásicos. (G) Inmunohistoquímica de secciones derivadas de tejido mamario humano normal (izquierdo) y cáncer de mama (derecho) mediante el uso de un anticuerpo específico para GT468.

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

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

Figura 4. La expresión de GT468 promueve la proliferación de células de cáncer de mama. (A) Análisis de la proliferación en células MCF-7 y BT-549 72 horas después de iniciar la disminución mediante dúplex de siRNA específicos para GT468. (B) Análisis del ciclo celular de las células 72 horas después de iniciar el silenciamiento de GT468, mostrado como gráfico de barras de las fracciones celulares en diferentes estados del ciclo celular. (C) Apoptosis de células según se determina por la tinción con anexina V 72 horas después de la transfección con siRNA. Como control positivo para la tinción con anexina V las células se trataron con camptotecina 6 μ M durante 12 horas.

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

Figura 6. La ciclina D1 y la AKT quinasa están implicadas en la función de GT468. (A) Análisis de RT-PCR cuantitativa en tiempo real y (B) análisis por transferencia Western de la ciclina D1 después que las células se trataron durante 72 horas con dúplex de siRNA específicos para GT468. Análisis por transferencia Western de la fosforilación de Ser473 de la AKT después de (C) 72 horas de la disminución de GT468 y después de (D) 1 hora de tratamiento con un anticuerpo anti-GT468/C-terminal.

Figura 7. ELISA de péptidos para determinar la especificidad de los anticuerpos producidos contra GT468 en los sobrenadantes de hibridomas. Los sobrenadantes de hibridomas solo son reactivos con los péptidos usados para la inmunización.

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

Figura 9. GT468 es susceptible de ser modulado por anticuerpos monoclonales que antagonizan su función. Análisis de proliferación de diferentes líneas de células cancerosas después de la incubación con sobrenadantes de hibridomas durante 72 horas.

Figura 10. ELISA con lisado crudo (CrELISA) (A) o específico para un péptido (B) para determinar la especificidad de los anticuerpos producidos contra GT468 en los sobrenadantes de hibridomas. Los sobrenadantes de hibridomas solo son reactivos con el lisado de GT468 (A) o el péptido respectivo usado para la inmunización (B).

Figura 11. Análisis de citometría de flujo para determinar la especificidad de los anticuerpos producidos contra GT468 en los sobrenadantes de hibridomas. Todos los sobrenadantes de hibridomas mostraron una tinción específica de las células transfectadas con GT468, mientras que no se observó tinción en las células con transfección simulada.

5 Figura 12. Transferencia Western para determinar la especificidad de anticuerpos producidos contra GT468 en los sobrenadantes de hibridomas. Todos los sobrenadantes de hibridomas mostraron una reactividad específica con los lisados de células HEK293 transfectadas con un plásmido de expresión pcDNA3.1 para GT468, mientras que los lisados de células con transfección simulada no mostraron señal. La leve señal del sobrenadante de hibridoma 23-33A-1 en el
10 lisado con simulación se debe al derrame del lisado de HEK GT468.

Figura 13. ELISA de péptidos para identificar epítomos de unión a anticuerpos en la proteína GT468. Cada uno de los sobrenadantes de los hibridomas 22-1A-1, 23-33A-1 y 23-19A-1 mostró unión a dos péptidos superpuestos, lo que implica reactividad contra un epítomo lineal de GT468. Los patrones de unión de 22-2A-1 y 22-9B-1 implican reactividad contra un epítomo conformacional (epítomo discontinuo) de la proteína GT468.

15 Figura 14. GT468 es susceptible de ser modulado por anticuerpos monoclonales que antagonizan su función. Análisis de proliferación de diferentes líneas de células cancerosas después de la incubación con sobrenadantes de hibridomas purificados durante 72 horas o 120 horas.

20 Figura 15. Análisis de citometría de flujo para determinar la especificidad de los anticuerpos producidos contra GT468 en los sobrenadantes de hibridomas. Los sobrenadantes de hibridomas mostraron tinción específica de células transfectadas con GT468aa116-212, mientras que no se observó tinción en las células con transfección simulada.

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

30 Figura 17. Transferencia Western para determinar la especificidad de anticuerpos producidos contra GT468 en los sobrenadantes de hibridomas. Todos los sobrenadantes de hibridomas mostraron reactividad específica con los lisados de células HEK293 transfectadas con un plásmido de expresión de GT468, mientras que los lisados de células con transfección simulada no mostraron señal.

35 Figura 18. GT468 es susceptible de ser modulado por anticuerpos monoclonales que antagonizan su función. Análisis de proliferación de diferentes líneas de células cancerosas después de la incubación con sobrenadantes de hibridomas purificados durante 72 horas.

Figura 19. Ensayo clonogénico para analizar la actividad inhibitoria de anticuerpos monoclonales contra GT468 sobre la formación de colonias de células SK-BR-3 que expresan endógenamente GT468. La incubación de las células con anticuerpo redujo o inhibió la formación de colonias.

40 Figura 20A, B. Cuantificación de la expresión de GT468 en tejidos normales mediante el uso de RT-PCR en tiempo real. Los tejidos de tres individuos se analizaron para cada tipo de tejido normal. Solo pudieron detectarse cantidades traza de transcritos de GT468 en tejidos normales después de 40 ciclos de RT-PCR. El único tejido normal que excedió el valor umbral de expresión (línea discontinua, expresión media de todos los tejidos normales + 3 STD (percentil 99 %)) fue la placenta y los testículos. Barras de error, STD. Además del cáncer de mama (ver la figura 1), se encontró alta expresión de GT468 en muestras de cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de células renales, cáncer hepático, sarcoma, cáncer de tiroides y cáncer de cabeza y cuello.

50 Figura 21. Análisis por transferencia Western de la expresión de GT468 en líneas de células cancerosas. Se detectó expresión de GT468 en las células HEK293 transfectadas con el plásmido de expresión de GT468 (control positivo), SK-BR-3 (cáncer de mama), BEWO (coriocarcinoma placentario), JAR (coriocarcinoma placentario), HCT-15 (cáncer de colon), LnCaP (cáncer de próstata), HeLa (cáncer de cuello uterino), MDA-MB-468 (cáncer de mama), JEG-3 (coriocarcinoma placentario), JIMT-1 (cáncer de mama), LA1-55n (neuroblastoma), PC-3 (cáncer de próstata), BT-20 (cáncer de mama), y NCI-H929 (mieloma). El análisis de MelHO (melanoma maligno) y NUGC4 (cáncer gástrico) fue negativo.

60 Figura 22. GT468 es susceptible de ser modulado por anticuerpos monoclonales que antagonizan su función. Análisis de la proliferación de células de cáncer de mama MDA-MB-468 positivas para GT468 y células cancerosas gástricas NUGC4 negativas para GT468 después de la incubación con sobrenadantes de hibridomas purificados durante 72 horas.

Figura 23. Transferencia Western para determinar la especificidad de anticuerpos producidos contra GT468 en los sobrenadantes de hibridomas. Los sobrenadantes de hibridomas mostraron reactividad específica con los lisados de células HEK293 transfectadas con un plásmido de expresión de GT468, mientras que los lisados de células con transfección simulada no mostraron señal.

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

5 Figura 25. ELISA de péptidos para identificar epítomos de unión a anticuerpos en la proteína GT468. Cada uno de los sobrenadantes de hibridomas 29-8B-1, 35-48B-1, 44-3A-2, 49-3A-1, 49-8A-1, 51-1A-1, 53-13A-2, 62-9B1, 3E5 2G4, 4A5 1E11 1B7, 7H12 2E6 2C4, 11D7 1G10 2B4, 18-2A-1 y 63-1A2 mostró unión a uno o más péptidos superpuestos lo que implica reactividad contra un epítomo lineal de GT468. Los patrones de unión de 29-1A-2 y 54-4B-2 implican reactividad contra un epítomo conformacional (epítomo discontinuo) de la proteína GT468.

10 Figura 26A, B. El tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-GT468 afecta significativamente la dispersión metastásica de las células de cáncer de mama MCF-7 en ensayos de metástasis experimentales. Después de la inyección de 1×10^6 células MCF-7 por vía i.v. los animales se trataron con anticuerpos monoclonales purificados (200 µg) dos veces a la semana. La carga de tumores metastásicos en los pulmones de animales se determinó 5 semanas después de la inoculación mediante PCR cuantitativa con el uso de oligonucleótidos específicos para ADN microsatélite humano.

15 Figura 27. GT468 es susceptible de ser modulado por anticuerpos monoclonales que antagonizan su función. Análisis de la proliferación de células de cáncer de mama MCF-7 positivas para GT468 después de la incubación con anticuerpos monoclonales purificados durante 72 horas según se indica.

20 Definición de términos

Para que la presente enseñanza pueda comprenderse más fácilmente, primero se definen ciertos términos. Otras definiciones se muestran a lo largo de la descripción detallada.

25 El término "GT468" se refiere, preferentemente, a GT468 humano, y, en particular, a (i) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 2 tal como un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico de la sec. con núm. de ident.: 1 o (ii) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 2, e incluye cualquiera de las variantes de dichas secuencias, en particular mutantes, variantes de empalme, conformaciones, isoformas, variantes alélicas, variantes de especies y homólogos de especies, en particular las que se presentan de manera natural. Una variante alélica se refiere a una alteración en la secuencia normal de un gen, cuya relevancia frecuentemente no está clara. La secuenciación génica completa identifica frecuentemente numerosas variantes alélicas para un gen determinado. Un homólogo de especies es una secuencia de ácido nucleico o aminoácido con una especie de origen diferente de la de un ácido nucleico o secuencia de aminoácidos dada. El término "GT468" abarcará (i) variantes de empalme de GT468, (ii) variantes modificadas postraduccionalmente de GT468, que incluyen particularmente variantes con diferente glicosilación tal como el estado de N-glicosilación, (iii) variantes de conformación de GT468, (iv) variantes relacionadas con un cáncer que expresa GT468 y no relacionadas con un cáncer que expresa GT468.

30 En una modalidad, el término "GT468" se refiere a la porción de GT468 correspondiente al dominio extracelular o ectodominio y preferentemente se refiere a la secuencia de aminoácidos de GT468 que no incluye el dominio hidrofóbico N-terminal. El término "GT468" incluye una proteína que comprende los aminoácidos 29 a 119, preferentemente los aminoácidos 29 a 212 y con mayor preferencia los aminoácidos 23 a 212 de la sec. con núm. de ident.: 2 o los aminoácidos correspondientes de una variante de la sec. con núm. de ident.: 2.

35 De acuerdo con la enseñanza, los términos "dominio extracelular" o "ectodominio" con respecto a GT468 se relacionan con la porción de GT468 que está en asociación con la superficie de células que expresan GT468. Preferentemente, dicho "dominio extracelular" o "ectodominio" está presente en el compartimento extracelular. El "dominio extracelular" o "ectodominio" de GT468 preferentemente se refiere a la porción de GT468 de longitud completa que carece del dominio hidrofóbico N-terminal. De acuerdo con la enseñanza, el término "dominio hidrofóbico" con respecto a GT468 se refiere a la porción de GT468 que no es parte del dominio extracelular y preferentemente que incluye una secuencia hidrofóbica ubicada cerca del extremo N-terminal de GT468. El "dominio hidrofóbico" de GT468 puede incluir una secuencia que precede la secuencia hidrofóbica y que se ubica en el extremo N-terminal de GT468. Con respecto a la sec. con núm. de ident.: 2, el dominio hidrofóbico N-terminal preferentemente comprende los aminoácidos 1 a 22. Se entenderá que cualquiera de los dominios o secuencias hidrofóbicas identificados para los polipéptidos de GT468 de la presente enseñanza se identifican en virtud de criterios empleados habitualmente en la técnica para identificar dominios o secuencias hidrofóbicas. Los límites exactos de un dominio hidrofóbico pueden variar pero lo más probable es que no sea en más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquier extremo del dominio como se identificó inicialmente en la presente. Opcionalmente, por lo tanto, un dominio extracelular de un polipéptido de GT468 puede contener aproximadamente 5 o menos aminoácidos en cada lado del límite del dominio hidrofóbico/dominio extracelular como se identifica en la presente.

40 "Superficie celular" se usa de acuerdo con su significado normal en la materia, y por lo tanto, incluye la parte exterior de la célula que está accesible para la unión a proteínas y otras moléculas.

65

La expresión "GT468 expresado en la superficie de las células" significa que el GT468 expresado por las células está en asociación con la superficie de dichas células.

5 GT468 se asocia con la superficie de las células si se localiza en la superficie de dichas células y está accesible para unirse con anticuerpos específicos para GT468 añadidos a las células. En modalidades preferidas, una célula que se caracteriza por la asociación de GT468 con su superficie celular es una célula que expresa GT468. Debe entenderse que en el caso donde GT468 es expresado por las células, el GT468 asociado con la superficie de dichas células puede ser solo una porción del GT468 expresado, en particular el dominio extracelular de este como se definió anteriormente.

10 De acuerdo con la enseñanza, el GT468 no se expresa sustancialmente en una célula y/o no se asocia sustancialmente con una superficie celular si el nivel de expresión y/o asociación es menor en comparación con la expresión y/o asociación en las células de la placenta o el tejido placentario. Preferentemente, el nivel de expresión y/o asociación es inferior al 10 %, preferentemente, inferior al 5 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 %, 0,1 % o 0,05 % de la expresión y/o asociación en las células de la placenta o tejido placentario o incluso inferior. Preferentemente, GT468 no se expresa sustancialmente en una célula y/o no se asocia sustancialmente con una superficie celular si el nivel de expresión y/o asociación excede el nivel de expresión y/o asociación en el tejido no tumorigénico, no cancerígeno de uno o más de cerebro, pulmón, mama, colon, hígado, estómago, riñón, próstata, páncreas, ovario, bazo, piel, miocardio y endometrio en no más de 2 veces, preferentemente, 1,5 veces, y preferentemente, no excede el nivel de expresión y/o asociación en dicho(s) tejido(s) no tumorigénico(s), no canceroso(s). Preferentemente, GT468 no se expresa sustancialmente en una célula y/o no se asocia sustancialmente con una superficie celular si el nivel de expresión o asociación está por debajo del límite de detección y/o si el nivel de expresión o asociación es demasiado bajo para permitir la unión con los anticuerpos específicos para GT468 añadidos a las células.

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

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

40 De acuerdo con la enseñanza, el término "enfermedad" se refiere a cualquier estado patológico, que incluye el cáncer, en particular, las formas de cáncer descritas en la presente descripción.

45 "Enfermedades asociadas con células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular" significa de acuerdo con la enseñanza que la expresión y/o asociación en células de un tejido u órgano patológico está aumentada, preferentemente, en comparación con el estado en un tejido u órgano sano. Un aumento se refiere a un aumento de al menos 10 %, en particular al menos 20 %, al menos 50 %, al menos 100 %, al menos 200 %, al menos 500 %, al menos 1000 %, al menos 10000 % o aún más. En una modalidad, la expresión y/o asociación con la superficie celular solo se encuentra en un tejido patológico, mientras que en un tejido sano la expresión se reprime. De acuerdo con la enseñanza, las enfermedades asociadas con células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular incluyen enfermedades tumorales tales como enfermedades cancerosas. Además, de acuerdo con la enseñanza, las enfermedades tumorales tales como las enfermedades cancerosas son, preferentemente, aquellas en donde las células tumorales o cancerosas expresan GT468 y/o se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular.

55 Como se usa en la presente descripción, una "enfermedad tumoral", "enfermedad relacionada con tumores" o "enfermedad tumorigénica" incluye una enfermedad caracterizada por crecimiento celular, proliferación, diferenciación, adhesión y/o migración regulados aberrantemente, que puede dar como resultado la producción de o tendencia a producir tumores y/o metástasis tumorales. Por "célula tumoral" se entiende una célula anormal que crece mediante una proliferación celular rápida y descontrolada y continúa creciendo después de que cesa el estímulo que inició el nuevo crecimiento.

60 Por "tumor" se entiende un grupo anormal de células o un tejido que crece mediante una proliferación celular rápida y descontrolada y continúa creciendo después de que cesa el estímulo que inició el nuevo crecimiento. Los tumores muestran una pérdida parcial o completa de organización estructural y coordinación funcional con el tejido normal, y generalmente forman una masa distinta de tejido, que puede ser ya sea benigna, premaligna o maligna.

5 Preferentemente, una "enfermedad tumoral", "enfermedad relacionada con tumor" o "enfermedad tumorigénica" de acuerdo con la enseñanza es una enfermedad cancerosa, es decir, una enfermedad maligna y una célula tumoral es una célula cancerosa. Preferentemente, una "enfermedad tumoral", "enfermedad relacionada con tumor" o "enfermedad tumorigénica" se caracteriza por células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular y una célula tumoral expresa GT468 y/o se caracteriza por la asociación de GT468 con su superficie celular.

10 Una célula que expresa GT468 y/o que se caracteriza por la asociación de GT468 con su superficie celular es, preferentemente, una célula tumoral o célula cancerosa, preferentemente, de los tumores y cánceres descritos en la presente descripción. Preferentemente, dicha célula es una célula diferente de una célula placentaria y/o una célula de testículo.

15 Las enfermedades cancerosas o cánceres que se prefieren de acuerdo con la enseñanza se seleccionan del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de ovario, cáncer hepatocelular, cáncer de colon, cáncer pancreático, cáncer de esófago, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, en particular, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, cáncer de hígado, melanoma, sarcoma, mieloma, neuroblastoma, coriocarcinoma placentario, cáncer de cuello uterino y cáncer de tiroides, y las formas metastásicas de estos. En una modalidad, la enfermedad cancerosa se selecciona del grupo que consiste en cáncer metastásico en el pulmón.

20 De acuerdo con la enseñanza, un "carcinoma" es un cáncer que comienza en la capa de revestimiento (células epiteliales) de los órganos.

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

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

30 El carcinoma de células renales conocido, además, como cáncer de células renales o adenocarcinoma de células renales es un cáncer de riñón que se origina en el revestimiento del túbulo contorneado proximal, los tubos muy pequeños en el riñón que filtran la sangre y eliminan los productos de desecho. El carcinoma de células renales es, considerablemente, el tipo más común de cáncer renal en adultos y el más letal de todos los tumores genitourinarios. Los distintos subtipos de carcinoma de células renales son el carcinoma de células renales de células claras y el carcinoma de células renales papilares. El carcinoma de células renales de células claras es la forma más común del carcinoma de células renales. Cuando se observan bajo un microscopio, las células que componen el carcinoma de células renales de células claras aparecen muy pálidas o claras. El carcinoma de células renales papilares es el segundo subtipo más común. Estos cánceres forman pequeñas proyecciones en forma de dedos (denominadas papilas) en algunos, si no en la mayoría, de los tumores.

40 Por "metástasis" se entiende la propagación de las células cancerosas desde su sitio original a otra parte del cuerpo. La formación de metástasis es un proceso muy complejo y depende del desprendimiento de células malignas del tumor primario, invasión de la matriz extracelular, penetración de las membranas basales del endotelio para penetrar en la cavidad y en los vasos del cuerpo, y después, tras haber sido transportadas por la sangre, el infiltración en los órganos objetivo. Finalmente, el crecimiento de un nuevo tumor en el lugar objetivo depende de la angiogénesis. Frecuentemente, la metástasis del tumor ocurre incluso después de la remoción del tumor primario ya que las células o componentes tumorales pueden permanecer y desarrollar un potencial metastásico. En una modalidad, el término "metástasis" de acuerdo con la descripción se refiere a "metástasis distante" que se relaciona con una metástasis que se halla remota del tumor primario y del sistema de nódulos linfáticos regional.

50 Las células de un tumor secundario o metastásico son como las del tumor original. Esto significa, por ejemplo, que si el cáncer de ovario hace metástasis en el hígado, el tumor secundario se forma por células ováricas anormales, no por células hepáticas anormales. El tumor en el hígado se denomina después cáncer de ovario metastásico, no cáncer de hígado.

55 En una modalidad, un cáncer de acuerdo con la enseñanza es cáncer metastásico de mama, preferentemente cáncer metastásico de mama en el pulmón.

60 El término "tratamiento de una enfermedad" incluye curar, acortar la duración, mejorar, prevenir, retrasar o inhibir la progresión o el empeoramiento, o prevenir o retardar la aparición de una enfermedad o los síntomas de esta.

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

De acuerdo con la enseñanza, una muestra puede ser cualquier muestra útil de acuerdo con la presente enseñanza, en particular una muestra biológica tal como una muestra de tejido, que incluye los fluidos corporales, y/o una muestra celular y puede obtenerse de manera convencional tal como mediante biopsia de tejido, que incluye la biopsia por punción, y la extracción de sangre, aspirado bronquial, esputo, orina, heces u otros fluidos corporales. De acuerdo con la enseñanza, el término "muestra biológica" incluye, además, fracciones de muestras biológicas.

El término "anticuerpo" se refiere a una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas mediante enlaces disulfuro, o a una porción de unión a antígeno de estas. El término "anticuerpo" incluye además todas las formas recombinantes de anticuerpos, en particular de los anticuerpos descritos en la presente, por ejemplo, anticuerpos expresados en procariotas, anticuerpos no glicosilados, y cualquier fragmento y derivado de anticuerpo de unión al antígeno como se describe en la presente. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente descripción como VH) y una región constante de cadena pesada. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente descripción como VL) y una región constante de cadena ligera. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el amino terminal al carboxilo terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del huésped, que incluyen varias células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema clásico del complemento.

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

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

El término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de unión"), como se usa en la presente descripción, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede llevarse a cabo por los fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión incluidos dentro del término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) fragmentos Fab, fragmentos monovalentes que consisten en los dominios VL, VH, CL y CH; (ii) fragmentos $F(ab')_2$, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra, (iii) fragmentos Fd que consisten en los dominios VH y CH; (iv) fragmentos Fv que consisten en los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo, (v) fragmentos dAb (Ward y otros, (1989) Nature 341: 544-546), que consisten en un dominio VH; (vi) regiones determinantes de la complementariedad (CDR) aisladas, y (vii) combinaciones de dos o más CDR aisladas que opcionalmente pueden estar unidas por un enlazador sintético. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, éstos pueden unirse, por métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que permite su obtención como una simple cadena proteica en la cual las regiones VL y VH se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena simple (scFv); ver por ejemplo, Bird y otros (1988) Science 242: 423-426; y Huston y otros (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883). Tales anticuerpos de cadena simple están destinados a ser incluidos también dentro del término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo. Un ejemplo adicional son las proteínas de fusión inmunoglobulínicas con dominios de unión que comprenden (i) un polipéptido con dominio de unión que se fusiona a un polipéptido de la región bisagra de la inmunoglobulina, (ii) una región constante CH2 de la cadena pesada inmunoglobulínica fusionada a la región bisagra, y (iii) una región constante CH3 de la cadena pesada inmunoglobulínica fusionada a la región constante CH2. El polipéptido de dominio de unión puede ser una región variable de la cadena pesada o una región variable de la cadena ligera. Las proteínas de fusión inmunoglobulínicas con dominio de unión se describen adicionalmente en los documentos

núms. US 2003/0118592 y US 2003/0133939. Los fragmentos de anticuerpos se obtienen por medio del uso de técnicas convencionales conocidas por aquellos con experiencia en la materia, y los fragmentos se tamizan por utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

5 El término "epítopo" se refiere a un determinante proteico capaz de unirse a un anticuerpo, en donde el término "unirse a" en la presente preferentemente se refiere a una unión específica. Los epítomos, por lo general, consisten en agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activas tales como los aminoácidos o cadenas laterales de azúcares y tienen, por lo general, tener características específicas de estructura tridimensional, así como las características específicas de carga. Los epítomos conformacionales y no conformacionales se distinguen porque la unión al primero pero no al último se pierde en presencia de disolventes desnaturalizantes.

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

15 El término "molécula biespecífica" pretende incluir cualquier agente, por ejemplo, una proteína, péptido, o complejo de proteína o péptido, que tiene dos especificidades de unión diferentes. Por ejemplo, la molécula puede unirse o interactuar con (a) un antígeno de superficie celular, y (b) un receptor de Fc en la superficie de una célula efectora. El término "molécula multiespecífica" o "molécula heteroespecífica" pretende incluir cualquier agente, por ejemplo, una proteína, péptido, o complejo de proteína o péptido, que tiene más de dos especificidades de unión diferentes. Por ejemplo, la molécula puede unirse o interactuar con (a) un antígeno de superficie celular, (b) un receptor de Fc en la superficie de una célula efectora, y (c) al menos otro componente. En consecuencia, la enseñanza incluye, pero no se limita a, moléculas biespecíficas, trispecíficas, tetraespecíficas y otras multiespecíficas que se dirigen a GT468, y a otros objetivos, tales como receptores de Fc en las células efectoras. El término "anticuerpos biespecíficos" incluye, además, diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes, biespecíficos en los que los dominios VH y VL se expresan en una simple cadena polipeptídica, pero por medio del uso de un enlazador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, forzando, de ese modo, los dominios a aparearse con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión al antígeno (ver, por ejemplo, Holliger, P., y otros, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448; Poljak, R. J., y otros, (1994) Structure 2: 1121-1123).

30 La enseñanza incluye además los derivados de los anticuerpos descritos en la presente descripción que, para los fines de la enseñanza, son abarcados por el término "anticuerpo". El término "derivados de anticuerpos" se refiere a cualquier forma modificada de un anticuerpo, por ejemplo, un conjugado del anticuerpo y otro agente o anticuerpo. Como se usa en la presente, un anticuerpo se "deriva de" una secuencia de la línea germinal en particular si el anticuerpo se obtiene a partir de un sistema mediante inmunización de un animal o mediante tamizaje de una genoteca de genes de inmunoglobulinas, y en donde el anticuerpo seleccionado es al menos 90 %, con mayor preferencia al menos 95 %, incluso con mayor preferencia al menos 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntico en su secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal. Típicamente, un anticuerpo derivado de una secuencia de la línea germinal en particular mostrará no más de 10 diferencias de aminoácidos, con mayor preferencia, no más de 5, o incluso con mayor preferencia, no más de 4, 3, 2, o 1 diferencia de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de la línea germinal.

45 Como se usa en la presente descripción, el término "heteroanticuerpos" se refiere a dos o más anticuerpos, sus derivados, o regiones de unión al antígeno enlazadas entre sí, al menos dos de las cuales tienen especificidades diferentes. Estas diferentes especificidades incluyen una especificidad de unión por un receptor de Fc en una célula efectora, y una especificidad de unión por un antígeno o epítopo en una célula objetivo, por ejemplo, una célula tumoral.

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

55 El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en la presente descripción se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Un anticuerpo monoclonal muestra una única especificidad de unión y afinidad para un epítopo particular. En una modalidad, los anticuerpos monoclonales se producen mediante un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano, por ejemplo, un ratón, fusionado a una célula inmortalizada.

60 El término "anticuerpo recombinante", como se usa en la presente descripción, incluye todos los anticuerpos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico con respecto a los genes de inmunoglobulina o un hibridoma preparado a partir de estos, (b) anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo, por ejemplo, de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una genoteca combinatoria, recombinante de anticuerpos y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implica el empalme de secuencias génicas de la inmunoglobulina a otras secuencias de ADN.

El término "transfectoma", como se usa en la presente descripción, incluye células huésped eucariotas recombinantes que expresan un anticuerpo, tales como células CHO, células NS/O, células HEK293, células HEK293T, células vegetales, u hongos, que incluyen células de levadura.

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

10 Como se usa en la presente descripción, un "anticuerpo heterohíbrido" se refiere a un anticuerpo que tiene cadenas ligeras y pesadas de diferentes orígenes de organismos. Por ejemplo, un anticuerpo que tiene una cadena pesada humana asociada con una cadena ligera murina es un anticuerpo heterohíbrido.

15 Los anticuerpos descritos en la presente descripción están, preferentemente, aislados. Un "anticuerpo aislado", como se usa en la presente descripción, está destinado a referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a GT468, está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de GT468). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítipo, isoforma o variante de GT468 humano puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo, de otras especies (por ejemplo, homólogos de especies de GT468). Además, un anticuerpo aislado puede estar esencialmente libre de otro material celular y/o químicos. En una modalidad de la enseñanza, una combinación de anticuerpos monoclonales "aislados" se refiere a los anticuerpos con diferentes especificidades y que se combinan en una composición bien definida.

25 De acuerdo con la enseñanza, el término "unión" se relaciona, preferentemente, con una unión específica. "Unión específica" significa que un agente tal como un anticuerpo se une más fuertemente a un objetivo (predeterminado) tal como un antígeno o un epítipo para el que es específico en comparación con la unión a otro objetivo. Un agente se enlaza más fuertemente a un primer objetivo en comparación con un segundo objetivo si se enlaza al primer objetivo con una constante de disociación (K_D) que es menor que la constante de disociación para el segundo objetivo. Preferentemente, la constante de disociación (K_D) para el objetivo al cual se enlaza específicamente el agente es más de 10 veces, preferentemente, más de 20 veces, con mayor preferencia, más de 50 veces, aún con mayor preferencia, más de 100 veces, 200 veces, 500 veces o 1000 veces menor que la constante de disociación (K_D) para el objetivo al cual el agente no se enlaza específicamente. Típicamente, el anticuerpo se une con una afinidad correspondiente a una K_D de aproximadamente 1×10^{-7} M o menos, y se une al antígeno predeterminado con una afinidad correspondiente a una K_D que es al menos dos órdenes de magnitud menor que su afinidad por la unión a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) diferente del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado.

35 El término "KD" (M), como se usa en la presente, está destinado a referirse a la constante de equilibrio de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno en particular.

40 Como se usa en la presente descripción, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1) que se codifica por los genes de la región constante de cadena pesada.

Como se usa en la presente descripción, "cambio de isotipo" se refiere al fenómeno por el cual la clase, o isotipo, de un anticuerpo cambia de una clase de Ig a una de las otras clases de Ig.

45 El término "de origen natural" como se usa en la presente descripción como se aplica a un objeto se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, es de origen natural una secuencia de un polipéptido o polinucleótido que está presente en un organismo (incluyendo los virus) que pueden aislarse a partir de una fuente en la naturaleza y que no se ha modificado intencionalmente por el hombre en el laboratorio.

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

55 El término "no reordenado" o "configuración de línea germinal" como se usa en la presente descripción con respecto a un segmento V se refiere a la configuración en la que el segmento V no se recombina para estar inmediatamente adyacente a un segmento D o J.

60 El término "molécula de ácido nucleico", como se usa en la presente descripción, pretende incluir moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferentemente es ADN bicatenario.

65

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

Los ácidos nucleicos pueden, de acuerdo con la enseñanza, presentarse solos o en combinación con otros ácidos nucleicos, que pueden ser homólogos o heterólogos. En modalidades preferidas, un ácido nucleico se une funcionalmente a las secuencias control de la expresión que pueden ser homólogas o heterólogas con respecto a dicho ácido nucleico, donde el término "homólogo" significa que el ácido nucleico se une funcionalmente, además, a la secuencia control de expresión de forma natural y el término "heterólogo" significa que el ácido nucleico no se une funcionalmente a la secuencia control de expresión de forma natural.

Un ácido nucleico, tal como un ácido nucleico que expresa ARN y/o proteína o péptido, y una secuencia control de expresión están "funcionalmente" unidos entre sí, si se unen covalentemente entre sí de tal manera que la expresión o la transcripción de dicho ácido nucleico está bajo el control o bajo la influencia de dicha secuencia control de la expresión. Si el ácido nucleico debe traducirse en una proteína funcional, entonces, con una secuencia control de la expresión funcionalmente unida a una secuencia codificante, la inducción de dicha secuencia control de la expresión resulta en la transcripción de dicho ácido nucleico, sin causar un cambio de marco en la secuencia codificante o que dicha secuencia codificante no sea capaz de traducirse en la proteína o péptido deseado.

El término "secuencia control de la expresión" comprende, de acuerdo con la enseñanza, promotores, sitios de unión a ribosomas, potenciadores y otros elementos de control que regulan la transcripción de un gen o la traducción de un ARNm. En modalidades particulares de la descripción, pueden regularse las secuencias de control de la expresión. La estructura exacta de las secuencias control de la expresión puede variar en función de la especie o el tipo de célula, pero generalmente comprende secuencias 5'-no transcritas y 5'- y 3'-no traducidas que están involucradas en el inicio de la transcripción y la traducción, respectivamente, tales como caja TATA, secuencia de adición de la caperuza y secuencia CAAT. Más específicamente, las secuencias control de la expresión 5'-no transcritas comprenden una región promotora que es ácido. Las secuencias control de la expresión pueden comprender, además, las secuencias potenciadoras o secuencias activadoras hacia el extremo 5'.

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

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

De acuerdo con la enseñanza, el término "expresión" se usa en su significado más general y comprende la producción de ARN o de ARN y proteína/péptido. Comprende, además, la expresión parcial de ácidos nucleicos. Además, la expresión puede llevarse a cabo de forma transitoria o estable.

En una modalidad preferida, de acuerdo con la enseñanza, una molécula de ácido nucleico se presenta en un vector, cuando sea apropiado con un promotor, que controla la expresión del ácido nucleico. El término "vector" se usa en la presente en su significado más general y comprende cualquier vehículo intermediario para un ácido nucleico que permite que dicho ácido nucleico, por ejemplo, se introduzca en células procariotas y/o eucariotas y, cuando sea apropiado, se integre en un genoma. Preferentemente, los vectores de este tipo se replican y/o se expresan en las células. Los vectores comprenden plásmidos, fagémidos, bacteriófagos o genomas virales. El término "plásmido", como se usa en la presente descripción, se refiere en general a un constructo de material genético extracromosómico, generalmente, un ADN dúplex circular, que puede replicarse independientemente del ADN cromosómico.

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

La enseñanza que se proporciona en la presente descripción con respecto a secuencias específicas de ácidos nucleicos y aminoácidos, por ejemplo, los que se muestran en el listado de secuencias, se debe interpretar para que, además, se

relacionen con las modificaciones de dichas secuencias específicas que resultan en secuencias que son funcionalmente equivalentes a dichas secuencias específicas, por ejemplo, secuencias de aminoácidos que exhiben propiedades idénticas o similares a las de las secuencias de aminoácidos específicas y secuencias de ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos que exhiben propiedades idénticas o similares a las de las secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias de ácido nucleico específicas. Similarmente, la enseñanza que se proporciona en la presente con respecto a anticuerpos específicos o hibridomas que producen anticuerpos específicos debe interpretarse de manera que además se relacionan con anticuerpos caracterizados por una secuencia de aminoácidos y/o secuencia de ácido nucleico que se modifica en comparación con la secuencia de aminoácidos y/o la secuencia de ácido nucleico de los anticuerpos específicos pero que es funcionalmente equivalente. Una propiedad importante es que retienen la unión de un anticuerpo a su objetivo o que mantienen las funciones efectoras de un anticuerpo. Preferentemente, una secuencia modificada con respecto a una secuencia específica, cuando reemplaza la secuencia específica en un anticuerpo conserva la unión de dicho anticuerpo a GT468 y preferentemente las funciones de dicho anticuerpo como se describe en la presente, por ejemplo, la lisis mediada por CDC o la lisis mediada por ADCC.

Los expertos en la materia apreciarán que en particular las secuencias de las CDR, las regiones hipervariables y variables pueden modificarse sin perder la capacidad de unirse a GT468. Por ejemplo, las regiones CDR serán idénticas o muy homólogas a las regiones de los anticuerpos especificados en la presente. Por "muy homólogo" se contempla que pueden hacerse de 1 a 5, preferentemente, de 1 a 4 tal como 1 a 3 o 1 o 2, sustituciones en las CDR. Además, las regiones hipervariables y variables pueden modificarse de manera que muestren una homología sustancial con las regiones de anticuerpos descritas específicamente en la presente.

Debe entenderse que los ácidos nucleicos específicos descritos en la presente incluyen además ácidos nucleicos modificados para optimizar el uso de codones en una célula huésped en particular o en un organismo. Las diferencias en el uso de codones entre los organismos pueden conducir a una variedad de problemas relacionados con una expresión génica heteróloga. La optimización de codones mediante el cambio de uno o más nucleótidos de la secuencia original puede dar como resultado una optimización de la expresión de un ácido nucleico, en particular en la optimización de la eficacia de la traducción, en un huésped homólogo o heterólogo en el cual se expresa dicho ácido nucleico. Por ejemplo si los ácidos nucleicos derivados del ser humano y que codifican regiones constantes y/o regiones del marco de anticuerpos se van a utilizar de acuerdo con la presente enseñanza, por ejemplo para preparar anticuerpos quiméricos o humanizados, puede preferirse modificar dichos ácidos nucleicos para optimizar el uso de codones, en particular si dichos ácidos nucleicos, opcionalmente fusionados a ácidos nucleicos heterólogos tales como ácidos nucleicos derivados de otros organismos como se describe en la presente, se van a expresar en células de un organismo diferente del ser humano tal como ratón o hámster. Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico que codifican regiones constantes de las cadenas pesada y ligera humanas tal como las de acuerdo con las secs. con núms. de ident.: 19 y 20, respectivamente, pueden modificarse para incluir uno o más, preferentemente, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 y preferentemente hasta 10, 15, 20, 25, 30, 50, 70 o 100 o más reemplazos de nucleótidos que resultan en un uso optimizado de codones pero no resultan en un cambio de la secuencia de aminoácidos. Dichos reemplazos de nucleótidos preferentemente se relacionan con reemplazos de nucleótidos en las secs. con núms. de ident.: 19 y 20, respectivamente, que se seleccionan de los reemplazos mostrados en el siguiente alineamiento de las sec. con núms. de ident.: 19 y 20, respectivamente, con sus contrapartes modificadas y que no resultan en un cambio en la secuencia de aminoácidos codificada o se relacionan con reemplazos correspondientes en las posiciones correspondientes en otras secuencias de ácido nucleico que codifican regiones constantes de las cadenas pesada y ligera humanas, respectivamente. Preferentemente, todos los reemplazos mostrados en los siguientes alineamientos de las secs. con núms. de ident.: 19 y 20, respectivamente, con sus contrapartes modificadas que no resultan en un cambio en la secuencia de aminoácidos codificada se realizan en las secuencias de ácido nucleico que codifican las regiones constantes de las cadenas pesada y ligera humanas, respectivamente.

Alineamiento de la sec. con núm. de ident.: 19 y la sec. con núm. de ident.: 21:

```

50  CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT 60
    ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
    CGTACGGTGGCCGCTCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGTCC 60

55  GGAACTGCCTCTGTGTGTGCCTGTGTAATAAATTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAG 120
    ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
    GGCACCGCCAGCGTGGTGTGCTGTGTAACAATTCTACCCCGGAGGCCAAGGTGCAG 120

60  TGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGAC 180
    ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
    TGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTACCGAGCAGGAC 180

    AGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAG 240
  
```

65

ES 2 696 518 T3

```
|||||
5  AGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCCTGAGCAAGGCCGACTACGAG 240
   AAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG 300
   AAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCGTGACCAAG 300
10  AGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG 324
   |||||
   AGCTTCAACAGGGGCGAGTGCTAG 324
```

Alineamiento de la sec. con núm. de ident.: 20 y la sec. con núm. de ident.: 23:

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Además, puede desearse, de acuerdo con la presente enseñanza, modificar las secuencias de aminoácidos que se describen en la presente, en particular aquellas de las regiones constantes de cadenas pesadas humanas para adaptar la secuencia a un alotipo deseado, por ejemplo, un alotipo que se encuentra en la población caucásica. Dichas modificaciones se seleccionan preferentemente del grupo que consiste en los siguientes reemplazos de aminoácidos dentro de la sec. con núm. de ident.: 17 o en las posiciones correspondientes dentro de otras regiones constantes de cadena pesada humana: K93R, D235E y L237M. Preferentemente, todas estas modificaciones se incluyen en secuencias de aminoácidos de regiones constantes de cadena pesada humana.

De acuerdo con la enseñanza, el término "posiciones correspondientes" se refiere a nucleótidos o residuos de aminoácidos que en un alineamiento de secuencias de dos secuencias de ácido nucleico o de proteína se alinean entre sí.

De acuerdo con la enseñanza, una variante, un derivado, una forma modificada o un fragmento de una secuencia de ácido nucleico, secuencia de aminoácidos, o péptido preferentemente tiene una propiedad funcional de la secuencia de ácido nucleico, secuencia de aminoácidos, o péptido, respectivamente, a partir del cual se ha derivado. Dichas propiedades funcionales comprenden la interacción con otras moléculas o unión a estas. En una modalidad, una variante, un derivado, una forma modificada o un fragmento de una secuencia de ácido nucleico, secuencia de aminoácidos, o péptido es inmunológicamente equivalente a la secuencia de ácido nucleico, secuencia de aminoácidos, o péptido, respectivamente, a partir del cual se han derivado.

Preferentemente el grado de identidad entre una secuencia específica de ácido nucleico y una secuencia de ácido nucleico que se modifica con respecto a dicha secuencia específica de ácido nucleico o que es una variante de ésta, será al menos 70 %, preferentemente al menos 75 %, con mayor preferencia al menos 80 %, incluso con mayor preferencia al menos 90 % o con la máxima preferencia al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %. Con relación a las variantes de ácido nucleico de GT468, el grado de identidad se da preferentemente para una región de al menos aproximadamente 300, al menos aproximadamente 400, al menos aproximadamente 450, al menos aproximadamente 500, al menos aproximadamente 550, al menos aproximadamente 600 o al menos aproximadamente 630 nucleótidos. En modalidades preferidas, el grado de identidad se determina para la longitud completa de la secuencia de ácido nucleico de referencia, tal como las secuencias de ácido nucleico determinadas en el listado de secuencias. Preferentemente, las dos secuencias son capaces de hibridar y formar un dúplex estable entre sí, en donde la hibridación se realiza, preferentemente, en condiciones que permiten la hibridación específica entre polinucleótidos (condiciones rigurosas). Las condiciones rigurosas se describen, por ejemplo, en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook y otros, Editores, 2a Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989 o Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel y otros, Editores, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York y se refieren, por ejemplo, a una hibridación a 65 °C en un tampón de hibridación (3,5 x SSC, Ficoll al 0,02 %, polivinilpirrolidona al 0,02 %, albúmina de suero bovino al 0,02 %, NaH₂PO₄ 2,5 mM (pH 7), SDS al 0,5 %, EDTA 2 mM). SSC es cloruro de sodio 0,15 M/citrato de sodio 0,15 M, pH 7. Después de la hibridación, se lava la membrana a la que se ha transferido el ADN, por ejemplo, en 2 x SSC a temperatura ambiente y después en 0.1 - 0.5 x SSC/0.1 x SDS a temperaturas de hasta 68 °C.

Para el propósito de la presente enseñanza, "variantes" de una secuencia de aminoácidos comprenden variantes por inserción de aminoácidos, variantes por delección de aminoácidos y/o variantes por sustitución de aminoácidos.

Preferentemente el grado de similitud, preferentemente la identidad entre una secuencia de aminoácidos específica y una secuencia de aminoácidos que se modifica con respecto a dicha secuencia de aminoácidos específica o que es una variante de ésta, tal como entre las secuencias de aminoácidos que muestran una homología sustancial, será al menos 70 %, preferentemente al menos 80 %, incluso con mayor preferencia al menos 90 % o con la máxima preferencia al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %. Con relación a las variantes de polipéptidos de GT468, el grado de similitud o identidad está dado, preferentemente, para una región de al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 120, al menos aproximadamente 140, al menos aproximadamente 160, al menos aproximadamente 180, al menos aproximadamente 200, al menos aproximadamente 210 o 212 aminoácidos. En modalidades preferidas, el grado de similitud o identidad está dado por la longitud completa de la secuencia de aminoácidos de referencia tales como las secuencias de aminoácidos que se proporcionan en el listado de secuencias.

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

"Similitud de secuencia" indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos o que representan sustituciones de aminoácidos conservativas. "Identidad de secuencia" entre dos secuencias de polipéptidos o ácidos nucleicos indica el porcentaje de aminoácidos o nucleótidos que son idénticos entre las secuencias.

El "porcentaje de identidad" se obtiene después de la mejor alineación, este porcentaje es puramente estadístico y las diferencias entre las dos secuencias se distribuyen en forma aleatoria y en toda su longitud. Las comparaciones de secuencias entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos se llevan a cabo convencionalmente mediante la comparación de estas secuencias después de haberlas alineado de forma óptima, dicha comparación se lleva a cabo por segmento o por "ventana de comparación" para identificar y comparar las regiones locales con similitud de la secuencia. El alineamiento óptimo de las secuencias para comparación puede producirse, además de manualmente, mediante el

algoritmo de homología local de Smith y Waterman, 1981, *Ads App. Math.* 2, 482, mediante el algoritmo de homología local de Needleman y Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443, mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, 1988, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85, 2444, o mediante programas de ordenador que usan estos algoritmos (GAP, BESTFIT, BLAST P, BLAST N y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.).

El porcentaje de identidad se calcula mediante la determinación de la cantidad de posiciones idénticas entre las dos secuencias que se comparan, la división de este número por el número de posiciones comparadas, y la multiplicación por 100 del resultado obtenido de forma que se obtiene el porcentaje de identidad entre estas dos secuencias.

"Las sustituciones conservativas" pueden realizarse, por ejemplo, sobre la base de similitud en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad, y/o la naturaleza anfipática de los residuos implicados. Por ejemplo: (a) los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina; (b) los aminoácidos polares neutros incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina; (c) los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina; y (d) los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico.

Las sustituciones típicamente pueden realizarse dentro de los grupos (a)-(d). Adicionalmente, glicina y prolina se pueden sustituir una por otra basado en su capacidad de alterar α -hélices. Algunas sustituciones preferidas pueden producirse entre los siguientes grupos: (i) S y T; (ii) P y G; y (iii) A, V, L e I. Dado el código genético conocido, y las técnicas de ADN recombinante y sintético, el científico experto puede construir fácilmente los ADN que codifican las variantes de aminoácidos conservativas.

La presente enseñanza comprende anticuerpos en los cuales se han producido alteraciones en la región Fc para cambiar las propiedades funcionales o farmacocinéticas de los anticuerpos. Dichas alteraciones pueden dar como resultado una disminución o aumento de la unión de C1q y CDC o de la unión de Fc γ R y ADCC. Las sustituciones pueden, por ejemplo, realizarse en uno o más de los residuos de aminoácidos de la región constante de cadena pesada, provocando así una alteración en una función efectora a la vez que se retiene la capacidad de unirse al antígeno en comparación con el anticuerpo modificado, cf. documento núm. US 5,624,821 y documento núm. US 5,648,260.

La vida media in vivo de los anticuerpos puede mejorarse por medio de la modificación del epítipo del receptor de rescate del dominio constante de Ig o un dominio constante similar a Ig de manera que la molécula no comprenda un dominio CH2 intacto o una región Fc de Ig intacta, cf. documento núm. US 6,121,022 y documento núm. US 6,194,551. La vida media in vivo puede aumentarse adicionalmente por medio de la preparación de mutaciones en la región Fc, por ejemplo, por medio de la sustitución de treonina por leucina en la posición 252, por medio de la sustitución de treonina por serina en la posición 254, o por medio de la sustitución de treonina por fenilalanina en la posición 256, cf. documento núm. US 6,277,375.

Además, el patrón de glicosilación de los anticuerpos puede modificarse para cambiar la función efectora de los anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos pueden expresarse en un transfectoma que no añade la unidad de fucosa normalmente unida a Asn en la posición 297 de la región Fc para mejorar la afinidad de la región Fc por los receptores de Fc lo cual, a su vez, dará como resultado un aumento de la ADCC de los anticuerpos en presencia de células NK, cf. Shield y otros (2002) *JBC*, 277: 26733. Además, la modificación de la galactosilación puede producirse para modificar la CDC.

Alternativamente, en otra modalidad, las mutaciones se pueden introducir al azar a lo largo de toda o parte de una secuencia codificante del anticuerpo anti-GT468, tal como por mutagénesis de saturación, y los anticuerpos anti-GT468 modificados resultantes se pueden seleccionar por su actividad de unión.

El término "célula huésped recombinante" (o simplemente "célula huésped"), como se usa en la presente, se refiere a una célula en la que se introdujo un vector de expresión recombinante. Se entenderá que dichos términos se refieren no solamente a una célula sujeto particular sino también a la progenie de esa célula. Dado que pueden producirse determinadas modificaciones en las generaciones sucesivas debido a una mutación o influencias ambientales, dicha progenie, de hecho, puede no ser idéntica a la célula parental, pero aun así se incluye dentro del alcance del término "célula huésped" como se usa en la presente descripción. Las células huésped recombinantes incluyen, por ejemplo, transfectomas, tales como células CHO, células NS/O y células linfocíticas.

Como se usa en la presente, el término "sujeto" incluye cualquier animal humano o no humano. El término "animal no humano" incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etcétera.

Los términos "animal transgénico" se refiere a un animal que tiene un genoma que comprende uno o más transgenes, preferentemente transgenes de cadenas pesadas y/o ligeras, o transcromosomas (ya sea integrados o no en el ADN genómico natural del animal) y que preferentemente es capaz de expresar los transgenes. Por ejemplo, un ratón transgénico puede tener un transgén humano de una cadena ligera y ya sea un transgén de cadena pesada humana o un transcromosoma de cadena pesada humana, de manera que el ratón produce anticuerpos humanos anti-GT468

cuando se inmuniza con un antígeno de GT468 y/o con células que expresan GT468. El transgén de la cadena pesada humana puede integrarse en el ADN cromosómico del ratón, como es el caso de los ratones transgénicos, por ejemplo, los ratones HuMAB, tales como los ratones HCo7 o HCo2, o el transgén de la cadena pesada humana puede mantenerse extracromosómicamente, como el caso de ratones transcromosómicos (por ejemplo, KM) como se describe en el documento núm. WO 02/43478. Tales ratones transgénicos y transcromosómicos pueden ser capaces de producir múltiples isotipos de anticuerpos monoclonales humanos contra GT468 (por ejemplo, IgG, IgA y/o IgE) sometidos a recombinación V-D-J y a cambio de isotipo.

"Reducir" o "inhibir" tal como se usa en la presente descripción significa la capacidad de provocar una disminución total, preferentemente, del 5 % o superior, del 10 % o superior, del 20 % o superior, con mayor preferencia del 50 % o superior, y con la máxima preferencia del 75 % o superior, en el nivel, por ejemplo en el nivel de proliferación de células.

La frase "inhibir la actividad de una célula" o frases similares incluyen una inhibición completa o sustancialmente completa de la actividad de la célula y una reducción en la actividad de la célula. Preferentemente, dicha inhibición de la actividad de una célula reduce el crecimiento de células tumorales y/o induce la muerte de células tumorales y por lo tanto, tiene un efecto inhibitor del tumor o destructor del tumor.

Mecanismos de acción de AcM

Aunque lo siguiente proporciona consideraciones relacionadas con el mecanismo subyacente de la eficacia terapéutica de los anticuerpos de la enseñanza no debe considerarse como limitante de la enseñanza de ninguna manera.

Los anticuerpos descritos en la presente pueden interactuar con componentes del sistema inmunitario, preferentemente a través de ADCC o CDC. Los anticuerpos de la enseñanza pueden usarse, además, para cargas útiles al objetivo (por ejemplo, radioisótopos, fármacos o toxinas) para destruir directamente las células tumorales o pueden usarse sinérgicamente con agentes quimioterapéuticos tradicionales, por medio del ataque a tumores a través de mecanismos de acción complementarios que pueden incluir respuestas inmunitarias antitumorales que pueden haber sido comprometidas debido a los efectos secundarios citotóxicos del compuesto quimioterapéutico en los linfocitos T. Sin embargo, los anticuerpos de la enseñanza también pueden ejercer un efecto uniéndose simplemente a GT468 en la superficie celular, por ejemplo, bloqueando así la proliferación de las células.

Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos

La ADCC describe la capacidad de las células efectoras, en particular linfocitos, para destruir células, que requieren, preferentemente, que la célula objetivo esté señalizada por un anticuerpo.

La ADCC ocurre, preferentemente, cuando los anticuerpos se unen a los antígenos en las células tumorales y los dominios Fc del anticuerpo se enlazan con los receptores de Fc (FcR) en la superficie de las células efectoras inmunitarias. Se han identificado varias familias de receptores de Fc, y las poblaciones celulares específicas que expresan de manera característica los receptores definidos de Fc. La ADCC puede verse como un mecanismo para inducir directamente un grado variable de destrucción tumoral inmediata que conduce a la presentación de antígenos y a la inducción de respuestas de células T dirigidas al tumor. Preferentemente, la inducción *in vivo* de la ADCC conducirá a respuestas de células T dirigidas al tumor y a respuestas de anticuerpos derivadas del huésped.

Citotoxicidad dependiente del complemento

La CDC es otro método de destrucción celular que puede ser dirigido por anticuerpos. La IgM es el isotipo más efectivo para la activación del complemento. Además, las IgG1 e IgG3 son ambas muy efectivas para mediar la CDC a través de la vía clásica de activación del complemento. Preferentemente, en esta cascada, la formación de complejos antígeno-anticuerpo resulta en la exposición de múltiples sitios de unión a C1q en estrecha proximidad en los dominios C_H2 de las moléculas de anticuerpos participantes, tales como las moléculas IgG (C1q es uno de los tres subcomponentes del complemento C1). Preferentemente, estas exposiciones de los sitios de unión a C1q convierten la interacción C1q-IgG, previamente de baja afinidad, en una interacción de alta afección, que dispara una cascada de eventos que implican una serie de otras proteínas del complemento y que conduce a la liberación proteolítica de los agentes quimiotácticos, y activadores de las células efectoras, C3a y C5a. Preferentemente, la cascada del complemento termina en la formación de un complejo de ataque a la membrana, que crea poros en la membrana celular que facilitan el paso libre de agua y solutos hacia adentro y afuera de la célula.

Producción de anticuerpos

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

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

Otros sistemas animales preferidos para preparar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales son los sistemas de rata y conejo (por ejemplo descritos en Spieker-Polet y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:9348 (1995), véase además Rossi y otros, Am. J. Clin. Pathol. 124: 295 (2005)).

Aún en otra modalidad preferida, los anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra GT468 pueden generarse usando ratones transgénicos o transcromosómicos que portan partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones conocidos como ratones HuMAb y ratones KM, respectivamente, y se denominan colectivamente en la presente descripción como "ratones transgénicos". La producción de anticuerpos humanos en tales ratones transgénicos puede realizarse como se describe en detalle para CD20 en el documento núm. WO2004 035607.

Aún otra estrategia para generar anticuerpos monoclonales es aislar directamente los genes que codifican anticuerpos a partir de linfocitos que producen los anticuerpos de la estrategia definida, por ejemplo véase Babcock y otros, 1996; A novel strategy for generating monoclonal antibodies from single, isolated lymphocytes producing antibodies of defined strategy. Para ver los detalles de la modificación genética de anticuerpos recombinantes véase además Welschof y Kraus, Recombinant antibodies for cancer therapy ISBN-0-89603-918-8 y Benny K.C. Lo Antibody Engineering ISBN 1-58829-092-1.

Inmunizaciones

Para generar anticuerpos contra GT468, los ratones pueden inmunizarse con péptidos derivados de la secuencia de GT468, conjugados con el portador, con una preparación enriquecida del antígeno GT468 expresado de manera recombinante o fragmentos de este y/o con células que expresan GT468, como se describe. Alternativamente, los ratones pueden inmunizarse con ADN que codifica el GT468 humano de longitud completa (por ejemplo sec. con núm. de ident.: 1) o fragmentos de este, en particular los que codifican las secs. con núms. de ident.: 3-10 y 35-82. En el caso que las inmunizaciones que usan una preparación purificada o enriquecida del antígeno de GT468 no resulten en anticuerpos, los ratones también pueden inmunizarse con células que expresan GT468, por ejemplo, una línea celular, para promover respuestas inmunitarias.

La respuesta inmunitaria puede monitorizarse en el curso del protocolo de inmunización con muestras de plasma y suero que se obtienen por sangrados retroorbitales o por la vena de la cola. Los ratones con suficientes títulos de inmunoglobulina anti-GT468 pueden usarse para las fusiones. Los ratones pueden reforzarse por vía intraperitoneal o intravenosa con células que expresan GT468, 3 días antes del sacrificio y la extracción del bazo para aumentar la tasa de hibridomas que secretan anticuerpos específicos.

Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales

Para generar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales contra GT468, los esplenocitos y las células de nódulos linfáticos de ratones inmunizados pueden aislarse y fusionarse a una línea celular inmortalizada apropiada, tal como una línea celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes pueden seleccionarse en cuanto a la producción de anticuerpos específicos para el antígeno. Después los pocillos individuales pueden someterse a selección mediante ELISA para determinar los hibridomas secretores de anticuerpos. Mediante inmunofluorescencia y análisis de FACS con el uso de células que expresan GT468, pueden identificarse los anticuerpos con especificidad para GT468. Los hibridomas secretores de anticuerpos se pueden volver a sembrar en placas, seleccionarse de nuevo, y si todavía son positivos para anticuerpos monoclonales anti-GT468 pueden subclonarse por dilución limitante. Después los subclones estables pueden cultivarse in vitro para generar anticuerpos en medio de cultivo tisular para su caracterización.

Generación de transfectomas que producen anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos de la enseñanza también pueden producirse en un transfectoma de células huésped usando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección de genes como se conoce bien en la técnica (Morrison, S. (1985) Science 229:1202).

Por ejemplo, en una modalidad, el o los genes de interés, por ejemplo, genes de anticuerpos, pueden ligarse en un vector de expresión tal como un plásmido de expresión en eucariota tal como se usa por el sistema de expresión del gen GS descrito en los documentos núms. WO 87/04462, WO 89/01036 y EP 338 841 u otros sistemas de expresión bien conocidos en la materia. El plásmido purificado con los genes clonados del anticuerpo puede introducirse en células huésped eucariotas tal como células CHO, células NS/O, células HEK293T o células HEK293 o alternativamente otras células eucariotas como células derivadas de plantas, hongos o células de levadura. El método usado para introducir estos genes pueden ser los métodos descritos en la técnica tales como la electroporación, lipofectina, lipofectamina u otros. Después de la introducción de estos genes de anticuerpo en las células huésped, las células que expresan el

anticuerpo pueden identificarse y seleccionarse. Estas células representan los transfectomas que después pueden amplificarse para su nivel de expresión y escalarse para producir anticuerpos. Los anticuerpos recombinantes pueden aislarse y purificarse a partir de estos sobrenadantes del cultivo y/o células.

5 Alternativamente, los genes del anticuerpo clonados pueden expresarse en otros sistemas de expresión, que incluyen células procariotas, tal como microorganismos, por ejemplo *E. coli*. Además, los anticuerpos pueden producirse en animales no humanos transgénicos, tal como en la leche de ovejas y conejos o en huevos de gallinas, o en plantas transgénicas; véase por ejemplo Verma, R., y otros (1998) *J. Immunol. Meth.* 216: 165-181; Pollock, y otros, (1999) *J. Immunol. Meth.* 231: 147-157; y Fischer, R., y otros, (1999) *Biol. Chem.* 380: 825-839.

10

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

a) Quimerización

15 Los anticuerpos monoclonales murinos pueden usarse como anticuerpos terapéuticos en seres humanos cuando se marcan con toxinas o isótopos radioactivos. Los anticuerpos murinos no marcados son altamente inmunogénicos en el hombre cuando se aplican repetidamente lo que conduce a una reducción del efecto terapéutico. La inmunogenicidad principal está mediada por las regiones constantes de la cadena pesada. La inmunogenicidad de los anticuerpos murinos en el hombre puede reducirse o evitarse completamente si los anticuerpos respectivos son quimerizados o humanizados.

20 Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos, cuyas diferentes porciones se derivan de diferentes especies animales, tales como las que tienen una región variable derivada de un anticuerpo murino y una región constante de inmunoglobulina humana. La quimerización de los anticuerpos se logra mediante la unión de las regiones variables de la cadena pesada y ligera del anticuerpo murino con la región constante de la cadena pesada y ligera humana (por ejemplo como se describe por Kraus y otros, en la serie de *Methods in Molecular Biology, Recombinant antibodies for cancer therapy* ISBN-0-89603-918-8). En una modalidad preferida los anticuerpos quiméricos se generan mediante unión de la región constante de la cadena ligera kappa humana a la región variable de la cadena ligera murina. En otra modalidad preferida los anticuerpos quiméricos pueden generarse mediante unión de la región constante de la cadena ligera lambda humana a la región variable de la cadena ligera murina. Las regiones constantes de cadena pesada preferidas para la generación de anticuerpos quiméricos son IgG1, IgG3 e IgG4. Otras regiones constantes de la cadena pesada preferidas para la generación de anticuerpos quiméricos son IgG2, IgA, IgD e IgM.

30

b) Humanización

35 Por ejemplo, los anticuerpos interactúan con los antígenos objetivos, predominantemente, a través de los residuos de aminoácidos que se encuentran en las seis regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de las cadenas pesada y ligera. Por esta razón, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDR son más diversas entre los anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Debido a que las secuencias de CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de los anticuerpos específicos de origen natural mediante la construcción de vectores de expresión que incluyen secuencias CDR del anticuerpo específico de origen natural injertadas en las secuencias del marco de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes (ver, por ejemplo, Riechmann, L. y otros. (1998) *Nature* 332:323-327; Jones, P. y otros. (1986) *Nature* 321:522-525; y Queen, C. y otros. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10029-10033). Tales secuencias marco pueden obtenerse a partir de bases de datos públicas de ADN que incluyen secuencias de genes de anticuerpos de la línea germinal. Estas secuencias de la línea germinal se diferenciarán de las secuencias génicas del anticuerpo maduro porque no incluirán los genes variables ensamblados completamente, que se forman por unión V (D) J durante la maduración de células B. Las secuencias génicas de la línea germinal se diferenciarán, además, de las secuencias de un anticuerpo del repertorio secundario de alta afinidad en el individuo de manera uniforme a través de la región variable. Por ejemplo, las mutaciones somáticas son relativamente infrecuentes en la porción amino terminal de la región del marco 1 y en la porción carboxi terminal de la región del marco 4. Además, muchas mutaciones somáticas no alteran significativamente las propiedades de unión del anticuerpo. Por esta razón, no es necesario obtener la secuencia de ADN completa de un anticuerpo en particular para recrear un anticuerpo recombinante intacto que tenga propiedades de unión similares a las del anticuerpo original (ver el documento núm. WO 99/45962). Las secuencias parciales de las cadenas pesada y ligera que abarcan las regiones CDR típicamente son suficientes para este propósito. La secuencia parcial se usa para determinar los segmentos de genes variables de la línea germinal y los genes de unión que contribuyeron a los genes variables del anticuerpo recombinado. La secuencia de la línea germinal se usa después para llenar las porciones faltantes de las regiones variables. Las secuencias líder de las cadenas pesada y ligera se escinden durante la maduración de la proteína y no contribuyen a las propiedades del anticuerpo final. Para añadir las secuencias faltantes, las secuencias de ADNc clonadas pueden combinarse con oligonucleótidos sintéticos mediante ligación o amplificación por PCR. Alternativamente, toda la región variable puede sintetizarse como un conjunto de oligonucleótidos cortos y superpuestos, y combinarse mediante amplificación por PCR para crear un clon de la región variable totalmente sintética. Este proceso tiene ciertas ventajas como la eliminación o inclusión de sitios de restricción en particular, o la optimización de codones en particular.

60

65 Las secuencias de nucleótidos de los transcritos de la cadena pesada y ligera a partir de los hibridomas se usan para diseñar un conjunto superpuesto de oligonucleótidos sintéticos para crear secuencias V sintéticas con capacidades idénticas de codificación de aminoácidos como las secuencias naturales. Las secuencias sintéticas de cadena pesada y

kappa pueden diferir de las secuencias naturales de tres maneras: cadenas de bases de nucleótidos repetidas se interrumpen para facilitar la síntesis de oligonucleótidos y la amplificación por PCR; los sitios óptimos de iniciación de la traducción se incorporan de acuerdo con las reglas de Kozak (Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266: 19867-19870); y los sitios HindIII se modifican genéticamente hacia el extremo 5' de los sitios de iniciación de la traducción.

5

Para ambas regiones variables de las cadenas pesada y ligera, las secuencias de la cadena codificante optimizada y la correspondiente no codificante, se dividen en 30-50 nucleótidos aproximadamente en el punto medio del correspondiente oligonucleótido no codificante. Por lo tanto, para cada cadena, los oligonucleótidos pueden ensamblarse en conjuntos bicatenarios superpuestos que abarcan segmentos de 150-400 nucleótidos. Las mezclas se usan después como moldes para obtener los productos de amplificación por PCR de 150-400 nucleótidos. Típicamente, un solo conjunto de oligonucleótidos de la región variable se dividirá en dos grupos que se amplifican separadamente para generar dos productos de PCR superpuestos. Estos productos superpuestos se combinan después mediante amplificación por PCR para formar la región variable completa. Puede ser conveniente, además, incluir un fragmento superpuesto de la región constante de la cadena pesada o ligera en la amplificación por PCR para generar fragmentos que puedan clonarse fácilmente en las construcciones del vector de expresión.

10

15

Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera quimerizadas o humanizadas y reconstruidas se combinan después con secuencias clonadas de un promotor, líder, de iniciación de la traducción, de región constante, 3' no traducida, de poliadenilación, y de terminación de la transcripción para formar construcciones del vector de expresión. Las construcciones para la expresión de las cadenas pesada y ligera pueden combinarse en un vector único, co-transfectado, transfectado serialmente, o transfectado separadamente en las células huésped que después se fusionan para formar una célula huésped que expresa ambas cadenas. Se describen plásmidos para usar en la construcción de vectores de expresión para IgG_k humana. Los plásmidos pueden construirse de manera que las secuencias de ADNc de la cadena pesada V y ligera kappa V amplificadas por PCR pueden usarse para reconstruir minigenes completos de las cadenas pesada y ligera. Estos plásmidos pueden usarse para expresar anticuerpos IgG1, Kappa o IgG4, Kappa, completamente humanos o quiméricos. Pueden construirse plásmidos similares para determinar la expresión de otros isotipos de cadena pesada, o para determinar la expresión de anticuerpos que comprenden cadenas ligeras lambda.

20

25

Por lo tanto, en otro aspecto de la enseñanza, las características estructurales de los anticuerpos anti-GT468 de la enseñanza, se usan para crear anticuerpos anti-GT468 humanizados estructuralmente relacionados que retienen al menos una propiedad funcional de los anticuerpos de la enseñanza, tal como la unión a GT468. Más específicamente, una o más regiones CDR de anticuerpos monoclonales de ratón pueden combinarse de manera recombinante con regiones del marco humanas conocidas y CDR para crear otros anticuerpos anti-GT468, humanizados, modificados de manera recombinante, de la enseñanza.

30

35

Unión a células que expresan el antígeno

40

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

Aislamiento y caracterización de anticuerpos

45

50

Para purificar anticuerpos anti-GT468, pueden cultivarse hibridomas seleccionados en matraces rotativos de dos litros para la purificación de anticuerpos monoclonales. Alternativamente, los anticuerpos anti-GT468 pueden producirse en biorreactores basados en diálisis. Los sobrenadantes pueden filtrarse y, en caso de ser necesario, concentrarse antes de la cromatografía de afinidad con proteína G-sefarosa o proteína A-sefarosa (Pharmacia, Piscataway, Nueva Jersey). Las IgG eluidas pueden verificarse mediante la electroforesis en gel y la cromatografía líquida de alta resolución para asegurar la pureza. La solución tampón puede intercambiarse con PBS, y la concentración puede determinarse mediante OD280 usando un coeficiente de extinción de 1,43. Los anticuerpos monoclonales pueden dividirse en alícuotas y almacenarse a -80 °C.

55

Para determinar si los anticuerpos monoclonales anti-GT468 seleccionados se unen a epítopos únicos, pueden usarse mutagénesis dirigida a un sitio o dirigida a múltiples sitios.

Determinación del isotipo

60

65

Para determinar el isotipo de los anticuerpos purificados, pueden realizarse ensayos ELISA para el isotipo con diversos kits comerciales (por ejemplo Zymed, Roche Diagnostics). Los pocillos de las placas de microtitulación pueden recubrirse con anti-Ig de ratón. Después del bloqueo, las placas reaccionan con anticuerpos monoclonales o controles de isotipo purificados, a la temperatura ambiente durante dos horas. Los pocillos se pueden hacer reaccionar después ya sea con IgG1, IgG2a, IgG2b o IgG3, IgA de ratón o sondas conjugadas con peroxidasa específicas para IgM de ratón. Después de lavar, las placas pueden ser revelarse con sustrato ABTS (1 mg/ml) y se analizarse a OD de 405-650. Alternativamente, el kit para determinar el Isotipo de Anticuerpos Monoclonales de Ratón IsoStrip (Roche, Cat. núm. 1493027) puede usarse como se describe por el fabricante.

Análisis de citometría de flujo

Para demostrar la presencia de anticuerpos anti-GT468 en el suero de ratones inmunizados o la unión de anticuerpos monoclonales a células vivas que expresan GT468, puede usarse la citometría de flujo. Las líneas celulares que expresan GT468 naturalmente o después de la transfección y los controles negativos que carecen de la expresión de GT468 (cultivados en condiciones de cultivo estándar) pueden mezclarse con diversas concentraciones de anticuerpos monoclonales en los sobrenadantes de hibridomas o en PBS que contiene FBS al 1 %, y pueden incubarse a 4 °C durante 30 min. Después del lavado, el anticuerpo anti IgG marcado con APC o Alexa647 puede unirse al anticuerpo monoclonal unido a GT468 en las mismas condiciones que la tinción del anticuerpo primario. Las muestras pueden analizarse mediante citometría de flujo con un instrumento FACS por medio del uso de propiedades de dispersión lateral y de la luz para atravesar las células vivas individuales. Para distinguir los anticuerpos monoclonales específicos para GT468 de los aglutinantes no específicos en una sola medición, puede emplearse el método de co-transfección. Las células transfectadas transitoriamente con plásmidos que codifican GT468 y un marcador fluorescente pueden teñirse como se describió anteriormente. Las células transfectadas pueden detectarse en un canal de fluorescencia diferente que las células teñidas con anticuerpo. Como la mayoría de las células transfectadas expresan ambos transgenes, los anticuerpos monoclonales específicos para GT468 se unen preferentemente a células que expresan el marcador de fluorescencia, mientras que los anticuerpos no específicos se unen en una relación comparable a las células no transfectadas. Un ensayo alternativo que usa microscopía de fluorescencia puede usarse además del ensayo de citometría de flujo o en lugar de éste. Las células pueden teñirse exactamente como se describió anteriormente y examinarse mediante microscopía de fluorescencia.

Microscopía de inmunofluorescencia

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

Los niveles totales de GT468 en las células pueden observarse cuando las células se fijan con metanol o se fijan con paraformaldehído y se permeabilizan con Triton X-100. En las células vivas y las células fijadas con paraformaldehído, no permeabilizadas, puede examinarse la localización superficial de GT468. Adicionalmente el direccionamiento de GT468 a las uniones estrechas puede analizarse mediante co-tinción con marcadores de las uniones estrechas como ZO-1. Además, puede examinarse los efectos de la unión del anticuerpo y la localización de GT468 dentro de la membrana celular.

Transferencia Western

Las IgG anti-GT468 pueden analizarse adicionalmente para determinar la reactividad con el antígeno GT468 mediante transferencia Western. Brevemente, los extractos celulares de las células que expresan GT468 y controles negativos adecuados pueden prepararse y someterse a electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecil sulfato de sodio (SDS). Después de la electroforesis, los antígenos separados serán transferidos a membranas de nitrocelulosa, bloqueados y analizados con sondas con los anticuerpos monoclonales que se van a analizar. La unión de IgG puede detectarse por medio del uso de anti-IgG ratón peroxidasa y desarrollarse con sustrato ECL.

Inmunohistoquímica

Las IgG anti-GT468 de ratón pueden analizarse, además, para determinar la reactividad con el antígeno GT468 mediante inmunohistoquímica de una manera bien conocida por la persona experta, por ejemplo, mediante el uso de criosecciones fijadas con paraformaldehído o acetona o secciones de tejido embebidas en parafina fijadas con paraformaldehído, provenientes de muestras de tejido no canceroso o de tejido canceroso obtenidas de pacientes durante los procedimientos quirúrgicos rutinarios o de ratones portadores de tumores xenoinjertados inoculados con líneas celulares que expresan GT468 espontáneamente o después de la transfección. Para la inmunotinción, los anticuerpos reactivos a GT468 pueden incubarse seguidos por anticuerpos de cabra anti-ratón o de cabra anti-conejo conjugados con peroxidasa de rábano picante (DAKO) de acuerdo con las instrucciones del vendedor.

Actividades fagocíticas y de destrucción celular de los anticuerpos in vitro

Además de unirse específicamente a GT468, los anticuerpos anti-GT468 pueden analizarse para determinar su capacidad para mediar la fagocitosis y la destrucción de células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de

GT468 con su superficie celular. Las pruebas de la actividad del anticuerpo monoclonal in vitro proporcionarán un tamizaje inicial antes de las pruebas en los modelos in vivo.

Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC):

5 Brevemente, las células polimorfonucleares (PMN), células NK, monocitos, células mononucleares u otras células efectoras, de donantes saludables pueden purificarse mediante centrifugación por densidad con Ficoll Hypaque, seguido por la lisis de eritrocitos contaminantes. Las células efectoras lavadas pueden suspenderse en RPMI suplementado con suero fetal bovino al 10 % inactivado por calor o, alternativamente con suero humano al 5 % inactivado por calor, y mezclarse con células objetivo marcadas con ⁵¹Cr que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular, en diversas relaciones de las células efectoras con respecto a las células objetivo. Alternativamente, las células objetivo pueden marcarse con un ligando potenciador de la fluorescencia (BATDA). Un agente quelante altamente fluorescente de europio con el ligando potenciador que se libera de las células muertas puede medirse mediante un fluorómetro. Otra técnica alternativa puede utilizar la transfección de células objetivo con luciferasa. El amarillo lucifer puede oxidarse después por las células viables solamente. Las IgG anti-GT468 purificadas pueden añadirse después a diversas concentraciones. Puede usarse una IgG humana irrelevante como control negativo. Los ensayos pueden llevarse a cabo durante 4 a 20 horas a 37 °C en dependencia del tipo de célula efectora utilizada. Las muestras pueden analizarse para determinar la citólisis mediante la medición de liberación de ⁵¹Cr o la presencia del agente quelante EuTDA en el sobrenadante del cultivo. Alternativamente, la luminiscencia resultante de la oxidación del amarillo de lucifer puede ser una medida de las células viables.

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

25 Citotoxicidad dependiente del complemento (CDC):

Los anticuerpos monoclonales anti-GT468 pueden analizarse para determinar su capacidad para mediar la CDC por medio del uso de una variedad de técnicas conocidas. Por ejemplo, el suero para el complemento puede obtenerse a partir de la sangre de una manera conocida por el experto. Para determinar la actividad CDC de los AcM, pueden usarse diferentes métodos. Por ejemplo, la liberación de ⁵¹Cr puede medirse, o la permeabilidad de membrana elevada puede evaluarse mediante el uso de un ensayo de exclusión de yoduro de propidio (PI). Brevemente, las células objetivo pueden lavarse y pueden incubarse 5×10^5 /ml con diversas concentraciones de AcM durante 10-30 min. a temperatura ambiente o a 37 °C. Después puede añadirse suero o plasma a una concentración final de 20 % (v/v) y las células incubarse a 37 °C durante 20-30 min. Todas las células de cada muestra pueden añadirse a la solución de PI en un tubo de FACS. La mezcla puede analizarse inmediatamente mediante análisis de citometría de flujo por medio del uso de FACSArray.

En un ensayo alternativo, la inducción de CDC puede determinarse en las células adherentes. En una modalidad de este ensayo, las células se siembran 24 horas antes del ensayo con una densidad de 3×10^4 /pocillo en placas de microtitulación de fondo plano de cultivo de tejidos. Al día siguiente se retira el medio de cultivo y las células se incuban por triplicado con anticuerpos. Las células control se incuban con medio de cultivo o medio de cultivo que contiene saponina al 0.2 % para la determinación de la lisis de fondo y la lisis máxima, respectivamente. Después de la incubación durante 20 min. a temperatura ambiente el sobrenadante se elimina y se añade plasma humano al 20 % (v/v) o suero en DMEM (calentado previamente a 37 °C) a las células y se incuban durante otros 20 min. a 37 °C. Todas las células de cada muestra se añaden a la solución de yoduro de propidio (10 µg/ml). Después, los sobrenadantes se reemplazan por PBS que contiene 2,5 µg/ml de bromuro de etidio y la emisión de fluorescencia tras la excitación a 520 nm se mide a 600 nm por medio del uso de un Tecan Safire. El porcentaje de lisis específica se calcula de la siguiente manera: % de lisis específica = (fluorescencia de la muestra-fluorescencia del fondo) / (fluorescencia máxima por lisis-fluorescencia de fondo) x 100.

Inhibición de la proliferación celular por los anticuerpos monoclonales:

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

Estudios preclínicos

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

10 Los estudios in vivo después de xenoinjertar células tumorales que expresan GT468 en ratones inmunodeprimidos u otros animales pueden realizarse mediante el uso de anticuerpos de la enseñanza. Los anticuerpos pueden administrarse a ratones libres de tumores seguido por la inyección de células tumorales para medir los efectos de los anticuerpos para prevenir la formación de tumores o síntomas relacionados con tumores. Los anticuerpos pueden administrarse a ratones que portan tumores para determinar la eficacia terapéutica de los anticuerpos respectivos para reducir el crecimiento tumoral, las metástasis o los síntomas relacionados con tumores. La aplicación de anticuerpos puede combinarse con la aplicación de otras sustancias como fármacos citostáticos, inhibidores de factores de crecimiento, bloqueadores del ciclo celular, inhibidores de la angiogénesis u otros anticuerpos para determinar la eficacia sinérgica y la toxicidad potencial de las combinaciones. Para analizar los efectos tóxicos secundarios mediados por los anticuerpos de la enseñanza los animales pueden inocularse con anticuerpos o reactivos control e investigarse completamente en cuanto a los síntomas posiblemente relacionados con la terapia de anticuerpos contra GT468. Los posibles efectos secundarios de una aplicación in vivo de anticuerpos contra GT468 incluyen particularmente toxicidad en los tejidos que expresan GT468 que incluyen la placenta. Los anticuerpos que reconocen el GT468 en el ser humano y en otras especies, por ejemplo ratones, son particularmente útiles para predecir los efectos secundarios potenciales mediados por la aplicación de anticuerpos monoclonales contra GT468 en seres humanos.

Mapeo de epítipo

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

30 I. moléculas biespecíficas/multiespecíficas que se unen a GT468

35 Aún en otra modalidad de la enseñanza, los anticuerpos contra GT468 pueden derivatizarse o unirse a otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, un fragmento Fab') para generar una molécula biespecífica o multispecífica que se une a múltiples sitios de unión o epítipos objetivo. Por ejemplo un anticuerpo de la enseñanza puede estar funcionalmente unido (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de cualquier otra manera) a una o más moléculas de unión, tales como otro anticuerpo, péptido o mimético de unión.

40 En consecuencia, la presente enseñanza incluye moléculas biespecíficas y multispecíficas que comprenden al menos una primera especificidad de unión para GT468 y una segunda especificidad de unión para un segundo epítipo objetivo. En una modalidad particular de la enseñanza, el segundo epítipo objetivo es un receptor de Fc, por ejemplo RI de Fc-gamma humano (CD64) o un receptor de Fc-alfa humano (CD89), o un receptor de células T, por ejemplo CD3. Por lo tanto, la enseñanza incluye moléculas biespecíficas y multispecíficas capaces de unirse a células efectoras que expresan R de Fc-gamma, R de Fc-alfa o T de Fc-epsilon (por ejemplo monocitos, macrófagos o células polimorfonucleares (PMN)), y a células objetivo que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular. Estas moléculas biespecíficas y multispecíficas pueden dirigir las células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular a las células efectoras y pueden activar actividades de células efectoras mediadas por receptores de Fc, tal como fagocitosis de células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), liberación de citocinas, o generación del anión superóxido.

50 Las moléculas biespecíficas y multispecíficas de la enseñanza pueden incluir adicionalmente una tercera especificidad de unión, además de una especificidad de unión anti-Fc y una especificidad de unión anti-GT468. En una modalidad, la tercera especificidad de unión es una porción del factor antipotencia, por ejemplo, una molécula que se une a una proteína de superficie implicada en la actividad citotóxica y, de ese modo, aumenta la respuesta inmune contra la célula objetivo. La "porción del factor antipotencia" puede ser un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo funcional o un ligando que se une a una molécula dada, por ejemplo, un antígeno o un receptor, y de ese modo, resulta en un incremento del efecto de los determinantes de unión para el receptor de Fc o antígeno de la célula objetivo. La "porción del factor antipotencia" puede unirse a un receptor de Fc o un antígeno de la célula objetivo. Alternativamente, la porción del factor antipotencia puede unirse a una entidad que es diferente de la entidad a la que se unen las primeras y segundas uniones de especificidades de unión. Por ejemplo, la parte del factor antipotencia puede unirse a una célula T citotóxica (por ejemplo a través de CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 u otra célula inmune que resulta en una respuesta inmune aumentada contra la célula objetivo).

65 En una modalidad, las moléculas biespecíficas y multispecíficas de la enseñanza comprenden como una especificidad de unión al menos un anticuerpo, que incluye, por ejemplo, un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, o un Fv monocatenario. El anticuerpo también puede ser un dímero de la cadena ligera o la cadena pesada, o cualquier fragmento mínimo de este tal como un

Fv o una construcción de cadena simple como se describe en Ladner y otros, documento US 4,946,778. El anticuerpo puede ser, además, una proteína de fusión de inmunoglobulina con dominio de unión como se describe en los documentos núm. US2003/0118592 y US 2003/0133939.

5 En una modalidad las moléculas biespecíficas y multiespecíficas de la enseñanza comprenden una especificidad de unión por un R de Fc-gamma o un R de Fc-alfa presentes en la superficie de una célula efectora, y una segunda especificidad de unión por un antígeno de la célula objetivo, por ejemplo, GT468.

10 En una modalidad, la especificidad de unión por un receptor de Fc se proporciona mediante un anticuerpo monoclonal, cuya unión no está bloqueada por la inmunoglobulina G (IgG) humana. Como se usa en la presente descripción, el término "receptor de IgG" se refiere a cualquiera de los ocho genes de cadena gamma localizados en el cromosoma 1. Estos genes codifican un total de doce isoformas del receptor transmembrana o soluble, que se agrupan en tres clases del receptor de Fc-gamma: Fc-gammaRI (CD64), Fc-gammaRII (CD32), y Fc-gammaRIII (CD16). En una modalidad preferida, el receptor Fc-gamma es un FcγRI humano de alta afinidad.

15 La producción y caracterización de estos anticuerpos monoclonales preferidos se describen por Fanger y otros en los documentos WO 88/00052 y US 4,954,617. Estos anticuerpos se unen a un epítipo de Fc-gammaRI, Fc-gammaRII o Fc-gammaRIII en un sitio distinto del sitio de unión al Fcγ del receptor y, por lo tanto, su unión no se bloquea sustancialmente por los niveles fisiológicos de IgG. Anticuerpos anti-Fc-gammaRI específicos y útiles en esta enseñanza son AcM 22, AcM 32, AcM 44, AcM 62 y AcM 197. En otras modalidades, el anticuerpo anti-receptor de Fcγ es una forma humanizada del anticuerpo monoclonal 22 (H22). La producción y caracterización del anticuerpo H22 se describe en Graziano, R.F. y otros, (1995) J. Immunol. 155 (10): 4996-5002 y el documento WO 94/10332. La línea celular productora del anticuerpo H22 se depositó en la Colección Americana de Tipos de Cultivos el 4 de noviembre de 1992, bajo la designación HA022CL1 y tiene el núm. de acceso CRL 11177.

25 Aún en otras modalidades preferidas, la especificidad de unión por un receptor de Fc se proporciona por un anticuerpo que se une a un receptor de IgA humano, por ejemplo, un receptor de Fc-alfa (Fc-alfaRI (CD89)), cuya unión preferentemente, no se bloquea por la inmunoglobulina A (IgA) humana. El término "receptor de IgA" está destinado a incluir el producto génico de un gen alfa (Fc-alfaRI) situado en el cromosoma 19. Se conoce que este gen codifica varias isoformas transmembranales empalmadas alternativamente de 55 a 110 kDa. Fc-alfaRI (CD89) se expresa constitutivamente en monocitos/macrófagos, granulocitos eosinófilos y neutrófilos, pero no en poblaciones de células no efectoras. Fc-alfaRI tiene una afinidad media tanto por IgA1 como por IgA2, que se incrementa tras la exposición a citocinas tales como G-CSF o GM-CSF (Morton, H. C. y otros (1996) Critical Reviews in Immunology 16: 423-440). Se han descrito cuatro anticuerpos monoclonales específicos para Fc-alfaRI, identificados como A3, A59, A62 y A77, que se unen a Fc-alfaRI fuera del dominio de unión al ligando de IgA (Monteiro, R.C. y otros (1992) J. Immunol. 148:1764).

30 Fc-alfaRI y Fc-gammaRI son receptores desencadenantes preferidos para su uso en la enseñanza porque (1) se expresan principalmente en las células efectoras inmunitarias, por ejemplo, monocitos, PMN, macrófagos y células dendríticas; (2) se expresan a niveles elevados (por ejemplo, 5000-100 000 por célula); (3) son mediadores de las actividades citotóxicas (por ejemplo, ADCC, fagocitosis); y (4) median una potenciación de la presentación de antígenos, incluyendo los autoantígenos, dirigidos a ellos.

40 En otra modalidad, la molécula biespecífica está compuesta por dos anticuerpos monoclonales de acuerdo con la enseñanza, con actividades funcionales complementarias, tales como un anticuerpo que funciona predominantemente por medio de la inducción de CDC y el otro anticuerpo que funciona predominantemente por medio de la inducción de apoptosis.

50 Un "anticuerpo específico de células efectoras" como se usa en la presente se refiere a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo funcional que se une al receptor de Fc de las células efectoras. Los anticuerpos preferidos para usar en la presente enseñanza se unen al receptor de Fc de las células efectoras en un sitio al cual no se une una inmunoglobulina endógena.

55 Como se usa en la presente, el término "célula efectora" se refiere a una célula inmunitaria que está implicada en la fase efectora de una respuesta inmunitaria, a diferencias de las fases cognitivas y de activación de una respuesta inmunitaria. Las células inmunitarias ilustrativas incluyen células de origen mieloide o linfoide, por ejemplo, linfocitos (por ejemplo, células B y células T incluidas las células T citolíticas (CTL), células asesinas, células asesinas naturales, macrófagos, monocitos, eosinófilos, neutrófilos, células polimorfonucleares, granulocitos, mastocitos, y basófilos. Algunas células efectoras expresan receptores de Fc específicos y llevan a cabo funciones inmunitarias específicas. En modalidades preferidas, una célula efectora es capaz de inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), por ejemplo, un neutrófilo capaz de inducir ADCC. Por ejemplo, los monocitos, macrófagos, que expresan FcR están implicados en la destrucción específica de células objetivo y presentan antígenos a otros componentes del sistema inmunitario, o se unen a las células que presentan antígenos. En otras modalidades, una célula efectora puede fagocitar un antígeno objetivo, célula objetivo, o microorganismo. La expresión de un FcR en particular sobre una célula efectora puede regularse por factores humorales como las citocinas. Por ejemplo, se ha encontrado que la expresión de Fc-gammaRI está regulada positivamente por el interferón gamma (IFN-γ). Esta expresión aumentada incrementa la actividad citotóxica de las células

que portan Fc-gammaRI contra los objetivos. Una célula efectora puede fagocitar o lisar un antígeno objetivo o una célula objetivo.

5 "Célula objetivo" se refiere a cualquier célula indeseable en un sujeto (por ejemplo, un ser humano o animal) a la que puede dirigirse un anticuerpo de la enseñanza. En modalidades preferidas, la célula objetivo es una célula que expresa o sobreexpresa GT468 y/o que se caracteriza por la asociación de GT468 con su superficie celular. Las células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular típicamente incluyen células tumorales.

10 Las moléculas biespecíficas y multiespecíficas de la presente enseñanza pueden producirse mediante el uso de técnicas químicas (véase por ejemplo, D. M. Kranz y otros (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:5807), técnicas de "polidomas" (véase el documento US 4,474,893, de Reading), o técnicas de ADN recombinante.

15 En particular, las moléculas biespecíficas o multiespecíficas de la presente enseñanza se pueden preparar conjugando las especificidades de unión constituyentes, por ejemplo, las especificidades de unión anti-FcR y anti-GT468, usando métodos conocidos en la materia. Por ejemplo, cada especificidad de unión de la molécula biespecífica o multiespecífica puede generarse por separado y después conjugarse entre sí. Cuando las especificidades de unión son proteínas o péptidos, una variedad de agentes de acoplamiento o reticulación pueden usarse para la conjugación covalente. Los ejemplos de agentes de reticulación incluyen proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetilo-tioacetato (SATA), 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), o-fenilenodimaleimida (oPDM), N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), y sulfosuccinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC) (véase por ejemplo, Karpovsky y otros (1984) J. Exp. Med. 160:1686; Liu, MA y otros (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648). Otros métodos incluyen los descritos por Paulus (Behring Ins. Mitt. (1985) No. 78,118-132); Brennan y otros (Science (1985) 229:81-83, y Glennie y otros (J. Immunol. (1987) 139: 2367-2375). Los agentes de conjugación preferidos son SATA y sulfo-SMCC, disponibles de Pierce Chemical Co. (Rockford, Illinois).

30 Cuando las especificidades de unión son anticuerpos, ellos pueden conjugarse a través de enlaces sulfhidrilo del C-terminal de las regiones bisagra de las dos cadenas pesadas. En una modalidad particularmente preferida, la región bisagra se modifica para contener un número impar de residuos sulfhidrilo, preferentemente uno, antes de la conjugación.

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

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

55 II. Inmunoconjugados

En otro aspecto, la presente enseñanza caracteriza un anticuerpo anti-GT468 conjugado a un resto o agente terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o un radioisótopo. Los conjugados de este tipo se denominan en la presente como "inmunoconjugados". Los inmunoconjugados que incluyen una o más citotoxinas se refieren como "inmunotoxinas". Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para las células, y en particular las destruye. Los ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dehidrotosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina y sus análogos u homólogos.

65 Los agentes terapéuticos adecuados para formar inmunoconjugados de la enseñanza incluyen, pero sin limitarse a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-fluorouracilo

5 decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucil, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, y cis-diclorodiamina de platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)), y
 10 agentes anti-mitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina). En una modalidad preferida, el agente terapéutico es un agente citotóxico o un agente radiotóxico. En otra modalidad, el agente terapéutico es un inmunosupresor. Aún en otra modalidad, el agente terapéutico es GM-CSF. En una modalidad preferida, el agente terapéutico es doxorubicina, cisplatino, bleomicina, sulfato, carmustina, clorambucil, ciclofosfamida o ricina A.

15 Los anticuerpos de la presente enseñanza también pueden conjugarse a un radioisótopo, por ejemplo, yodo-131, itrio-90 o indio-111, para generar compuestos radiofarmacéuticos citotóxicos para el tratamiento de un trastorno relacionado con GT468, tal como un cáncer. Los conjugados de anticuerpos de la enseñanza pueden utilizarse para modificar una respuesta biológica dada, y no debe interpretarse que la porción del fármaco está limitado a los agentes terapéuticos
 20 químicos clásicos. Por ejemplo, la porción del fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa, o su fragmento activo, tales como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina diftérica; una proteína tales como factor de necrosis tumoral o interferón- γ ; o, modificadores de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfoquinas, interleuquina-1 ("IL-1"), interleuquina 2 ("IL-2"), interleuquina 6 ("IL-6"), factor de estimulación de colonias de macrófagos granulocitos ("GM-CSF"), factor de estimulación de colonias de granulocitos ("G-CSF"), u otros factores de crecimiento.

25 Las técnicas para la conjugación de tales porciones terapéuticas a los anticuerpos se conocen bien, véase, por ejemplo, Arnon y otros, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy," en Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld y otros (eds.), págs. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom y otros, "Antibodies For Drug Delivery," en Controlled Drug Delivery (2da Ed.), Robinson y otros (eds.), págs. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibodies Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera y otros, (eds.), págs. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy," en Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin y otros (eds.), págs. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe y otros, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62: 119-58 (1982).

30 En una modalidad adicional, los anticuerpos de acuerdo con la enseñanza se unen a un agente quelante enlazador, por ejemplo, tiuxetan, que permite que el anticuerpo se conjugue con un radioisótopo.

35 III. Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la presente enseñanza proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene uno o una combinación de anticuerpos de la presente enseñanza. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse con portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables, así como con cualquier otro de los adyuvantes y excipientes conocidos de acuerdo con las técnicas convencionales tales como las descritas en Remington: The Science and Practice of Pharmacy (19na Ed. Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1995). En una modalidad, las composiciones incluyen una combinación de múltiples (por ejemplo, dos o más) anticuerpos aislados de la enseñanza que actúan mediante diferentes mecanismos, por ejemplo, un anticuerpo que actúa predominantemente mediante la inducción de CDC en combinación con otro anticuerpo que predominantemente actúa mediante la inducción de apoptosis.

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

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

55 Aún en otra modalidad, tales agentes terapéuticos incluyen uno o más compuestos quimioterapéuticos, como los derivados de Taxol, taxotere, gemcitabina, 5-fluorouracilo, doxorubicina (Adriamycin), cisplatino (Platinol), ciclofosfamida (Cytosan, Procytox, Neosar). En otra modalidad, los anticuerpos de la presente enseñanza pueden administrarse en combinación con agentes quimioterapéuticos, que preferentemente muestran eficacia terapéutica en pacientes que padecen de cáncer de mama, pulmón, gástrico y/u ovario, u otros tipos de cáncer por ejemplo como se describe en la presente.

60 Aún en otra modalidad, los anticuerpos de la enseñanza pueden administrarse junto con radioterapia y/o trasplante de células madre periféricas autólogas o de médula ósea.

Aún en otra modalidad, los anticuerpos de la enseñanza pueden administrarse en combinación con uno o más anticuerpos seleccionados de anticuerpos anti-CD25, anticuerpos anti-EPCAM, anticuerpos anti-EGFR, anti-Her2/neu, y anti-CD40.

5 Aún en otra modalidad, los anticuerpos de la enseñanza pueden administrarse en combinación con un anticuerpo anti-C3b(i) para mejorar la activación del complemento.

10 Como se usa en la presente descripción, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos o que retardan la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el portador es adecuado para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, por inyección o infusión). En dependencia de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, anticuerpo, molécula biespecífica y multiespecífica, puede recubrirse en un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que puedan inactivar al compuesto.

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

20 Los ejemplos de tales sales incluyen sales por adición de ácidos y sales por adición de bases. Las sales por adición de ácidos incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como también a partir de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos mono- y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanóicos fenil sustituidos, ácidos hidroxil alcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos y similares. Las sales por adición de bases incluyen las derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como también de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaína y similares.

30 Una composición de la presente enseñanza se puede administrar mediante una variedad de métodos conocidos en la materia. Como se apreciará por el experto, la vía y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. Los anticuerpos activos pueden prepararse con portadores que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, que incluyen implantes, parches transdérmicos, y sistemas de suministro microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etileno y acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones se conocen generalmente por los expertos en la técnica. Ver, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

40 Para administrar un compuesto de la enseñanza por determinadas vías de administración puede ser necesario recubrir el compuesto, o coadministrar el compuesto con un material para evitar su inactivación. Por ejemplo, el compuesto puede administrarse a un sujeto en un portador adecuado, por ejemplo, liposomas, o un diluyente. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen la solución salina y soluciones tampón acuosas. Los liposomas incluyen emulsiones de agua en aceite en agua CGF, así como liposomas convencionales (Strejan y otros (1984) J. Neuroimmunol. 7: 27).

45 Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Exceptuando en la medida de lo posible que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de este en las composiciones farmacéuticas de la enseñanza. Compuestos activos suplementarios pueden incorporarse también en las composiciones.

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

60 Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse mediante la incorporación del compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente adecuado con un o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por la esterilización con microfiltración.

65

5 Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un portador estéril que contiene un medio de dispersión básico y otros ingredientes requeridos a partir de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación son secado al vacío y liofilización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución estéril previamente filtrada de éste.

10 Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, un único bolo puede administrarse, varias dosis divididas pueden administrarse en el tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente como se indica por las exigencias de la situación terapéutica.
15 Es especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación. La forma de dosificación unitaria como se usa en la presente descripción se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias de los sujetos que se tratan; cada unidad contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación de la enseñanza está dictada por, y es directamente dependiente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que debe alcanzarse, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de componer dicho compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

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

25 Para las composiciones terapéuticas, las formulaciones de la presente enseñanza incluyen las adecuadas para la administración oral, nasal, tópica (que incluye bucal y sublingual), rectal, vaginal y/o parenteral. Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en forma de dosis unitarias y se puede preparar por cualquiera de los métodos conocidos en la materia de farmacia. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material portador para producir una forma de dosificación única variará en dependencia del sujeto que se trata, y el modo particular de administración. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material portador para producir una forma de dosificación única, generalmente, será aquella cantidad del compuesto que produce un efecto terapéutico.

30 Generalmente, del cien por ciento, esta cantidad estará en el intervalo de aproximadamente 0.01 por ciento a aproximadamente noventa y nueve por ciento del ingrediente activo, preferentemente de aproximadamente 0.1 por ciento a aproximadamente 70 por ciento, con la máxima preferencia de aproximadamente 1 por ciento a aproximadamente 30 por ciento.

35 Las formulaciones de la presente enseñanza que son adecuadas para la administración vaginal incluyen además formulaciones de pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o aerosol que contienen tales portadores que se conocen en la materia como adecuados. Las formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica de las composiciones de esta enseñanza incluyen polvos, aerosoles, ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhalantes. El componente activo se puede mezclar en condiciones estériles con un portador farmacéuticamente aceptable, y con cualesquiera conservantes, tampones, o propelentes que se puedan requerir.

40 Las frases "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral" como se usan en la presente se refieren a modos de administración distintos a la administración enteral y tópica, usualmente por inyección, e incluyen, sin limitarse a, inyección intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intrasternal e infusión.

45 Los ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas de la enseñanza incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de estos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

50 Estas composiciones pueden contener además adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionante y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos puede asegurarse mediante procedimientos de esterilización y mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol ácido sórbico, y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio, y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede efectuarse por la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

5 En una modalidad los anticuerpos monoclonales de la enseñanza se administran en forma cristalina mediante inyección subcutánea, cf. Yang y otros (2003) PNAS, 100 (12): 6934-6939. Cuando los compuestos de la presente enseñanza se administran como productos farmacéuticos, a los seres humanos y animales, se pueden administrar solos o como una composición farmacéutica que contiene, por ejemplo, 0.01 a 99.5 % (con mayor preferencia, 0.1 a 90 %) del ingrediente activo en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.

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

15 Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente enseñanza pueden variarse para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea efectiva para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente en particular, composición, y modo de administración, sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente enseñanza empleadas, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto en particular que se emplea, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, la afección, a salud general y los antecedentes médicos anteriores del paciente a tratar, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

20 Un médico o veterinario de experiencia en la materia puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad efectiva de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario podría comenzar con dosis de los compuestos de la enseñanza empleados en la composición farmacéutica a niveles inferiores a los necesarios para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosis hasta lograr el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de una composición de la enseñanza será la cantidad del compuesto que es la menor dosis efectiva para producir un efecto terapéutico. Tal dosis efectiva dependerá generalmente de los factores descritos anteriormente. Es preferente que la administración sea intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea, preferentemente administrado proximal al sitio del objetivo. Si se desea, la dosis diaria efectiva de la composición terapéutica puede administrarse como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas separadas en intervalos apropiados a lo largo del día, opcionalmente, en formas de dosificación unitaria. Aunque es posible que un compuesto de la presente enseñanza se administre solo, se prefiere administrar el compuesto como una formulación farmacéutica (composición).

35 En una modalidad, los anticuerpos de la enseñanza pueden administrarse mediante infusión, preferentemente infusión continua lenta durante un periodo largo, tal como más de 24 horas, para reducir los efectos secundarios tóxicos. La administración también puede realizarse mediante infusión continua en un periodo de 2 a 24 horas, tal como de 2 a 12 horas. Dicho régimen puede repetirse una o más veces según sea necesario, por ejemplo, después de 6 meses o 12 meses. La dosificación puede determinarse o ajustarse midiendo la cantidad de anticuerpos monoclonales anti-GT468 circulantes tras la administración en una muestra biológica mediante el uso de anticuerpos antiidiotípicos que se dirigen a los anticuerpos anti-GT468.

Aún en otra modalidad, los anticuerpos se administran mediante terapia de mantenimiento, tal como, por ejemplo, una vez a la semana durante un periodo de 6 meses o más.

45 Todavía en otra modalidad, los anticuerpos de acuerdo con la enseñanza pueden administrarse mediante un régimen que incluye una infusión de un anticuerpo contra GT468 seguido de una infusión de un anticuerpo contra GT468 conjugado con un radioisótopo. El régimen puede repetirse, por ejemplo, de 7 a 9 días más tarde.

50 Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse con dispositivos médicos conocidos en la materia. Por ejemplo, en una modalidad preferida, una composición terapéutica de la enseñanza puede administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tales como los dispositivos descritos en los documentos núms. US 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824; o 4,596,556. Ejemplos de implantes y módulos bien conocidos y útiles en la presente enseñanza incluyen los descritos en los documentos núm.: US 4,487,603, que describe una bomba de microinfusión implantable para dispensar la medicación a una velocidad controlada; US 4,486,194, que describe un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; US 4,447,233, que describe una bomba de infusión de la medicación para entregar la medicación a una velocidad de infusión precisa; US 4,447,224, que describe un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración continua de un fármaco; US 4,439,196, que describe un sistema de suministro osmótico de un fármaco que tiene compartimentos de múltiples cámaras, y US 4,475,196, que describe un sistema de suministro osmótico de un fármaco.

60 Muchos otros implantes de este tipo, sistemas de suministro, y módulos, se conocen bien por aquellos con experiencia en la técnica. En ciertas modalidades, los anticuerpos de la enseñanza se pueden formular para asegurar una apropiada distribución in vivo. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BBB) excluye muchos compuestos altamente hidrófilos. Para garantizar que los compuestos terapéuticos de la enseñanza crucen la BBB (si se desea), pueden formularse, por ejemplo, en liposomas. Para los métodos de producción de liposomas, véase, por ejemplo, los documentos US 4,522,811; US 5,374,548 y US 5,399,331. Los liposomas pueden comprender una o más porciones que se transportan selectivamente

5 en las células u órganos específicos, mejorando así la administración de fármacos dirigidos (véase, por ejemplo, V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685). Las porciones de direccionamiento ilustrativas incluyen folato o biotina (ver, por ejemplo, el documento núm. US 5,416,016 otorgada a Low y otros); manósidos (Umezawa y otros, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); anticuerpos (P.G. Bloeman y otros (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais y otros (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); y receptor de proteína A surfactante (Briscoe y otros (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134).

10 En una modalidad de la enseñanza, los compuestos terapéuticos de la enseñanza se formulan en liposomas. En una modalidad de mayor preferencia, las liposomas incluyen una porción de direccionamiento. En una modalidad de mayor preferencia, los compuestos terapéuticos en las liposomas se suministran mediante inyección en bolo a un sitio proximal al área deseada, por ejemplo, el sitio de un tumor. La composición debe ser fluida hasta el punto que sea fácilmente inyectable. Debería ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y debería preservarse contra la acción de contaminación de los microorganismos, tales como bacterias y hongos.

15 En otra modalidad, los anticuerpos de la enseñanza pueden formularse para prevenir o reducir su transporte a través de la placenta. Esto puede hacerse mediante métodos conocidos en la materia, por ejemplo, mediante la PEGilación de los anticuerpos o por medio del uso de fragmentos F(ab)₂'. Otras referencias pueden ser "Cunningham-Rundles C, Zhuo Z, Griffith B, Keenan J. (1992) *Biological activities of polyethylene-glycol immunoglobulin conjugates. Resistance to enzymatic degradation.* *J. Immunol. Methods*, 152: 177-190; y "Landor M. (1995) *Maternal-fetal transfer of immunoglobulins*, *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 74: 279-283.

20 Una "dosificación con eficacia terapéutica" para la terapia tumoral puede medirse por las respuestas tumorales objetivo que pueden ser completas o parciales. Una respuesta completa (CR) se define como una evidencia no clínica, radiológica u otra evidencia de enfermedad. Una respuesta parcial (PR) es el resultado de una reducción en el tamaño del tumor agregado mayor del 50 %. La mediana del tiempo hasta la progresión es una medida que caracteriza la durabilidad de la respuesta tumoral objetivo.

30 Una "dosificación con eficacia terapéutica" para la terapia tumoral también puede medirse por su capacidad para estabilizar la progresión de la enfermedad. La capacidad de un compuesto para inhibir un cáncer puede evaluarse en un sistema de modelo animal predictivo de la eficacia en tumores humanos. Alternativamente, esta propiedad de una composición puede evaluarse examinando la capacidad del compuesto para inhibir el crecimiento celular o la apoptosis, mediante ensayos in vitro conocidos por los expertos en la técnica. Una cantidad con eficacia terapéutica de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño del tumor, o mejorar de cualquier otra manera los síntomas en un sujeto. Un experto en la técnica puede ser capaz de determinar tales cantidades basadas en factores de este tipo como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto y la composición particular o la vía de administración seleccionada.

40 La composición debe ser estéril y fluida al grado que la composición pueda administrarse mediante jeringa. Además del agua, el portador puede ser una solución salina tamponada isotónica, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), y mezclas adecuadas de éstos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por medio del uso de surfactantes. En muchos casos, se prefiere incluir agentes isotónicos en la composición, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol o sorbitol, y cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede producirse incluyendo en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo, monoestearato aluminico o gelatina.

45 Cuando el compuesto activo se protege adecuadamente, como se describió anteriormente, el compuesto puede administrarse oralmente, por ejemplo, con un diluyente inerte o un portador comestible asimilable.

50 IV. Usos y métodos de la enseñanza

Los anticuerpos de la presente enseñanza (que incluyen inmunocombinados, moléculas biespecíficas/multiespecíficas, composiciones y otros derivados descritos en la presente) tienen numerosas utilidades terapéuticas que implican el tratamiento de trastornos que implican células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular. Por ejemplo, los anticuerpos pueden administrarse a las células en cultivo, por ejemplo, in vitro o ex vivo, o a los sujetos humanos, por ejemplo, in vivo, para tratar o prevenir una variedad de trastornos como los descritos en la presente. Como se usa en la presente, el término "sujeto" está destinado a incluir animales humanos y no humanos que responden a los anticuerpos contra GT468. Los sujetos preferidos incluyen pacientes humanos con trastornos que pueden corregirse o aliviarse por la destrucción de las células patológicas, en particular las células caracterizadas por un patrón alterado de la expresión de GT468 y/o un patrón alterado de la asociación de GT468 con su superficie celular en comparación con las células normales.

65 Por ejemplo, en una modalidad, los anticuerpos de la presente enseñanza pueden usarse para tratar un sujeto con un trastorno tumorigénico, por ejemplo, un trastorno caracterizado por la presencia de células tumorales que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular, que incluye, por ejemplo, cáncer de mama. Los ejemplos de enfermedades tumorigénicas que pueden ser tratadas y/o prevenidas incluyen todos los cánceres y entidades tumorales que expresan GT468, e incluyen cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de

5 ovario, cáncer hepatocelular, cáncer de colon, cáncer pancreático, cáncer de esófago, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, en particular, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, cáncer de hígado, melanoma, sarcoma, mieloma, neuroblastoma, coriocarcinoma placentario, cáncer de cuello uterino y cáncer de tiroides, y las formas metastásicas de estos. Estos cánceres pueden estar en etapas temprana, intermedia o avanzada, por ejemplo metástasis. En una

Las composiciones farmacéuticas y los métodos de tratamiento descritos de acuerdo con la enseñanza también pueden usarse para la inmunización o vacunación para prevenir una enfermedad descrita en la presente descripción.

10 En otra modalidad, los anticuerpos de la enseñanza puede usarse para detectar los niveles de GT468 o formas particulares de GT468, o los niveles de células que contienen GT468 en su superficie de membrana, después dichos niveles pueden relacionarse a determinadas enfermedades o síntomas de enfermedades como se describió anteriormente. Alternativamente, los anticuerpos pueden usarse para agotar o interactuar con la función de las células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular, lo que implica por

15 tanto a estas células como importantes mediadores de la enfermedad. Esto puede lograrse poniendo en contacto una muestra y una muestra control con un anticuerpo anti-GT468 en condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo y GT468. Cualquiera de los complejos formados entre el anticuerpo y GT468 se detecta y se compara en la muestra y en la muestra control, es decir, una muestra de referencia.

20 Los anticuerpos de la enseñanza pueden analizarse inicialmente para determinar su actividad de unión asociada con los usos terapéuticos o diagnósticos in vitro. Por ejemplo, los anticuerpos pueden analizarse mediante el uso de ensayos de citometría de flujo como se describe en la presente.

25 Además, puede analizarse la actividad de los anticuerpos en el desencadenamiento de al menos una actividad de células efectoras mediada por un efector, que incluye la inhibición del crecimiento y/o la destrucción de células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular. Por ejemplo, puede analizarse la capacidad de los anticuerpos para activar la CDC y/o la apoptosis. Los protocolos para analizar la CDC, la adhesión homotípica, el agrupamiento molecular o la apoptosis se describen en la presente.

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

35 una célula que expresa GT468 y/o que se caracteriza por la asociación de GT468 con su superficie celular en presencia del complemento; mediar la apoptosis de una célula que expresa GT468 y/o que se caracteriza por la asociación de GT468 con su superficie celular; inducir la adhesión homotípica; y/o inducir la translocación en balsas de lípidos tras la unión a GT468.

40 En una modalidad particular, los anticuerpos se usan in vivo o in vitro para tratar, prevenir o diagnosticar una variedad de enfermedades relacionadas con GT468. Los ejemplos de enfermedades relacionadas con GT468 incluyen, entre otras, cánceres tales como cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de ovario, cáncer hepatocelular, cáncer de colon, cáncer pancreático, cáncer de esófago, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, en particular, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, cáncer de hígado, melanoma, sarcoma, mieloma, neuroblastoma, coriocarcinoma placentario, cáncer de cuello uterino y cáncer de tiroides, y las formas metastásicas de estos. En una modalidad, la

45 enfermedad cancerosa es cáncer metastásico en el pulmón.

Las rutas adecuadas para administrar las composiciones de anticuerpos de la enseñanza in vivo e in vitro se conocen bien en la materia y pueden seleccionarse por los expertos en la técnica.

50 Como se describió anteriormente, los anticuerpos anti-GT468 de la enseñanza pueden coadministrarse con uno u otros agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, un agente citotóxico, un agente radiotóxico, un agente antiangiogénico y/o un agente inmunosupresor para reducir la inducción de respuestas inmunitarias contra los anticuerpos de enseñanza. El anticuerpo puede unirse al agente (como un inmunocomplejo) o puede administrarse separado del agente. En este último caso (administración separada), el anticuerpo puede administrarse antes, después o simultáneamente con el agente o puede coadministrarse con otras terapias conocidas, por ejemplo, una terapia anticancerosa, por ejemplo, radiación. Dichos agentes terapéuticos incluyen, entre otros, agentes antineoplásicos tales como los mencionados anteriormente. La coadministración de los anticuerpos anti-GT468 de la presente enseñanza con agentes quimioterapéuticos proporciona

55 dos agentes contra el cáncer que funcionan por medio de diferentes mecanismos produciendo un efecto citotóxico a las células tumorales. Tal coadministración puede resolver los problemas debido al desarrollo de resistencia a fármacos o un cambio en la antigenicidad de las células tumorales que las harían no reactivas con el anticuerpo.

60 En otra modalidad particular de la enseñanza, el sujeto que se administra con el anticuerpo se trata adicionalmente con un agente antiangiogénico que incluye anticuerpos dirigidos al VEGF o VEGFR y uno o más compuestos químicos que inhiben la angiogénesis. El pretratamiento con estos fármacos o la aplicación paralela de estos puede mejorar la penetración de los anticuerpos en tumores de volumen. En otra modalidad particular de la enseñanza, el sujeto que se

administra con el anticuerpo se trata adicionalmente con un compuesto que inhibe la señalización del receptor del factor de crecimiento incluidos los anticuerpos monoclonales que se unen al receptor EGFR así como compuestos químicos que inhiben la señalización iniciada por el EGFR, el receptor Her1 o Her2/neu.

5 Las células efectoras específicas del objetivo, por ejemplo, las células efectoras relacionadas con las composiciones (por ejemplo anticuerpos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la enseñanza pueden usarse, además, como agentes terapéuticos. Las células efectoras a dirigir pueden ser leucocitos humanos tales como macrófagos, neutrófilos o monocitos. Otras células incluyen eosinófilos, células asesinas naturales y otras células portadoras del receptor de IgG o IgA. Si se desea, las células efectoras pueden obtenerse del sujeto que va a tratarse. Las células efectoras específicas del objetivo pueden administrarse como una suspensión de células en una solución fisiológicamente aceptable. La cantidad de células administradas puede estar en el orden de 10^8 a 10^9 pero variará en dependencia del propósito terapéutico. En general, la cantidad será suficiente para obtener la localización en la célula objetivo, por ejemplo, una célula tumoral que expresa GT468 y/o que se caracteriza por la asociación de GT468 a su superficie celular, y para lograr la destrucción de las células, por ejemplo, mediante fagocitosis. Las vías de administración también pueden variar.

15 La terapia con células efectoras específicas del objetivo pueden realizarse junto con otras técnicas para la eliminación de las células objetivo. Por ejemplo, la terapia antitumoral que usa las composiciones de la enseñanza y/o las células efectoras armadas con estas composiciones puede usarse junto con la quimioterapia. Adicionalmente, la inmunoterapia de combinación puede usarse para dirigir a dos poblaciones distintas de efectores citotóxicos hacia el rechazo de las células tumorales. Por ejemplo, los anticuerpos anti-GT468 unidos a anti-Fc-RI o anti-CD3 pueden usarse junto con agentes de unión específicos para los receptores de IgG o IgA.

20 Las moléculas biespecíficas y multiespecíficas de la enseñanza pueden usarse, además, para modular los niveles de Fc-gammaR o Fc-alfaR en las células efectoras, tal como mediante adición de caperuza y la eliminación de receptores en la superficie celular. Las mezclas de receptores anti-Fc también pueden usarse para este propósito.

25 Las composiciones (por ejemplo, anticuerpos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas e inmunoconjugados) de la enseñanza que tienen sitios de unión al complemento, tales como porciones de IgG1, 2, o 3 o IgM que se unen al complemento, también pueden usarse en presencia del complemento. En una modalidad, el tratamiento ex vivo de una población de células que comprende células objetivo con un agente de unión de la enseñanza y células efectoras adecuadas puede suplementarse por la adición de complemento o suero que contiene complemento. La fagocitosis de las células objetivo recubiertas con un agente aglutinante de la enseñanza puede mejorarse mediante la unión de proteínas del complemento. En otra modalidad las células objetivo recubiertas con las composiciones de la enseñanza también pueden ser lisadas por el complemento. Aún en otra modalidad, las composiciones de la enseñanza no activan el complemento.

30 Las composiciones de la enseñanza también pueden administrarse junto con el complemento. En consecuencia, dentro del alcance de la enseñanza están las composiciones que comprenden anticuerpos, moléculas multiespecíficas o biespecíficas y suero o complemento. Estas composiciones son ventajosas en el hecho de que el complemento está en estrecha proximidad a los anticuerpos, moléculas multiespecíficas o biespecíficas.

35 Alternativamente, los anticuerpos, moléculas multiespecíficas o biespecíficas de la enseñanza y el complemento o suero pueden administrarse separadamente. La unión de las composiciones de la presente enseñanza a las células objetivo pueden provocar la translocación del complejo del antígeno GT468 y el anticuerpo en las balsas de lípidos de la membrana celular. Dicha translocación crea una alta densidad de complejos antígeno-anticuerpo que pueden activan eficientemente y/o mejorar la CDC.

40 Además dentro del alcance de la presente enseñanza están los kits que comprenden las composiciones de anticuerpos de la enseñanza (por ejemplo, anticuerpos e inmunoconjugados) e instrucciones para su uso. El kit puede contener además uno o más reactivos adicionales, tales como un reactivo inmunosupresor, un agente citotóxico o un agente radiotóxico, o uno o más anticuerpos adicionales de la enseñanza (por ejemplo, un anticuerpo que tiene una actividad complementaria).

45 En consecuencia, los pacientes tratados con composiciones de anticuerpos de la enseñanza pueden ser administrados adicionalmente (antes, simultáneamente, o después de la administración de un anticuerpo de la enseñanza) con otro agente terapéutico, tal como un agente citotóxico o radiotóxico, que potencia o aumenta el efecto terapéutico de los anticuerpos de la enseñanza.

50 En otras modalidades, el sujeto puede tratarse adicionalmente con un agente que modula, por ejemplo, aumenta o inhibe la expresión o actividad de los receptores de Fc-gamma o de Fc-alfa, por ejemplo, tratando al sujeto con una citocina. Las citocinas preferidas incluyen el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), interferón- γ (IFN- γ) y el factor de necrosis tumoral (TNF). Otros agentes importantes para aumentar la eficacia terapéutica de los anticuerpos y las composiciones farmacéuticas descritas en la presente son los β -glucanos que son homopolisacáridos de residuos de glucosa ramificados y que son producidos por una variedad de plantas y microorganismos, por ejemplo, bacterias, algas, hongos, levadura y granos. Los fragmentos de β -glucanos producidos por los organismos también pueden usarse. Preferentemente, el β -glucano es un polímero de

$\beta(1,3)$ glucosa en donde al menos algunas de las unidades de glucosa de la cadena principal, por ejemplo 3-6 % de las unidades de glucosa de la cadena principal, poseen ramificaciones tales como ramificaciones $\beta(1,6)$.

5 En una modalidad particular, la enseñanza proporciona métodos para detectar la presencia del antígeno GT468 en una muestra, o medir la cantidad de antígeno GT468, que comprende poner en contacto la muestra, y una muestra de control, con un anticuerpo que se une específicamente a GT468, en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo o partes de este y GT468. Después se detecta la formación de un complejo, en donde una diferencia de la formación de complejos de la muestra en comparación con la muestra de control es indicativo de la presencia del antígeno GT468 en la muestra.

10 Aún en otra modalidad, la enseñanza proporciona un método para detectar la presencia o cuantificar la cantidad de células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular in vivo o in vitro. El método comprende (i) administrar a un sujeto una composición de la enseñanza conjugada a un marcador detectable; y (ii) exponer el sujeto a un medio para detectar dicho marcador detectable para identificar áreas que contienen células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular.

15 Los métodos como se describen anteriormente son útiles, en particular, para diagnosticar enfermedades relacionadas con GT468 y/o la localización de enfermedades relacionadas con GT468 tales como enfermedades cancerosas. Preferentemente una cantidad de GT468 en una muestra que es mayor que la cantidad de GT468 en una muestra de control es indicativo de la presencia de una enfermedad relacionada con GT468 en un sujeto, en particular un ser humano, a partir del cual se deriva la muestra.

20 Cuando se usa en los métodos como se describieron anteriormente, un anticuerpo descrito en la presente puede proporcionarse con un marcador que funciona para: (i) proporcionar una señal detectable; (ii) interactuar con un segundo marcador para modificar la señal detectable proporcionada por el primero o el segundo marcador, por ejemplo. FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia); (iii) afectar la movilidad, por ejemplo, la movilidad electroforética, mediante carga, hidrofobicidad, forma, u otros parámetros físicos; o (iv) proporcionar un residuo de captura, por ejemplo, de afinidad, anticuerpo/antígeno, o formación de complejos iónicos. Adecuados como marcadores son estructuras, tales como marcadores fluorescentes, marcadores luminiscentes, marcadores cromóforos, marcadores radioisotópicos, marcadores isotópicos, preferentemente marcadores isotópicos estables, marcadores isobáricos, marcadores enzimáticos, marcadores de partículas, en particular marcadores de partículas metálicas, marcadores de partículas magnéticas, marcadores de partículas poliméricas, moléculas orgánicas pequeñas como la biotina, ligandos de receptores o de moléculas de enlazamiento tales como proteínas de adhesión celular o lecitinas, secuencias de marcadores que comprenden ácidos nucleicos y/o residuos de aminoácidos que pueden detectarse mediante el uso de agentes de enlazamiento, etcétera. Los marcadores comprenden, de manera no limitante, sulfato de bario, ácido iocetámico, ácido iopanoico, ipodato de calcio, diatrizoato de sodio, diatrizoato de meglumina, tiropanoato de sodio y radiodiagnóstico, que incluyen los emisores de positrones tales como flúor 18 y carbono 11, emisores gamma tales como el yodo 123, tecnecio 99m, yodo 131 e indio 111, nucleídos para resonancia magnética nuclear, tales como flúor y gadolinio.

30 Aún en otra modalidad, los inmunoconjugados de la enseñanza pueden usarse para dirigir los compuestos (por ejemplo, agentes terapéuticos, marcadores, citotoxinas, radiotoxinas inmunosupresores, etcétera) a las células que tienen GT468 asociado a su superficie celular enlazando tales compuestos al anticuerpo. Por lo tanto, la enseñanza proporciona, además, métodos para localizar ex vivo o in vitro las células que expresan GT468 y/o que se caracterizan por la asociación de GT468 con su superficie celular, tal como las células tumorales circulantes.

La presente enseñanza se ilustra además mediante los siguientes ejemplos.

50 EJEMPLOS

Ejemplo 1: Materiales y métodos

Las técnicas y métodos mencionados en la presente descripción se han llevado a cabo de una manera conocida per se y se describen, por ejemplo, en Sambrook y otros, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2da edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., o como se describe más adelante. Todos los métodos que incluyen el uso de kits y reactivos se llevan a cabo de acuerdo con la información del fabricante.

Tejidos y líneas celulares

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

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

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

Bioinformática

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

Se accedió a los archivos de las secuencias de nucleótidos de la búsqueda por palabras clave en el GenBank para determinar los genes con la anotación de expresarse específicamente en tejido de placenta o trofoblastos mediante el uso del Sistema de Búsqueda y Recuperación ENTREZ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>). El programa de búsqueda de la homología de secuencia BLASTN (<http://ncbi.nlm.nih.gov/blast>) se ejecutó secuencialmente para cada secuencia de nucleótidos contra todas las secuencias de nucleótidos humanas para evitar redundancias. Como segundo filtro se realizó un Northern electrónico (eNorthern) para todos los clones obtenidos de la búsqueda por palabras clave mediante búsqueda de BLAST de cada una de las secuencias de ADN de interés contra la base de datos EST en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Se tuvo en consideración que numerosas genotecas de ADNc en el dominio público no se anotan apropiadamente (Scheurle, D., DeYoung, M. P., Binninger, D. M., Page, H., Jahanzeb, M. y Narayanan, R. (2000) *Cancer Res.* 60, 4037-4043).

Para la sustracción digital se usó la herramienta ADNc xProfiler del Proyecto de Anatomía y Genoma del Cáncer en el NCBI (<http://cgap.nci.nih.gov/Tissues/xProfiler>), que compara la expresión génica entre dos mezclas (A y B) de genotecas de ADNc donde cada mezcla puede ser una única genoteca o numerosas genotecas. Las opciones de búsqueda para la Mezcla A y la Mezcla B se configuraron para "Homo sapiens" para el Organismo y "todas las genotecas EST" para el Grupo de Genotecas para buscar todas las genotecas de ADNc en dbEST. Todas las genotecas de ADNc preparadas a partir del tejido de placenta y trofoblastos que coincidían con la configuración de las opciones de búsqueda se asignaron a la Mezcla A excluyendo las genotecas de tejidos mezclados. Para la Mezcla B se seleccionaron todas las genotecas de ADNc preparadas a partir de tejidos normales excepto placenta, trofoblasto, testículos, ovario y el cuerpo completo de los fetos.

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

Antisuero, inmunofluorescencia e inmunoquímica

El antisuero policlonal levantado contra los aa 117-127 de GT468 fue generado por un servicio de anticuerpos especialmente diseñados (Squarix, Marl, Alemania). La inmunohistoquímica se realizó en criosecciones de tejido con el uso del kit de Sustrato VECTOR NovaRED (Vector, Burlingame, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para el análisis por transferencia Western se usaron 30 μ g de proteínas totales extraídas de las células lisadas con Triton-X. Los extractos se diluyeron en tampón reductor de muestra (Roth, Karlsruhe, Alemania), se sometieron a SDS-PAGE y posteriormente se electrotransferieron a membrana de PVDF (Pall, East Hills, NY). La inmunotinción se realizó con anticuerpos reactivos para pAKT (Cell Signaling, Danvers, MA), AKT (Cell Signaling, Danvers, MA), ciclina D1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) y beta-actina (Abcam, Cambridge, UK) seguido por la detección del anticuerpo primario con anticuerpos secundarios de cabra anti-ratón y de cabra anti-conejo conjugados con peroxidasa de rábano picante (Dako, Glostrup, Dinamarca).

Dúplex de siRNA

El dúplex de siRNA para GT468 (Qiagen, Hilden, Alemania) (sentido 5'-r(CCA UGA GAG UAG CCA GCA)dTdT-3', antisentido 5'-r(UUG CUG GCU ACU CUC AUG G)dAdG-3') se dirigió a los nucleótidos 670-690 de la secuencia de ARNm de GT468 (NM_021796.3). Como control se usó un dúplex de siRNA desordenado (sentido 5'-r(UAA CUG UAU AAU CGA CUA G)dTdT-5', antisentido 5'-r(CUA GUC GAU UAU ACA GUU A)dGdA-3'). Para los estudios de silenciamiento de GT468 las células se transfectaron con dúplex de siRNA 10 nM mediante el uso del reactivo de transfección HiPerFect

(Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Todos los resultados se reprodujeron con un segundo conjunto de dúplex de siRNA de GT468 (sentido 5'-r(GGU UCA GGA CAA AGU CCA A)dTdT-3', antisentido 5'-r(UUG GAC UUU GUC CUG AAC C)dGdG-3') dirigidos a los nucleótidos 342-362.

5 Análisis de proliferación celular después de la transfección de siRNA

Después de 24 horas de la transfección con los dúplex de siRNA, se cultivaron 1×10^4 células durante 48 horas en un medio suplementado con FCS al 10 %. La proliferación se analizó mediante la medición de la incorporación de BrdU en las hebras de ADN recién sintetizadas mediante el uso del kit de proliferación celular DELFIA (Perkin Elmer) de acuerdo con las instrucciones del fabricante en un contador de múltiples marcadores Wallac Victor² (Perkin Elmer, Boston, Estados Unidos).

Análisis del ciclo celular

15 Las células se cultivaron en medio suplementado con FCS al 10 % en concentraciones variables. 72 horas después de la transfección con los dúplex de siRNA las células se cosecharon, se fijaron con EtOH y se tiñeron con yoduro de propidio antes del análisis del contenido de ADN por citometría de flujo. Las células en las diferentes fases del ciclo celular se cuantificaron mediante el uso de los programas informáticos de análisis de citometría de flujo CellQuest™ Pro (BD, Franklin Lakes, NJ) y FlowJo™ (Tree Star, Ashland, OR). Las células apoptóticas se cuantificaron mediante la tinción de anexina V 48 horas y 72 horas después de la transfección del siRNA.

Ensayo de migración celular e invasión in vitro

25 Los ensayos de migración celular se realizaron en cámaras Transwell con membranas porosas de 8,0 μm (BD Biosciences) con células cultivadas en un medio sin suero durante 12 horas antes de los experimentos. Para los experimentos de siRNA, las células se transfirieron a condiciones sin suero 24 horas después de la transfección con duplas de siRNA como se describió anteriormente. Se añadieron 4×10^4 células en 400 μl de un medio de cultivo sin suero en la cámara superior. Las cámaras inferiores contenían 800 μl de medio de cultivo suplementado con FCS al 5 % como quimioatrayente. Después de 24 horas, las células que habían migrado a la parte inferior de la membrana se fijaron en metanol frío; las membranas se escindieron, se colocaron en láminas portaobjetos de microscopio y se montaron con Hoechst (Dako, Glostrup, Dinamarca) para microscopía de fluorescencia. Se contaron las células en cinco campos visuales aleatorios (aumento 100x) para cada membrana. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Se analizaron los efectos de la quimioquinesis de las células mediante el uso de la misma configuración experimental con adición de un quimioatrayente tanto a la cámara superior como a la inferior. Para los ensayos de invasión in vitro las cámaras superiores se prepararon con 100 μl de Matrigel (BD Biosciences, San Jose, NJ) diluido a 1 mg/ml en medio libre de suero. Las cámaras se incubaron a 37°C durante 5 horas para la gelificación.

Análisis de proliferación celular después de la incubación con anticuerpos

40 Las líneas de células cancerosas que expresan GT468 endógenamente BT-549, Caov-3, EFO-21, MCF-7, y MDA-MB-231 se incubaron con sobrenadante de hibridoma diluido 1:2 en medio DMEM para el cultivo de células durante 72 horas. Se analizó la proliferación mediante la medición de la incorporación de BrdU en las hebras de ADN acabadas de sintetizar mediante el uso del kit de proliferación celular DELFIA (Perkin Elmer) de acuerdo con las instrucciones del fabricante en un contador de múltiples marcadores Wallac Victor² (Perkin Elmer).

45 Alternativamente, las líneas de células cancerosas que expresan GT468 endógenamente SK-BR-3 y MCF-7, respectivamente, se incubaron con sobrenadantes de hibridomas purificados por HPLC diluidos en medio DMEM para el cultivo de células durante 72 horas o 120 horas a concentraciones según se indica. La proliferación se analizó como se describió anteriormente.

50 Alternativamente, las líneas de células cancerosas que expresan GT468 endógenamente SK-BR-3, MCF-7, MDA-MB-468, y la línea celular de melanoma MelHo negativa para GT468 como control se incubaron con sobrenadantes de hibridomas purificados por FPLC (10 $\mu\text{g/ml}$ y 50 $\mu\text{g/ml}$) diluidos en los medios DMEM (SK-BR-3, MCF-7, MDA-MB-468) o RPMI (MelHo) para el cultivo de células durante 72 horas. Se analizó la proliferación mediante la medición de la incorporación de BrdU en las hebras de ADN acabadas de sintetizar mediante el uso del kit de proliferación celular DELFIA (Perkin Elmer) de acuerdo con las instrucciones del fabricante en un contador de múltiples marcadores Wallac Victor² (Perkin Elmer).

Microscopía de inmunofluorescencia

60 Para demostrar la presencia de anticuerpos anti-GT468 en el suero de ratones inmunizados o la unión de los anticuerpos monoclonales a las células vivas que expresan GT468, se usó análisis por microscopía de inmunofluorescencia. Las células CHO transfectadas con GT468-eGFP se cultivaron en portaobjetos de cámaras en condiciones de cultivo estándar en medio DMEM/F12, suplementado con suero fetal bovino (FCS) al 10 %, L-glutamina 2 mM, penicilina 100 IU/ml y estreptomina 100 $\mu\text{g/ml}$. Después las células se fijaron con metanol o paraformaldehído/saponina al 0.1 %. Las células

ES 2 696 518 T3

se incubaron con anticuerpos contra GT468 durante 60 min. a 25 °C. Después del lavado, las células se incubaron con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón marcado con Alexa555 (Molecular Probes) en las mismas condiciones.

ELISA específico para el péptido GT468

5 Las placas MaxiSorp o Microwell (Nunc) se recubrieron durante una hora a 37 °C con el péptido GT468 relevante (5 o 10 µg/ml). El bloqueo se realizó con PBS 3 % BSA durante la noche a 4 °C. Después del lavado con PBS, las placas se cargaron con sobrenadantes de hibridomas (diluido 1:5 o 1:10 en PBS/3 % BSA o diluido 1:2 en 2 x PBS/6 % BSA, pH 7.3) o anticuerpo purificado (diluido 1 µg/ml en PBS/3 % BSA, pH 7.3) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente (agitación orbital a 90 rpm). El anticuerpo secundario (anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con HRPO, subclases 1+2a+2b+3, Jackson ImmunoResearch) en PBS 3 % BSA, pH 7.3 se añadió después del lavado con PBS, y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación orbital a 90 rpm. Después de una etapa final de lavado con PBS, se añadió la solución del sustrato que consistió en ABTS 1 mM o 1.5 mM en acetato de sodio 100 mM (pH 5.2). Inmediatamente antes del uso, la solución del sustrato se suplementó con 0.3 µl por ml de H₂O₂ al 30 %. La absorción a 10 405 nm se midió en un lector de placas Tecan Safire (Tecan) después de 30-60 min.

Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos contra GT468

20 Se aislaron esplenocitos de ratón a partir de animales que se habían inmunizado previamente con diferentes protocolos de inmunización como se describe más adelante y fusionados con PEG a una línea celular de mieloma de ratón en base a protocolos estándar. Los hibridomas resultantes se seleccionaron después en cuanto a la producción de inmunoglobulinas con especificidad para GT468 mediante el uso de ELISA específico para el péptido, CrELISA para GT468 y células CHO transfectadas con GT468-eGFP mediante IF.

25 Las suspensiones de células individuales de linfocitos esplénicos a partir de los ratones inmunizados se fusionaron con células de mieloma de ratón no secretoras P3X63Ag8U.1 (ATCC, CRL 1597) (o células de mieloma de ratón P3X63Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) en el caso de 56-4A-2, 62-9B-1 y 63-1A-2) en una relación 2:1 mediante el uso de PEG al 50 % (Roche Diagnostics, CRL 738641). Las células se sembraron a aproximadamente 3 x 10⁴/pocillo en placas de microtitulación de fondo plano, seguido por aproximadamente dos semanas de incubación en medio selectivo que contenía, por ejemplo, suero fetal bovino al 10 %, fusión de hibridomas 2 % y suplemento de clonación (HFCS, Roche Diagnostics, CRL 1 363 735) más HEPES 10 mM, 2-mercaptoetanol 0.055 mM, gentamicina 50 µg/ml y HAT 1x (Sigma, CRL H0262). Después de 10 a 14 días, los pocillos individuales se tamizaron por ELISA específico para el péptido para anticuerpos monoclonales anti-GT468. Los hibridomas secretores de anticuerpos se volvieron a sembrar, se tamizaron de nuevo y, si todavía eran positivos para los anticuerpos monoclonales anti-GT468, se clonaron mediante limitación de 30 la dilución. Los subclones estables se cultivaron después in vitro para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en un medio de cultivo tisular para su caracterización. Se seleccionó al menos un clon de cada hibridoma que retuvo la reactividad de las células parentales (por citometría ELISA e IF).

Purificación de anticuerpos monoclonales a partir de los sobrenadantes de hibridomas

40 El anticuerpo se preparó a partir de los sobrenadantes de hibridomas mediante la realización de una cromatografía de afinidad de una sola etapa con el uso de HiTrap™ MabSelect SuRe™. Después de la elución con citrato 100 mM, pH 3.0 - pH 4.0 en dependencia del isotipo del anticuerpo, las fracciones recolectadas se neutralizaron inmediatamente con Tris 1 M, pH 8.0. Para experimentos adicionales las preparaciones de anticuerpo se dializaron dos veces contra 5 L de PBS, filtrado de manera estéril (0.2 µm) y almacenado a 4 °C.

Isotipado

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

Procedimiento de crELISA mediante el uso de lisados crudos de bacterianos que expresan GT468

• Preparación del antígeno

55 Las bacterias E. coli XL0LR se transformaron ya sea con plásmido GT468 pQE o sin inserción de pQE (se referirá como "referencia") y se cultivaron en medio LB hasta A600 nm ~0,35 E. La expresión de proteínas se indujo con IPTG 2 mM, y las células se dejaron crecer durante otras 4 horas a 37 °C. La inducción adecuada de la expresión de proteínas y su cinética se monitorearon mediante análisis en gel de Coomassie. Las bacterias se centrifugaron y resuspendieron en un pequeño volumen de PBS pH 7.2 que contenía inhibidor de proteasa 0.2 mM AEBSF-hidrocloruro (AppliChem). Las células se colocaron en hielo y rompieron mediante sonicación (Branson Sonic Power A Smithkline). Los lisados de GT468 y referencia se diluyeron hasta una concentración de proteínas totales de 2 mg/ml en PBS que contenía AEBSF 0.2 mM y glicerol al 20 % (v/v). Las alícuotas se congelaron rápidamente en nitrógeno y se almacenaron a -70 °C hasta su uso.

65 • Conducción del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas

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

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

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

20 Análisis de citometría de flujo

Las células HEK293 transfectadas con un plásmido pcDNA3.1 para GT468 o sin inserción del plásmido (simulado) se cosecharon, fijaron con metanol frío, y se bloquearon con PBS/FCS al 10 % durante 30 min. Las células se incubaron con sobrenadante de hibridoma durante 1 hora, se lavaron dos veces con PBS/1 FCS durante 10 min, y se incubaron con un anticuerpo secundario de cabra anti- Cy3 de ratón (Jackson ImmunoResearch Laboratories).

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

Ensayo clonogénico

35 El ensayo clonogénico o ensayo de formación de colonias es un ensayo de supervivencia de células *in vitro* para analizar la capacidad de una célula individual de crecer en una colonia. Este ensayo se realizó para determinar la efectividad de los anticuerpos contra GT468 sobre la capacidad para producir colonias. Las células SK-BR-3 que expresan GT468 se sembraron en placas de 48 pocillos (2000 células/pocillo). Las células se dejaron crecer durante 2 semanas en presencia de anticuerpos purificados por FPLC a partir de los sobrenadantes de hibridomas (45 µg/ml), todos los ensayos se realizaron por triplicado. Las colonias se fijaron y tiñeron con glutaraldehído al 6 % (vol/vol) y cristal violeta al 0.5 % (peso/vol). Se tomaron imágenes de las placas teñidas y secas mediante el uso de una cámara compacta digital Olympus (C-750 Ultra Zoom) y se analizaron visualmente.

45 Transferencias Western

Los lisados celulares completos de las células HEK293 transfectadas con plásmido pcDNA3.1 para GT468 o sin inserción del plásmido (simulado) se prepararon mediante el uso de tampón de lisis basado en Triton-X (HEPES 50 mM (pH 7,4), 10 % (v/v) glicerol, Triton X-100 al 1 % (v/v), NaCl 150 mM, MgCl₂ al 1,5 mM, EDTA 5 mM, NaF 100 mM). Los extractos se diluyeron en tampón reductor de muestra (Roth), se sometieron a SDS-PAGE y posteriormente se electrotransfirieron a membrana de PVDF (Pall). La inmunotinción se realizó con un anticuerpo policlonal reactivo para GT468 (Koslowski y otros 2007) o anticuerpos purificados por FPLC a partir de sobrenadantes de hibridomas (5 µg/ml) seguido por la detección del anticuerpo primario con anticuerpos secundarios de cabra anti-conejo conjugados con peroxidasa de rábano picante (Jackson ImmunoResearch Laboratories).

55 Modelo de xenoinjerto con tratamiento temprano

5x10⁶ células de coriocarcinoma placentario BEWO positivas para GT468 se inyectaron por vía s.c. en ratones desnudos. 3 días después de la inoculación de las células tumorales los animales se trataron con anticuerpos monoclonales purificados (200 µg i.v., 8 animales por grupo). Los anticuerpos se administraron dos veces a la semana durante 2 semanas. El crecimiento del tumor se monitoreó mediante el uso de un calibrador.

Ensayo experimental de metástasis

65 Una semana antes de la inyección de las células MCF-7 dependientes de estrógeno los ratones desnudos atímicos se prepararon mediante implantación s.c. de un implante de 17β-estradiol de liberación en el tiempo sedimento (1 mg, liberación en 60 días; Innovative Research of America). Después de la inyección de 1x10⁶ células MCF-7 por vía i.v. los

animales se trataron con anticuerpos monoclonales purificados (200 µg) dos veces a la semana. Se utilizó la PCR en tiempo real para la cuantificación de la carga tumoral en los pulmones de ratones atímicos (5-8 animales por grupo) cinco semanas después de la inyección de células. Se extrajo ADN a partir de los tejidos de pulmón mediante el uso del Mini Kit de ADN QIAamp (Qiagen) y se amplificó un fragmento de 226 pb de la región alfa-satélite del cromosoma humano 17 (sentido 5'-CAG CTG ACT AAA CAG AAG CAG-3'; antisentido 5'-GAG TTG AAT GCA GTC ATC ACA G-3') a partir de 200 ng de ADN. La carga tumoral (número de copias de ADN) se cuantificó en referencia a los pulmones normales de ratones control saludables.

Ejemplo 2: GT468 se activa de manera aberrante y se expresa altamente en diversos tumores

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

El ARNm de GT468 se investigó en un conjunto abarcador de muestras de tejidos normales y neoplásicos mediante RT-PCR de punto final y RT-PCR cuantitativa en tiempo real. Se confirmó que la expresión de GT468 está limitada a la placenta. En todas las otras muestras de tejido normal las cantidades del transcrito están por debajo o justo en el límite de detección de RT-PCR altamente sensible (figura 1A, B, C, Tab. 1). La única excepción son los testículos, a pesar de tener niveles de transcritos 3 a 4 logs menores que los observados en la placenta.

Tabla 1. La expresión de GT468 en tejidos y líneas celulares tipificados mediante RT-PCR de punto final

	Expresión de GT468
Tejidos normales	
Testículos	2/3
Placenta	3/3
Cerebro	0/3
Pulmón	0/3
Mama	0/3
Colon	0/3
Hígado	0/3
Estómago	0/3
Riñón	0/3
Próstata	0/3
Páncreas	0/3
Ovario	0/3
Bazo	0/3
Piel	0/2
Miocardio	0/2
Endometrio	0/3
rep. PBMC	0/3
prolif. PBMC	1/6
Intestino delgado	0/3
Timo	0/2
Glándula adrenal	0/2

Tejidos cancerosos		
	Cáncer de mama	44/62
5	Cáncer de pulmón	21/50
	Cáncer gástrico	18/31
	Cáncer de ovario	2/9
10	Carcinoma hepatocelular	1/5
	Líneas de células de cáncer	22/40

En el 38 % (86/225) de las muestras de tumor primario en diferentes tipos de cáncer y el 55 % (22/40) de las líneas celulares tumorales, sin embargo, se encontró una activación aberrante de este gen en contraposición con una transcripción altamente controlada. En cáncer de mama y líneas celulares de cáncer de mama, la prevalencia y los niveles de transcritos de GT468 fueron los más altos (Figura 1A, B, C). 44 de 62 (82 %) muestras de cáncer de mama primario se clasificaron como positivas para la expresión de GT468 (definida como al menos 100 veces por encima del fondo en tejidos normales no trofoblásticos), con 24 % (15/62) que mostraron baja (100-1000 veces), 40 % (25/62) que mostraron moderada (1000-10.000 veces), y 17 % (11/62) que mostraron alta (>10.000 veces) expresión (Figura 1B). Además, encontramos transcripción de GT468 en 21 de 50 (42 %) muestras de cáncer de pulmón así como en cáncer gástrico y ovárico (Tab. 1). La inducción de GT468 no se correlacionó con el subtipo histológico, la etapa del tumor o el grado del tumor.

Con el uso de RT-PCR en tiempo real, solo pudieron detectarse cantidades traza de transcritos de GT468 en tejidos normales después de 40 ciclos de RT-PCR. El único tejido normal que excedió el valor umbral de expresión (línea discontinua, expresión media de todos los tejidos normales + 3 STD (percentil 99 %)) fue la placenta y los testículos (figura 20A). Además del cáncer de mama, encontramos una alta expresión de GT468 en muestras de cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de células renales, cáncer hepático, sarcoma, cáncer de tiroides y cáncer de cabeza y cuello (figura 20B).

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

Ejemplo 3: GT468 se ubica en la superficie de células cancerosas y está accesible para los anticuerpos

Se produjo un anticuerpo policlonal de conejo (de conejo anti-GT468/C-terminal) contra un epítipo peptídico específico para GT468 (aa 117-127 de la sec. con núm. de ident.: 2). La especificidad del anticuerpo se verificó mediante silenciamiento de genes de GT468 con el uso de ARN de interferencia pequeño (siRNA). Para excluir la actividad de los siRNA fuera del objetivo los experimentos se realizaron con dos conjuntos de dúplex de siRNA específicos para GT468, un oligonucleótido desordenado no silenciador y células no transfectadas. Por transfectar las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y BT-549 con estos dúplex de siRNA se logró una reducción estable y reproducible de la expresión constitutiva del ARNm de GT468 en 80-90 % en comparación con los controles (Figura 1D). Consistente con esta observación, la banda de 26 kDa, detectada de acuerdo con el tamaño predicho de GT468 en la transferencia Western, casi desapareció completamente en ambas líneas celulares (Figura 1E), lo que proporcionó una inactivación robusta de la expresión de proteínas GT468 y de la especificidad del anticuerpo.

La tinción de la transferencia Western de la proteína GT468 en muestras de tejido humano primario con un anticuerpo de conejo anti-GT468/C-terminal confirmó que este gen es detectable en especímenes de cáncer de mama en niveles comparables con la placenta como el único tejido normal donde se expresa (Figura 1F). La inmunohistoquímica con el anticuerpo de conejo anti-GT468/C-terminal en secciones de tumor de mama humano mostró una inmunorreactividad específica en especímenes clasificados como positivos para la expresión de ARNm de GT468 mediante RT-PCR. La tinción se limitó a la población celular neoplásica, mientras que las células epiteliales no neoplásicas y estromales adyacente así como los tejidos normales correspondientes del paciente fueron no reactivos (Figura 1G). La inmunotinción de las células tumorales se acentuó en la membrana plasmática, lo que proporcionó evidencia de que GT468 es una proteína de la superficie celular.

El análisis *in silico* de la topología de la secuencia de proteína de GT468 predijo un dominio hidrofóbico que abarca los aa 5 a 22 seguido por un gran dominio extracelular constituido por los aa 23 a 212. Los aminoácidos 29 a 119 de la parte extracelular de GT468 representan un dominio truncado de la zona pelúcida (ZP). El dominio ZP se encuentra en una variedad de proteínas del tipo de receptores, expuestas extracelularmente, que incluyen el receptor de TGF-beta tipo III,

uromodulina, glicoproteína GP2 así como los receptores de espermatozoides ZP2 y ZP3 (Bork, P. y Sander, C. (1992) FEBS Lett. 300, 237-240), y está implicado en la polimerización (Jovine, L., Janssen, W. G., Litscher, E. S. y Wassarman, P. M. (2006) BMC. Biochem. 7, 11). La localización subcelular del GT468 expresado constitutivamente se evaluó mediante microscopía de inmunofluorescencia de células de cáncer de mama MCF-7 y BT-549 teñidas con anticuerpo de conejo anti-GT468/C-terminal, que tiene su epítipo (aa 117 a 127) en la parte extracelular presumiblemente de la proteína. Ambas líneas celulares mostraron una tinción distinta en la membrana celular (Figura 2A). La pérdida de señal tras la disminución de la expresión de GT468 inducida por siRNA confirmó la especificidad de la tinción. Lo más importante es que la tinción específica de la membrana se observó no solo en células nativas fijadas con metanol sino además en las no fijadas, (Figura 2B) lo que implica que el epítipo del anticuerpo está accesible sin permeabilización de la membrana celular y por lo tanto apoya la topología predicha con localización extracelular de los extremos carboxilo terminales.

Ejemplo 4: El silenciamiento de genes de GT468 inducido por siRNA inhibe la motilidad, la migración y la invasión y bloquea la proliferación de células cancerosas

Para determinar la significación biológica de GT468 en las células tumorales se estudiaron los efectos de su silenciamiento de genes inducido por siRNA sobre las funciones celulares esenciales.

En primer lugar, se investigó el desempeño de las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y BT-549 en ensayos de migración Transwell. La motilidad inicial (quimioquinesis) de ambas líneas celulares evaluadas mediante la adición de FCS al 5 % como quimioatrayente a ambos cámaras superior e inferior del sistema se inhibió sustancialmente por los dúplex de siRNA específicos para GT468 (Figura 3A). En consecuencia, también se observó una reducción marcada de la capacidad migratoria quimiotáctica direccional de las células (Figura 3B). Además, la actividad de quimioinvasión de las células se afectó profundamente por el tratamiento con siRNA de GT468, ya que las células no fueron capaces de migrar a lo largo de los gradientes quimioatrayentes al abrirse camino a través de una barrera de Matrigel (Figura 3C).

A continuación, se observó que la proliferación de células tumorales según se midió por la incorporación de BrdU en el ADN se redujo en 80-90 % en ambas líneas celulares por los dúplex de siRNA específicos para GT468 (Figura 4A). El análisis del ciclo celular reveló una detención en G1/S distinta en las células transfectadas con siRNA de GT468 como la causa subyacente del bloqueo de la proliferación (Figura 4B). La vitalidad de las células no se afectó y la tinción para anexina V no dio indicaciones de muerte celular apoptótica (Figura 4C).

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

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

Ejemplo 6: Efectos en las vías descendentes del silenciamiento inducido por siRNA y la antagonización funcional de GT468 inducida por anticuerpos

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

Es interesante señalar que se produjo una reducción significativa de transcritos de ciclina D1 según se midió por PCR en tiempo real (Fig 6A) así como de los niveles de proteínas de la ciclina D1 en transferencia Western (Figura 6B) como una consecuencia de la disminución de GT468. No se observó cambio en los niveles de la transcripción para las otras ciclinas analizadas.

Se conoce que la ciclina D1 es un regulador principal de la progresión de G1 a S del ciclo celular. Es interesante señalar que en la tumorigenesis del cáncer de mama esporádico, la sobreexpresión de ciclina D1 se considera como un evento temprana (Caldon, C. E., Daly, R. J., Sutherland, R. L. y Musgrove, E. A. (2006) J. Cell Biochem. 97, 261-274; Sutherland, R. L. y Musgrove, E. A. (2004) J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia. 9, 95-104). Las ciclinas de tipo D son inestables, y su inducción, síntesis y ensamblaje con sus parejas catalíticas todo depende de una señalización mitogénica persistente. Por lo tanto, las ciclinas de tipo D actúan como sensores de los factor de crecimiento, formando quinasas activas en respuesta a factores extracelulares (Sutherland, R. L. y Musgrove, E. A. (2004) J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia. 9, 95-104; Sherr, C. J. (1993) Cell 73, 1059-1065). En el cáncer de mama se ha demostrado, que la expresión de ciclina D1 está controlada por medio de una vía dependiente de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)/AKT (Sutherland, R. L. y Musgrove, E. A. (2004) J. Mammary. Gland. Biol. Neoplasia. 9, 95-104; D'Amico, M., Hulit, J., Amanatullah, D. F., Zafonte, B. T., Albanese, C., Bouzahzah, B., Fu, M., Augenlicht, L. H., Donehower, L. A., Takemaru, K. y otros (2000) J. Biol. Chem. 275, 32649-32657; Muise-Helmericks, R. C., Grimes, H. L., Bellacosa, A., Malstrom, S. E., Tschlis, P. N. y Rosen, N. (1998) J. Biol Chem. 273, 29864-29872). La AKT inactiva la glucógeno sintasa quinasa-3beta (GSK-3β), que aumenta de esta

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

En las células tumorales frecuentemente se observa una fosforilación constitutiva e hiperactivación de AKT consecutiva a la sobreactivación de PI3K. La cuantificación de los niveles de fosforilación de Ser473 de AKT (pAKT) posterior al silenciamiento de GT468 por tecnología de siRNA y su antagonismo funcional con un anticuerpo anti-GT468/C-terminal dieron como resultado una reducción marcada de los niveles de pAKT en particular en las células MCF-7 (Figura 6C, D), lo que sugiere que la activación de la AKT quinasa está implicada en la ejecución de los efectos en la vía descendente de GT468. Es interesante señalar que la regulación negativa de pAKT fue menos prominente en las células BT-549, que carecen de PTEN y por lo tanto tienen un mayor nivel de sobreactivación de PI3K.

Ejemplo 7: Anticuerpos monoclonales específicos para GT468

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

Los péptidos con secuencias de acuerdo con las secs. con núms. de ident.: 3-10 se usaron para la generación de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales. Por ejemplo, la inmunización mediante el uso del péptido de la sec. con núm. de ident.: 3 produjo los hibridomas 4E9-1H9 y 9B6-2A9, la inmunización mediante el uso del péptido de la sec. con núm. de ident.: 4 produjo los hibridoma 59D6-2F2, y la inmunización mediante el uso del péptido de la sec. con núm. de ident.: 6 produjo los hibridomas 61C11-2B5 y 78H11-1H6. El último anticuerpo era del isotipo IgG1.

Un ELISA específico para antígenos se realizó para garantizar la unión específica de los anticuerpos monoclonales. Los sobrenadantes de los hibridomas se analizaron en dilución 1:5 o 1:10 contra el péptido respectivo utilizado para la inmunización de los ratones. Como control todos los sobrenadantes de los hibridomas se analizaron contra dos péptidos irrelevantes. Todos los anticuerpos monoclonales reaccionaron específicamente solo con el péptido respectivo usado para la inmunización de los ratones (Figura 7).

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

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

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

Ejemplo 8: Anticuerpos monoclonales específicos para GT468 obtenidos a partir de la inmunización con el plásmido pcDNA3.1 de GT468 seguido por la inyección del péptido / proteína

Los ratones Balb/c o C57/BL6 se inmunizaron con plásmido pcDNA3.1 de GT468 con PEI manosa como adyuvante por vía intramuscular (i.m.) en el día 1 y 15. Después de eso, se inyectaron 50 µg de péptidos con 50 µl de Montanide ISA 50V como adyuvante (intraperitonealmente) o 150 µg de proteína con adyuvante incompleto de Freund (IFA) (por vía subcutánea) en los días 30 y 45. La presencia de anticuerpos dirigidos contra GT468 en el suero de los ratones se monitoreó mediante ELISA específico para antígenos o CrELISA. Los ratones con respuestas inmunitarias detectables se reforzaron tres días antes de la esplenectomía para la generación de anticuerpos monoclonales.

La inmunización intramuscular por dos veces mediante el uso de ADN de GT468 seguido por administración subcutánea dos veces de la proteína recombinante GT468 dio como resultado los hibridomas 22-1A-1, 22-2A-1, 22-9B-1, 23-33A-1 y

23-19A-1. La inmunización intramuscular por dos veces mediante el uso de ADN de GT468 seguido por la administración intraperitoneal dos veces del péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 10 dio como resultado el hibridoma F11#33F7D12. La inmunización intramuscular por dos veces mediante el uso de ADN de GT468 seguido por la administración intraperitoneal dos veces del péptido de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 3 dio como resultado los hibridomas 4A12 2D4 1A10 y 4E9 1D12 2D4.

La siguiente tabla enumera los anticuerpos obtenidos y sus isotipos.

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

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

Un lisado crudo (CrELISA) se realizó para garantizar la unión específica de los anticuerpos monoclonales de los hibridomas 22-1A-1, 22-2A-1, 22-9B-1, 23-33A-1 y 23-19A-1. Los sobrenadantes de los hibridomas se analizaron contra el lisado de E. coli transformada con el vector de expresión pQE de GT468. Como control, los sobrenadantes de hibridomas se analizaron en el lisado de E.coli transformada con plásmido pQE sin inserción (simulado). Todos los anticuerpos monoclonales reaccionaron específicamente solo con el lisado de GT468 específico (Figura 10A).

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

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

La unión específica de los anticuerpos monoclonales a la proteína GT468 de longitud completa se analizó mediante transferencia Western. Todos los sobrenadantes de hibridomas mostraron reactividad específica con los lisados de células HEK293 transfectadas con plásmido de expresión pcDNA3.1 para GT468, mientras que los lisados de células con transfección simulada no mostraron señal (Figura 12; La señal leve del sobrenadante del hibridoma 23-33A-1 en el lisado con simulación se considera que es el resultado del derrame del lisado de GT468 de HEK).

Se realizó un ELISA de péptidos para identificar los epítomos en la proteína GT468 a los que se unen los anticuerpos monoclonales. La secuencia completa de la proteína de GT468 se sintetizó como conjunto de 51 péptidos superpuestos (15mers) con un superposición de 11 aa. Todos los sobrenadantes de los hibridomas se analizaron en ELISA para determinar la unión específica a estos péptidos. Como control, se usó un péptido irrelevante. Todos los sobrenadantes mostraron unión específica a los péptidos de GT468. Cada uno de los sobrenadantes de los hibridomas 22-1A-1, 23-33A-1 y 23-19A-1 mostró unión a dos péptidos superpuestos, lo que implica reactividad contra un epítipo lineal de GT468. Los patrones de unión de 22-2A-1 y 22-9B-1 fueron más complejos, lo que implica reactividad contra epítomos conformacionales de la proteína GT468.

Para analizar el impacto de los anticuerpos monoclonales que se unen a GT468 sobre la proliferación de células cancerosas, las líneas de células cancerosas que expresan GT468 endógenamente SK-BR-3 (4A12 2D4 1A10) o MCF-7 (4E9 1D12 2D4) se incubaron con los sobrenadantes de los hibridomas purificados durante 72 horas o 120 horas a las concentraciones indicadas en la figura 14. La proliferación de las células se midió mediante incorporación de BrdU en el ADN. Mientras que el anticuerpo monoclonal irrelevante de control no alteró la proliferación de las células, los anticuerpos

monoclonales 4A12 2D4 1A10 y 4E9 1D12 2D4 claramente redujeron la proliferación de células de una manera dependiente de la concentración (Figura 14).

5 Ejemplo 9: Anticuerpos monoclonales específicos para GT468 obtenidos mediante el uso de diferentes estrategias de inmunización

10 Los ratones Balb/c o C57/BL6 se inmunizaron como se muestra en la tabla 3. Péptidos: Se inyectaron 50 µg de péptidos con 50 µl de Montanide ISA 50V como adyuvante por vía intraperitoneal (i.p.). ADN: Se inyectaron 25 µg de ADN plasmídico con GT468 con PEI-manosa como adyuvante por vía intramuscular (i.m.). Proteína recombinante: Se inyectaron 150 µg de proteína GT468 con adyuvante incompleto de Freund (IFA) por vía subcutánea (s.c.). Células: Se inyectaron $1-2 \times 10^7$ células HEK293 transfectadas con ADN plasmídico con GT468 por vía intraperitoneal (i.p.). En general, el inmunógeno se administró cada dos semanas. Los ratones con respuestas inmunitarias detectables se reforzaron tres días antes de la esplenectomía para la generación de anticuerpos monoclonales.

15

Tabla 3. Protocolos de inmunización

Ción	1. Inmunización	2. Inmunización	3. Inmunización	4. Inmunización	5. Inmunización	6. Inmunización	Refuerzo
42H11 1C11 2B2	Péptido acoplado a KLH (Seq_ID80)	Péptido acoplado a KLH (Seq_ID80)	Péptido acoplado a KLH (Seq_ID80)	Péptido acoplado a KLH (Seq_ID80)			Péptido (Seq_ID80)
51G6 2H3 2B4 1E3	Péptido acoplado a KLH (Seq_ID80)	Péptido acoplado a KLH (Seq_ID80)	Péptido acoplado a KLH (Seq_ID80)	Péptido acoplado a KLH (Seq_ID80)			Péptido (Seq_ID80)
78H11 1H6	Péptido acoplado a KLH (Seq_ID81)	Péptido acoplado a KLH (Seq_ID81)	Péptido acoplado a KLH (Seq_ID81)	Péptido acoplado a KLH (Seq_ID81)			Péptido (Seq_ID81)
16-5B-1	(Seq_ID81) ADN de GT468 (Seq_ID84) +CpG (Seq_ID83)	(Seq_ID81) ADN de GT468 (Seq_ID84) +CpG (Seq_ID83)	ADN de GT468 (Seq_ID84) +CpG (Seq_ID83)	recomb. Proteína GT468 (Seq_ID87)			recomb. Proteína GT468 (Seq_ID87)
20-11A-1	ADN de GT468 (Seq_ID84) +PEI-manosa	ADN de GT468 (Seq_ID84) +PEI-manosa	ADN de GT468 (Seq_ID84) +PEI-manosa	recomb. proteína GT468 (Seq_ID87)	recomb. proteína GT468 (Seq_ID87)		recomb. proteína GT468 (Seq_ID87)
22-1A-1	ADN de GT468 (Seq_ID84) +PEI-manosa	ADN de GT468 (Seq_ID84) +PEI-manosa	recomb. proteína GT468 (Seq_ID87)				recomb. proteína GT468 (Seq_ID87)
29-1A-2	ADN de GT468 (Seq_ID84) +PEI-manosa	ADN de GT468 (Seq_ID84) +PEI-manosa	ADN de GT468 (Seq_ID84) +PEI-manosa	recomb. proteína GT468 (Seq_ID87)	recomb. proteína GT468 (Seq_ID87)		Células HEK293 transfectadas con ADN de GT468 (Seq_ID84)
29-8B-1	ADN de GT468 (Seq_ID84) +PEI-manosa	ADN de GT468 (Seq_ID84) +PEI-manosa	ADN de GT468 (Seq_ID84) +PEI-manosa	recomb. proteína GT468 (Seq_ID87)	recomb. proteína GT468 (Seq_ID87)		Mezcla de péptidos (Seq_ID57-71)
35-48B-1	ADN de GT468 (Seq_ID84) +PEI-manosa	ADN de GT468 (Seq_ID84) +PEI-manosa	ADN de GT468 (Seq_ID84) +PEI-manosa	Células HEK293 transfectadas con ADN de GT468 (Seq_ID84)	recomb. Proteína GT468 (Seq_ID87)		
35-50A-2a	ADN de GT468 (Seq_ID84) +PEI-manosa	ADN de GT468 (Seq_ID84) +PEI-manosa	ADN de GT468 (Seq_ID84) +PEI-manosa	Células HEK293 transfectadas con ADN de GT468 (Seq_ID84)	recomb. Proteína GT468 (Seq_ID87)		

La siguiente tabla enumera los anticuerpos obtenidos y sus isotipos.

Tabla 4. Los anticuerpos monoclonales obtenidos con el uso de diferentes estrategias de inmunización

	Hibridoma	Isotipo
5	42H11 1C11 2B2	IgG2b
	51G6 2H3 2B4	IgG1
10	16-5B-1	IgG2a
	20-11A-1	IgG2a
	29-1A-2	IgG1
15	29-8B-1	IgG1
	35-48B-1	IgG3
	35-50A-2a	IgG2a
20	38-10B-1	IgG2b
	38-1A-1	IgG2b
	44-3A-2	IgG2a
25	45-2A-1	IgG2b
	45-8A-2	IgG1
	48-3B-1	IgG3
30	48-4A-1	IgG3
	49-3A-1	IgG2a
	49-8A-1	IgG1
35	51-1A-1	IgG2a
	53-13A-2	IgG2a
	53-29A1	IgG2b
	54-4B-2	IgG2b
40	56-4A-2	IgG2a

Ejemplo 10: Pruebas de los anticuerpos monoclonales específicos para GT468

Se realizó un ELISA específico para antígenos con el uso del conjunto de 51 péptidos superpuestos (15mers) con una superposición de 11aa que se muestra en la figura 13 y 25 para identificar los epítomos de la proteína GT468 a los que se unen los anticuerpos monoclonales. Cada uno de los sobrenadantes de hibridomas purificados se analizó en el ELISA para la unión específica a todos los péptidos. Se usó un péptido irrelevante como control. Los hibridomas 4A5 1E11 1B7, 7H12 2E6 2C4, 11D7 1G10 2B4 y 3E5 2G4 se produjeron mediante el uso del péptido de la sec. con núm. de ident.: 3 para la inmunización.

Como se indica en la tabla 5, 15 sobrenadantes mostraron unión específica a los péptidos de GT468. De entre los 15 sobrenadantes, 13 sobrenadantes se unieron a 1 péptido, o a 2 o 3 péptidos adyacentes lo que sugiere el reconocimiento de un epítomo lineal de GT468, y 2 sobrenadantes se unieron a péptidos que, al menos parcialmente, no son adyacentes, lo que sugiere una definición lineal/conformacional del epítomo. 9 sobrenadantes no mostraron unión específica a los péptidos de GT468 en el ELISA específico para antígenos, sin embargo, mostraron unión en FACS o en IF, lo que sugiere reactividad contra epítomos conformacionales no lineales de GT468.

Tabla 5. Pruebas de anticuerpos monoclonales en un ELISA específico para antígenos

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

La unión específica de los anticuerpos monoclonales de los hibridomas con la proteína GT468 se analizó mediante análisis de citometría de flujo. Las células HEK293 nativas, no fijadas, transfectadas establemente con pDisplay-GT468aa116-212 o las células con transfección simulada se tiñeron con sobrenadantes de hibridomas purificados por FPLC (5 µg/ml). En el plásmido pDisplay-GT468aa116-212 los aminoácidos 116-212 de GT468 se fusionaron en el extremo C-terminal a un dominio de transmembrana del receptor de PDGF. Esta construcción asegura la expresión estable de GT468 aa116-212 en la membrana plasmática de las células. Las células se tiñeron con los sobrenadantes en un estado no fijado que detecta la unión a GT468 en su conformación nativa. Los sobrenadantes de hibridomas mostraron tinción específica de las células transfectadas con GT468, mientras que no se observó tinción en las células con transfección simulada (Figura 15).

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

La unión específica de los anticuerpos monoclonales en los sobrenadantes de hibridomas a la proteína GT468 de longitud completa se analizó mediante transferencia Western. Los sobrenadantes de hibridomas purificados por FPLC (5 µg/ml) mostraron reactividad específica con los lisados de células HEK293 transfectadas con un plásmido de expresión de

GT468, mientras que los lisados de células con transfección simulada no mostraron señal, lo que demuestra que la unión a GT468 es específica (Figura 17, 23).

5 La actividad inhibitoria de la proliferación de los anticuerpos monoclonales de los sobrenadantes de hibridomas se analizó en ensayos de proliferación (Figura 18, 22). Las células de cáncer de mama que expresan GT468 endógenamente (SK-BR-3, MDA-MB-468, MCF-7) y las células de melanoma MelHo negativas a GT468 o las células cancerosas gástricas NUGC4 se sembraron en una placa de 96 pocillos (5000 células/pocillo) y se incubaron con sobrenadantes de hibridomas purificados por FPLC en las concentraciones indicadas. Después de 72 horas la proliferación de las células se midió mediante incorporación de BrdU en el ADN. Todos los valores se normalizan con relación a las células control no incubadas con sobrenadante de hibridoma. No se observó inhibición de la proliferación en las células control MelHo o NUGC4. Los sobrenadantes de hibridomas mostraron actividad inhibitoria específica de la proliferación en las células de cáncer de mama que expresan GT468 de una manera dependiente de la concentración en grados variables. Algunos de los anticuerpos (35-48B-1, 48-3B-1, 51-1A-1, 56-4A-2) mostraron efectos significativos en todas las líneas celulares positivas para GT468 que se analizaron.

15 Para analizar el impacto de la unión del anticuerpo a GT468 sobre la proliferación de células cancerosas, las células cancerosas MCF-7 que expresan GT468 endógenamente se incubaron con anticuerpos monoclonales purificados durante 72 horas. Mientras el anticuerpo de control no alteró la proliferación de las células, los anticuerpos 4A5 1E11 1B7, 7H12 2E6 2C4, 11D7 1G10 2B4, 18-2A-1, 63-1A-2 y 3E5 2G4 redujeron la proliferación de las células cancerosas (Figura 27).

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

30 Ejemplo 11: El tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-GT468 atenúa el crecimiento tumoral de xenoinjertos en ratones desnudos

35 Se inyectaron células de coriocarcinoma placentario BEWO positivas para GT468 por vía s.c. en ratones desnudos y los animales se trataron con anticuerpos monoclonales anti-GT468 purificados. La Figura 24 demuestra que el tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-GT468 atenúa el crecimiento tumoral de xenoinjertos de coriocarcinoma placentario BEWO en ratones desnudos.

40 Ejemplo 12: El tratamiento con anticuerpos monoclonales anti-GT468 reduce la carga tumoral metastásica en los pulmones de ratones desnudos

45 Se inyectaron células MCF-7 por vía i.v. en ratones desnudos atímicos tratados previamente con implantación s.c. de un implante dde 17β-estradiol de liberación en el tiempo y los animales se trataron con anticuerpos monoclonales anti-GT468 purificados. La PCR en tiempo real utilizada para la cuantificación de la carga tumoral en los pulmones de los ratones atímicos cinco semanas después de la inyección de las células demostró una reducción significativa de la carga tumoral metastásica en los pulmones de ratones tratados con anticuerpos monoclonales anti-GT468 (Figura 26A,B).

50

55

60

65

ES 2 696 518 T3

Listado de secuencias

<110> Ganymed Pharmaceuticals AG y otros

5 <120> ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA EL TRATAMIENTO DE CÁNCER

<130> 342-54 PCT

<150> EP 10 003 082.4

10 <151> 2010-03-23

<150> US 61/316,662

<151> 2010-03-23

15 <160> 89

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

20 <211> 1126

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

25 atatatcaga ccatcagaag gatttgata aagagtgact ctctatgaa ggtaaaggcc 60
 accctcttc agttccagt actgagatac atttttcaa tcctgggggc aaatacagac 120
 30 acagcaagtt ctttcttccc tttggaaatt tggcagctgc cttcaccagt gagcaciaag 180
 ccacatttca aaggaaactg acaaattatc cccagctgcc agaagaaga atcctcactg 240
 gacggcttcc tgtttcctgt ggttcattat ctgattggct gcagggatga aagtttttaa 300
 35 gttcatagga ctgatgatcc tcctcacctc tgcgtttca gccggttcag gacaaagtcc 360
 aatgactgtg ctgtgctcca tagactgggt catggtcaca gtgcaccctc tcatgctaaa 420
 caacgatgtg tgtgtacact ttcattgaact acacttgggc ctgggttgcc ccccaaacca 480
 tgttcagcca cagcctacc agttcaccta ccgtgttact gaatgtggca tcagggccaa 540
 40 agctgtctct caggacatgg ttatctacag cactgagata cactactctt ctaaggcac 600
 gccatctaag tttgtgatcc cagtgtcatg tgctgcccc caaaagtccc catggctcac 660
 caagccctgc tccatgagag tagccagcaa gagcagggcc acagcccaga aggatgagaa 720
 45 atgctacgag gtgttcagct tgtcacagtc cagtcaaagg cccaactgcg attgtccacc 780
 ttgtgtcttc agtgaagaag agcataccca ggtcccttgt caccaagcag gggctcagga 840
 ggctcaacct ctgcagccat ctcactttct tgatatttct gaggattggt ctcttcacac 900
 50 agatgatatg attgggtcca tgtgatcctc aggtttggg tctcctgaag atgctatttc 960
 tagaattagt atatagtgtg caaatgtctg acaataagt gctcttgtga ccctcatgtg 1020
 agcacttttg agaaagagaa acctatagca acttcatgaa ttaagccttt ttctatattt 1080
 55 ttatattcat gtgtaaaca aaaataaaat aaaattctga tcgcat 1126

<210> 2

60 <211> 212

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

65

ES 2 696 518 T3

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

ES 2 696 518 T3

<400> 4
Pro Leu Gln Pro Ser His Phe Leu Asp Ile Ser Glu Asp
1 5 10

5 <210> 5
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para inmunización

<400> 5
Ile Tyr Ser Thr Glu Ile His Tyr Ser Ser Lys
1 5 10

15 <210> 6
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para inmunización

25 <400> 6
Trp Ser Leu His Thr Asp Asp Met Ile Gly Ser Met
1 5 10

30 <210> 7
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para inmunización

<400> 7
Cys Ser Ile Asp Trp Phe Met Val Thr Val His Pro Phe Met Leu
1 5 10 15

40 <210> 8
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para inmunización

<400> 8
Cys Val His Phe His Glu Leu His Leu Gly Leu Gly
1 5 10

50 <210> 9
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

55 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para inmunización
<400> 9

ES 2 696 518 T3

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

5 <210> 10
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para inmunización

10 <400> 10
Val Phe Ser Leu Ser Gln Ser Ser Gln Arg Pro Asn Cys
1 5 10

15 <210> 11
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
20 <223> Descripción de secuencia artificial: siRNA

<400> 11
ccaugagagu agccagcaat t 21

25 <210> 12
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
30 <223> Descripción de secuencia artificial: siRNA

<400> 12
uugcuggcua cucucaugga g 21

35 <210> 13
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

40 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: siRNA

<400> 13
45 gguucaggac aaaguccaat t 21

<210> 14
<211> 21
<212> ADN
50 <213> Artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: siRNA

55 <400> 14
uuggacuuug uccugaaccg g 21

<210> 15
<211> 21
<212> ADN
60 <213> Artificial

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

ES 2 696 518 T3

<400> 15
5 aaatttgca gctgccttca c 21
<210> 16
<211> 21
<212> ADN
10 <213> Artificial
<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido
15 <400> 16
tgatgccaca ttcagtaaca c 21
<210> 17
20 <211> 326
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
25 <223> Descripción de secuencia artificial: Traducción de producto de PCR
<400> 17
30 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
1 5 10 15
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
20 25 30
35
40
45
50
55
60
65

ES 2 696 518 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

90 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

ES 2 696 518 T3

<210> 18
 <211> 107
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

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

 10 <400> 18

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

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

 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 20 35 40 45

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

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

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

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

 35 <210> 19
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Artificial

 40 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Producto de PCR

 <400> 19

 45 cgtaagggtgg ctgcaccatc tgtcttcac ttcocgcca ctgatgagca gttgaaatct 60
 ggaactgcct ctgttggtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggg caaagtacag 120

 50 tggaagggtgg ataacgcct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
 agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc acctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
 aaacacaaag tctacgctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag 300

 55 agcttcaaca ggggagagtg ttag 324

 60 <210> 20
 <211> 981
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Producto de PCR

 65

ES 2 696 518 T3

<400> 20

	ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc	60
5	ctgggctgcc tgggtcaagga ctacttcccc gaaccggtga cgggtgctgtg gaactcaggc	120
	gccctgacca gcggcgtgca cacottcccc gctgtcctac agtcctcagg actctactcc	180
	ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac	240
10	gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac	300
	aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc	360
	ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc	420
15	gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc	480
	gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt	540
	gtggtcagcg tcctcacgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc	600
20	aaggtctcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg	660
	cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac	720
	caggtcagcc tgacctgctt ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg	780
25	gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac	840
	ggctccttct tcctctatag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac	900
	gtcttctcat gctccgtgat gcatgagget ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc	960
30	tcctgtctc cgggtaaatg a	981

<210> 21

35 <211> 324

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

40 <223> Descripción de secuencia artificial: ácido nucleico con optimización de codones

<400> 21

	cgtacggtgg ccgctcccag cgtgttcctc tccccccca gcgacgagca gctgaagtcc	60
45	ggcaccgcca gcgtggtgtg cctgctgaac aacttctacc ccogggaggc caaggtgcag	120
	tggaaggtgg acaacgcctt gcagagcggc aacagccagg agagcgtcac cgagcaggac	180
	agcaaggact ccacctacag cctgagcagc accctgacct tgagcaaggc cgactacgag	240
50	aagcacaagg tgtacgcctg cgaggtgacc caccagggcc tgtccagccc cgtgaccaag	300
	agcttcaaca ggggcgagtg ctag	324

55

<210> 22

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

60

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: proteína con optimización de codones

<400> 22

65

ES 2 696 518 T3

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

30 <210> 23
 <211> 981
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: ácido nucleico con optimización de codones
 <400> 23

ggcccaagcg tgttccccct ggccccagc agcaagagca ccagcggcgg cacagccgcc 60
 40 ctgggctgcc tgggtaagga ctacttcccc gagcccgtga ccgtgagctg gaacagcggga 120
 gccctgacct ccggcgtgca caccttcccc gcctgtctgc agagcagcgg cctgtacagc 180
 ctgagcagcg tggtgaccgt gccagcagc agcctgggca ccagaccta catctgcaac 240
 45 gtgaaccaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagagag tggagcccaa gagctgcgac 300
 aagaccaca cctgccccct ctgcccagcc ccagagctgc tgggcgacc cagcgtgttc 360
 ctgttcccc ccaagcccaa ggacacctg atgatacagca ggacccccga ggtgacctgc 420
 50 gtggtggtgg acgtgagcca cgaggacca gaggtgaagt tcaactggta cgtggacggc 480
 gtggaggtgc acaacgcaa gaccaagccc agagaggagc agtacaacag cacctacagg 540
 gtggtgtccg tgctgacctg gctgcaccag gactggctga acggcaagga atacaagtgc 600
 55 aaggtctcca acaaggccct gccagcccc atcgaaaaga ccatcagcaa ggccaagggc 660
 cagccacggg agccccaggt gtacacctg cccccagcc gggaggagat gaccaagaac 720
 caggtgtccc tgacctgtct ggtgaagggc ttctacccca ggcacatcgc cgtggagtgg 780
 60 gagagcaacg gccagcccc gaacaactac aagaccacc cccagtgct ggacagcgac 840
 ggcagcttct tcctgtacag caagctgacc gtggacaagt ccaggtggca gcagggcaac 900
 gtgttcagct gcagcgtgat gcacaggcc ctgcacaacc actacacca gaagtcctg 960
 65 agcctgagcc ccggcaagta g 981

ES 2 696 518 T3

<210> 24

<211> 326

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: proteína con optimización de codones

10 <400> 24

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

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

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

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

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

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

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 696 518 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

55 <210> 25
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

60 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 25

65

ES 2 696 518 T3

5 tgacactggc aaaacaatgc a 21
 <210> 26
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido
 10 <400> 26

 ggtccttttc accagcaagc t 21
 15 <210> 27
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: siRNA
 20 <400> 27

 25 uaacuguaua aucgacuagt t 21
 <210> 28
 <211> 21
 <212> ADN
 30 <213> Artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: siRNA

 <400> 28
 35 cuagucgauu auacaguuag a 21
 <210> 29
 <211> 15
 40 <212> PRT
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje
 45 <400> 29
 Met Lys Val Phe Lys Phe Ile Gly Leu Met Ile Leu Leu Thr Ser
 1 5 10 15

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

 <220>
 55 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

 <400> 30
 Lys Phe Ile Gly Leu Met Ile Leu Leu Thr Ser Ala Phe Ser Ala
 1 5 10 15

 60 <210> 31
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

<400> 31
 Leu Met Ile Leu Leu Thr Ser Ala Phe Ser Ala Gly Ser Gly Gln
 1 5 10 15

10 <210> 32
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

<400> 32
 Leu Thr Ser Ala Phe Ser Ala Gly Ser Gly Gln Ser Pro Met Thr
 1 5 10 15

20 <210> 33
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

<400> 33
 Phe Ser Ala Gly Ser Gly Gln Ser Pro Met Thr Val Leu Cys Ser
 1 5 10 15

30 <210> 34
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

40 <400> 34
 Ser Gly Gln Ser Pro Met Thr Val Leu Cys Ser Ile Asp Trp Phe
 1 5 10 15

45 <210> 35
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

50 <400> 35
 Pro Met Thr Val Leu Cys Ser Ile Asp Trp Phe Met Val Thr Val
 1 5 10 15

55 <210> 36
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

60

ES 2 696 518 T3

<400> 36
 Leu Cys Ser Ile Asp Trp Phe Met Val Thr Val His Pro Phe Met
 1 5 10 15

5 <210> 37
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

<400> 37
 Asp Trp Phe Met Val Thr Val His Pro Phe Met Leu Asn Asn Asp
 1 5 10 15

15 <210> 38
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

<400> 38
 Val Thr Val His Pro Phe Met Leu Asn Asn Asp Val Cys Val His
 1 5 10 15

25 <210> 39
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

<400> 39
 Pro Phe Met Leu Asn Asn Asp Val Cys Val His Phe His Glu Leu
 1 5 10 15

35 <210> 40
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

45 <400> 40
 Asn Asn Asp Val Cys Val His Phe His Glu Leu His Leu Gly Leu
 1 5 10 15

50 <210> 41
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

<400> 41
 Cys Val His Phe His Glu Leu His Leu Gly Leu Gly Cys Pro Pro
 1 5 10 15

60 <210> 42
 <211> 15
 <212> PRT

ES 2 696 518 T3

<213> Artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

5 <400> 42
His Glu Leu His Leu Gly Leu Gly Cys Pro Pro Asn His Val Gln
1 5 10 15

10 <210> 43
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

<400> 43
Leu Gly Leu Gly Cys Pro Pro Asn His Val Gln Pro His Ala Tyr
1 5 10 15

20 <210> 44
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

25 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

<400> 44
Cys Pro Pro Asn His Val Gln Pro His Ala Tyr Gln Phe Thr Tyr
1 5 10 15

30 <210> 45
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

35 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

<400> 45
His Val Gln Pro His Ala Tyr Gln Phe Thr Tyr Arg Val Thr Glu
1 5 10 15

40 <210> 46
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

<400> 46
His Ala Tyr Gln Phe Thr Tyr Arg Val Thr Glu Cys Gly Ile Arg
1 5 10 15

50 <210> 47
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

55 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

60 <400> 47

ES 2 696 518 T3

Phe Thr Tyr Arg Val Thr Glu Cys Gly Ile Arg Ala Lys Ala Val
1 5 10 15

<210> 48
<211> 15
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

10 <400> 48

Val Thr Glu Cys Gly Ile Arg Ala Lys Ala Val Ser Gln Asp Met
1 5 10 15

15 <210> 49
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

20 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

<400> 49
Gly Ile Arg Ala Lys Ala Val Ser Gln Asp Met Val Ile Tyr Ser
1 5 10 15

25 <210> 50
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

<400> 50
Lys Ala Val Ser Gln Asp Met Val Ile Tyr Ser Thr Glu Ile His
1 5 10 15

35 <210> 51
<211> 15
<212> PRT
40 <213> Artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

45 <400> 51
Gln Asp Met Val Ile Tyr Ser Thr Glu Ile His Tyr Ser Ser Lys
1 5 10 15

<210> 52
<211> 15
50 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

55 <400> 52
Ile Tyr Ser Thr Glu Ile His Tyr Ser Ser Lys Gly Thr Pro Ser
1 5 10 15

<210> 53
60 <211> 15
<212> PRT

ES 2 696 518 T3

<213> Artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

5 <400> 53
 Glu Ile His Tyr Ser Ser Lys Gly Thr Pro Ser Lys Phe Val Ile
 1 5 10 15

10 <210> 54
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

<400> 54
 Ser Ser Lys Gly Thr Pro Ser Lys Phe Val Ile Pro Val Ser Cys
 1 5 10 15

20 <210> 55
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

<400> 55
 Thr Pro Ser Lys Phe Val Ile Pro Val Ser Cys Ala Ala Pro Gln
 1 5 10 15

30 <210> 56
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

<400> 56
 Phe Val Ile Pro Val Ser Cys Ala Ala Pro Gln Lys Ser Pro Trp
 1 5 10 15

40 <210> 57
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

50 <400> 57
 Val Ser Cys Ala Ala Pro Gln Lys Ser Pro Trp Leu Thr Lys Pro
 1 5 10 15

55 <210> 58
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

<400> 58

ES 2 696 518 T3

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

<210> 59
 <211> 15
 5 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

10 <400> 59

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

15 <210> 60
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

<400> 60

Thr Lys Pro Cys Ser Met Arg Val Ala Ser Lys Ser Arg Ala Thr
 25 1 5 10 15

<210> 61
 <211> 15
 <212> PRT
 30 <213> Artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

35 <400> 61
 Ser Met Arg Val Ala Ser Lys Ser Arg Ala Thr Ala Gln Lys Asp
 1 5 10 15

<210> 62
 <211> 15
 40 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

45 <400> 62
 Ala Ser Lys Ser Arg Ala Thr Ala Gln Lys Asp Glu Lys Cys Tyr
 1 5 10 15

<210> 63
 <211> 15
 50 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 55 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

<400> 63

Arg Ala Thr Ala Gln Lys Asp Glu Lys Cys Tyr Glu Val Phe Ser
 60 1 5 10 15

ES 2 696 518 T3

5 <210> 64
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

<400> 64
 Gln Lys Asp Glu Lys Cys Tyr Glu Val Phe Ser Leu Ser Gln Ser
 1 5 10 15

15 <210> 65
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

20 <400> 65
 Lys Cys Tyr Glu Val Phe Ser Leu Ser Gln Ser Ser Gln Arg Pro
 1 5 10 15

25 <210> 66
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

30 <400> 66
 Val Phe Ser Leu Ser Gln Ser Ser Gln Arg Pro Asn Cys Asp Cys
 1 5 10 15

35 <210> 67
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

40 <400> 67
 Ser Gln Ser Ser Gln Arg Pro Asn Cys Asp Cys Pro Pro Cys Val
 1 5 10 15

45 <210> 68
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

50 <400> 68
 Gln Arg Pro Asn Cys Asp Cys Pro Pro Cys Val Phe Ser Glu Glu
 1 5 10 15

55 <210> 69
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

ES 2 696 518 T3

<400> 69
 Cys Asp Cys Pro Pro Cys Val Phe Ser Glu Glu Glu His Thr Gln
 1 5 10 15

5 <210> 70
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

<400> 70

15 Pro Cys Val Phe Ser Glu Glu Glu His Thr Gln Val Pro Cys His
 1 5 10 15

<210> 71
 <211> 15
 <212> PRT
 20 <213> Artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

25 <400> 71

Ser Glu Glu Glu His Thr Gln Val Pro Cys His Gln Ala Gly Ala
 1 5 10 15

<210> 72
 <211> 15
 <212> PRT
 30 <213> Artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

35 <400> 72

His Thr Gln Val Pro Cys His Gln Ala Gly Ala Gln Glu Ala Gln
 1 5 10 15

<210> 73
 <211> 15
 <212> PRT
 40 <213> Artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

45 <400> 73

Pro Cys His Gln Ala Gly Ala Gln Glu Ala Gln Pro Leu Gln Pro
 1 5 10 15

<210> 74
 <211> 15
 <212> PRT
 50 <213> Artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

55 <400> 74

Ala Gly Ala Gln Glu Ala Gln Pro Leu Gln Pro Ser His Phe Leu
 1 5 10 15

<210> 75

ES 2 696 518 T3

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

5 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

<400> 75
 Glu Ala Gln Pro Leu Gln Pro Ser His Phe Leu Asp Ile Ser Glu
 1 5 10 15

10 <210> 76
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

<400> 76
 Leu Gln Pro Ser His Phe Leu Asp Ile Ser Glu Asp Trp Ser Leu
 1 5 10 15

20 <210> 77
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

<400> 77
 His Phe Leu Asp Ile Ser Glu Asp Trp Ser Leu His Thr Asp Asp
 1 5 10 15

30 <210> 78
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

<400> 78
 Ile Ser Glu Asp Trp Ser Leu His Thr Asp Asp Met Ile Gly Ser
 1 5 10 15

40 <210> 79
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para tamizaje

<400> 79
 Ser Glu Asp Trp Ser Leu His Thr Asp Asp Met Ile Gly Ser Met
 1 5 10 15

50 <210> 80
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para inmunización

60

ES 2 696 518 T3

<400> 80
 Cys Pro Leu Gln Pro Ser His Phe Leu Asp Ile Ser Glu Asp
 1 5 10

5 <210> 81
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para inmunización

<400> 81
 Cys Trp Ser Leu His Thr Asp Asp Met Ile Gly Ser Met
 1 5 10

15 <210> 82
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Péptido para inmunización

<400> 82
 Cys Tyr Glu Val Phe Ser Leu Ser Gln Ser Ser Gln Arg Pro Asn Cys
 1 5 10 15

30 Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Cys
 20 25

<210> 83
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido para inmunización

<400> 83
 40 tccatgacgt tcctgacgtt 20

45 <210> 84
 <211> 639
 <212> ADN
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: inserto de plásmido optimizado

<400> 84
 atgaagggtgt tcaagttcat cggcctgatg atcctgctga ccagcgcctt cagcgcggc 60
 55 agcggccaga gccccatgac cgtgctgtgc agcatcgact ggttcatggt gaccgtgcac 120
 cccttcatgc tgaacaacga cgtgtgogtg cacttccacg agctgcacct gggcctgggc 180

60

ES 2 696 518 T3

5 tgccctcecca accacgtgca gceccacgcc taccagttca cctaccgggt gaccgagtgc 240
 ggcatccggg ccaaggccgt gagccaggac atggtgatct acagcaccga gatccactac 300
 agcagcaagg gcacccccag caagttcgtg atccccgtga gctgtgccgc ccctcagaag 360
 agccccctggc tgaccaagcc ctgcagcatg cgggtggcca gcaagagccg ggccaccgcc 420
 10 cagaaagacg agaagtgcta cgaggtgttc agcctgagcc agagcagcca gcggcccaac 480
 tgcgactgcc ccccctgctg gttcagcgag gaagagcaca cccaggtgcc ctgccaccag 540
 gceggagccc aggaagccca gcccctgcag cccagccact tcctggacat cagcgaggac 600
 15 tggtcctctg acaccgaaga catgatcggc agcatgtga 639

20 <210> 85
 <211> 495
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: inserto de plásmido optimizado

30 <400> 85
 atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60
 gactatccat atgatgttcc agattatgct ggggccccagc cggccagatc tgccgcccct 120
 cagaagagcc cctggctgac caagccctgc agcatgcggg tggccagcaa gagccgggcc 180
 accgcccaga aagacgagaa gtgctacgag gtgttcagcc tgagccagag cagccagcgg 240
 35 cccaactgcg actgcccccc ctgcgtgttc agcgaggaag agcacacca ggtgccctgc 300
 caccaggtcg acgaacaaaa actcatctca gaagaggatc tgaatgctgt gggccaggac 360
 acgcaggagg tcatcgtggt gccacactcc ttgcccttta aggtggtggt gatctcagcc 420
 40 atcctggccc tgggtggtgct caccatcatc tccttatca tcctcatcat gctttggcag 480
 aagaagccac gttag 495

45 <210> 86
 <211> 591
 <212> ADN
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: inserto de plásmido optimizado

55 <400> 86
 atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60
 gactatccat atgatgttcc agattatgct ggggccccagc cggccagatc tgccgcccct 120
 cagaagagcc cctggctgac caagccctgc agcatgcggg tggccagcaa gagccgggcc 180
 60 accgcccaga aagacgagaa gtgctacgag gtgttcagcc tgagccagag cagccagcgg 240
 cccaactgcg actgcccccc ctgcgtgttc agcgaggaag agcacacca ggtgccctgc 300

65

ES 2 696 518 T3

caccaggccg gagcccagga agcccagccc ctgcagccca gccacttccct ggacatcagc 360
 gaggactggt cctcgcacac cgaocagatg atcggcagca tggtcgacga acaaaaactc 420
 5 atctcagaag aggatctgaa tgctgtgggc caggacacgc aggaggtcat cgtggtgcca 480
 cactccttgc cctttaaggt ggtggtgatc tcagccatcc tggccctggt ggtgctcacc 540
 atcatctccc ttatcatcct catcatgctt tggcagaaga agccacgtta g 591

10

<210> 87

<211> 579

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

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

20 <400> 87

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

60

65

ES 2 696 518 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

55

60

65

ES 2 696 518 T3

5 Val Gln Pro His Ala Tyr Gln Phe Thr Tyr Arg Val Thr Glu Cys Gly
 435 440 445
 Ile Arg Ala Lys Ala Val Ser Gln Asp Met Val Ile Tyr Ser Thr Glu
 450 455 460
 10 Ile His Tyr Ser Ser Lys Gly Thr Pro Ser Lys Phe Val Ile Pro Val
 465 470 475 480
 Ser Cys Ala Ala Pro Gln Lys Ser Pro Trp Leu Thr Lys Pro Cys Ser
 485 490 495
 15 Met Arg Val Ala Ser Lys Ser Arg Ala Thr Ala Gln Lys Asp Glu Lys
 500 505 510
 20 Cys Tyr Glu Val Phe Ser Leu Ser Gln Ser Ser Gln Arg Pro Asn Cys
 515 520 525
 Asp Cys Pro Pro Cys Val Phe Ser Glu Glu Glu His Thr Gln Val Pro
 530 535 540
 25 Cys His Gln Ala Gly Ala Gln Glu Ala Gln Pro Leu Gln Pro Ser His
 545 550 555 560
 30 Phe Leu Asp Ile Ser Glu Asp Trp Ser Leu His Thr Asp Asp Met Ile
 565 570 575
 Gly Ser Met
 35
 <210> 88
 <211> 21
 <212> ADN
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido
 45 <400> 88
 cagctgacta aacagaagca g 21
 <210> 89
 50 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 55 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido
 <400> 89
 60 gagttgaatg cagtcacac ag 22
 65

Reivindicaciones

1. Un anticuerpo seleccionado del grupo que consiste en:
- 5 (i) un anticuerpo producido o que puede obtenerse a partir de un clon depositado bajo el núm. de acceso DSM ACC3040 (63-1A-2),
(ii) un anticuerpo que es una forma quimerizada o humanizada del anticuerpo en (i), y
(iii) un anticuerpo que comprende la porción de unión al antígeno o el sitio de unión al antígeno del anticuerpo en (i).
- 10 2. Un hibridoma seleccionado del grupo que consiste en:
- (i) un hibridoma capaz de producir el anticuerpo de la reivindicación 1, y
15 (ii) un hibridoma depositado bajo el núm. de acceso DSM ACC3040 (63-1A-2).
3. Un conjugado que comprende un anticuerpo de la reivindicación 1 acoplado a un agente terapéutico, preferentemente una toxina, un radioisótopo, un fármaco o un agente citotóxico.
4. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la reivindicación 1 y/o un conjugado de la
20 reivindicación 3, y un portador farmacéuticamente aceptable.
5. Un anticuerpo de la reivindicación 1 y/o un conjugado de la reivindicación 3 para usar en un método para inhibir el crecimiento, destruir o inhibir la dispersión metastásica de una célula tumoral que expresa una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 2 y/o que se caracterizan por la asociación de dicha proteína con su superficie celular, que comprende poner en contacto la célula tumoral con el anticuerpo y/o el conjugado.
- 25 6. Un anticuerpo de la reivindicación 1, un conjugado de la reivindicación 3 o una composición farmacéutica de la reivindicación 4 para usar en un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno tumoral que implica células tumorales que expresan una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con la sec. con núm. de ident.: 2 y/o que se caracterizan por la asociación de dicha proteína con su superficie celular en un sujeto.
- 30 7. El anticuerpo, el conjugado o la composición farmacéutica para usar de acuerdo con la reivindicación 6 en donde la enfermedad o trastorno tumoral es un cáncer, preferentemente un cáncer seleccionado del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de ovario, cáncer hepatocelular, cáncer de colon, cáncer pancreático, cáncer de esófago, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de riñón, en particular, carcinoma de células renales, cáncer de próstata, cáncer de hígado, melanoma, sarcoma, mieloma, neuroblastoma, coriocarcinoma placentario, cáncer de cuello uterino y cáncer de tiroides, y las formas metastásicas de estos, y cáncer metastásico en el pulmón.
- 35
40
45
50
55
60
65

Fig. 1

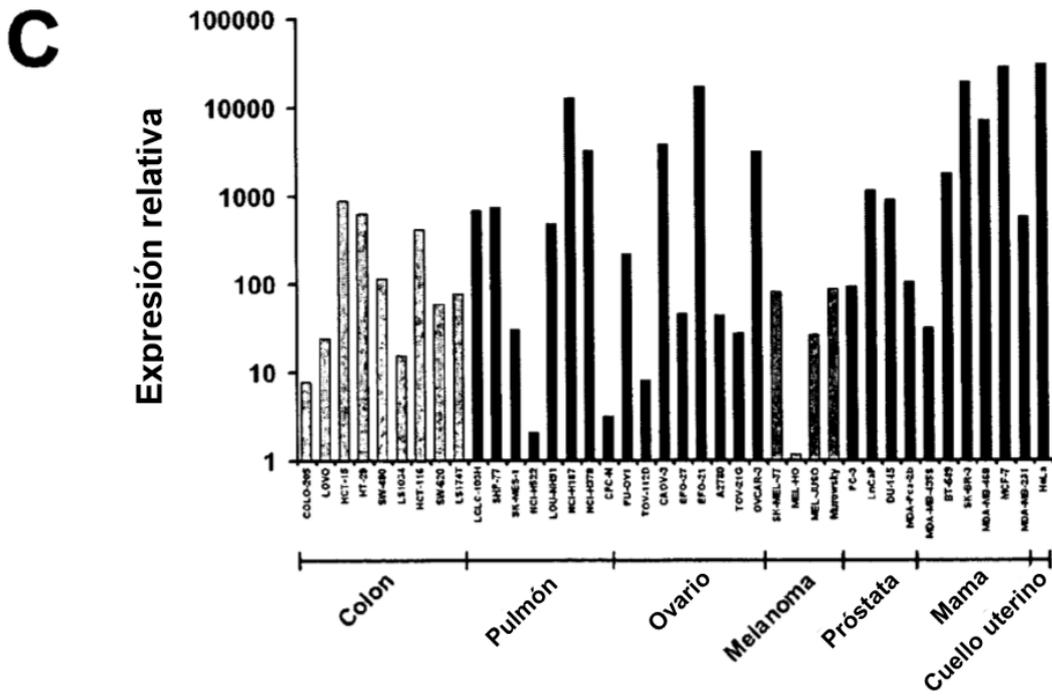
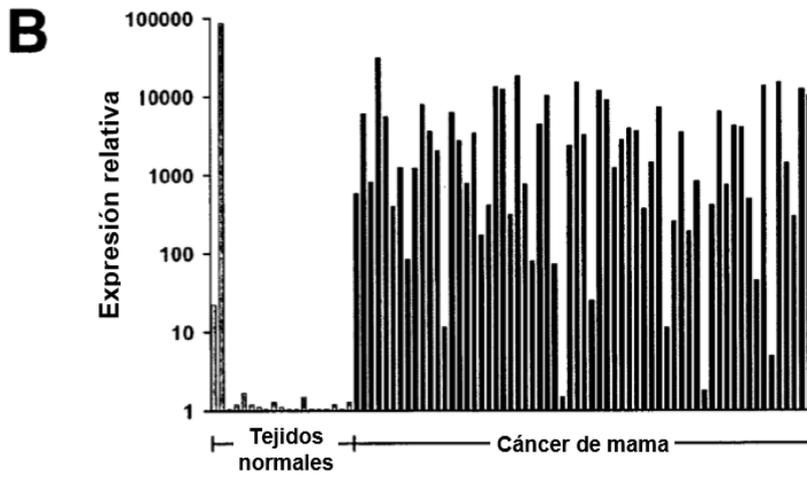
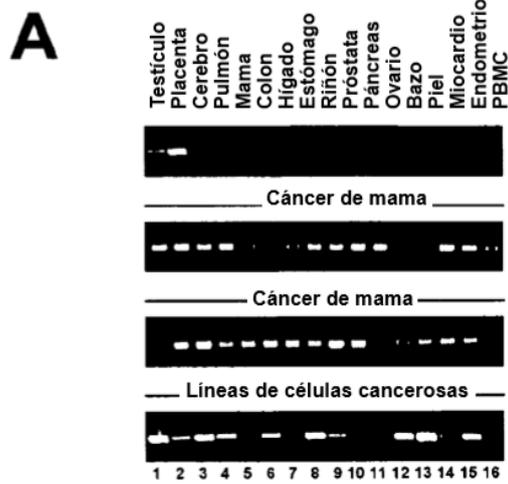


Fig. 1

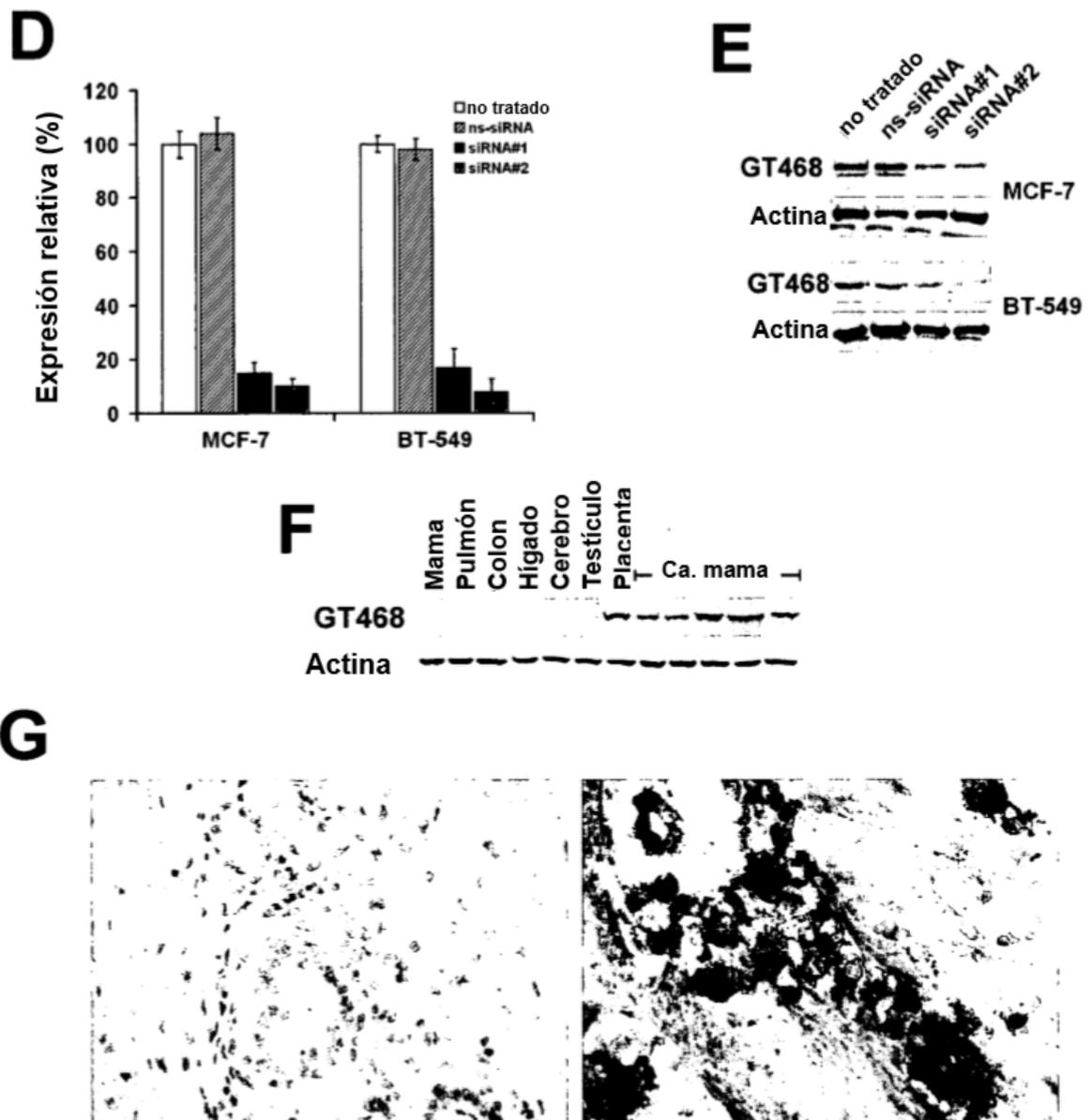


Fig. 2

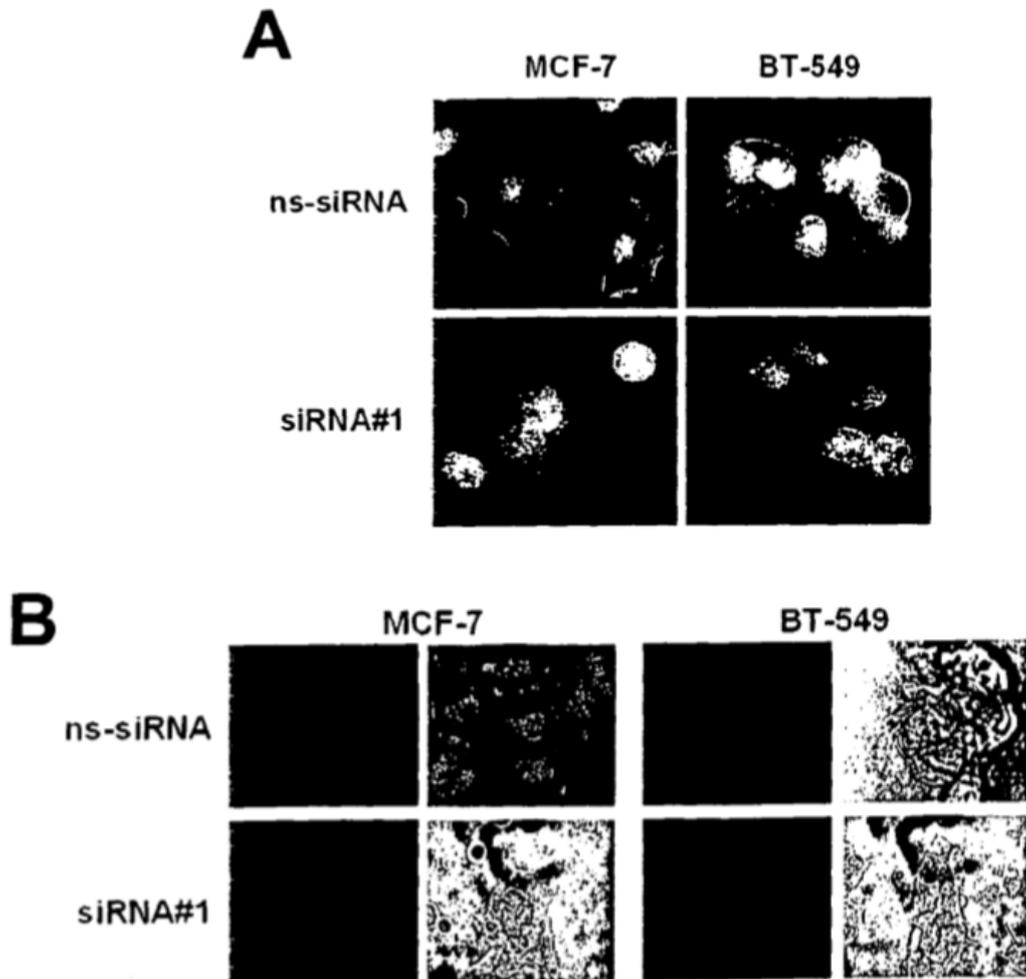


Fig. 3

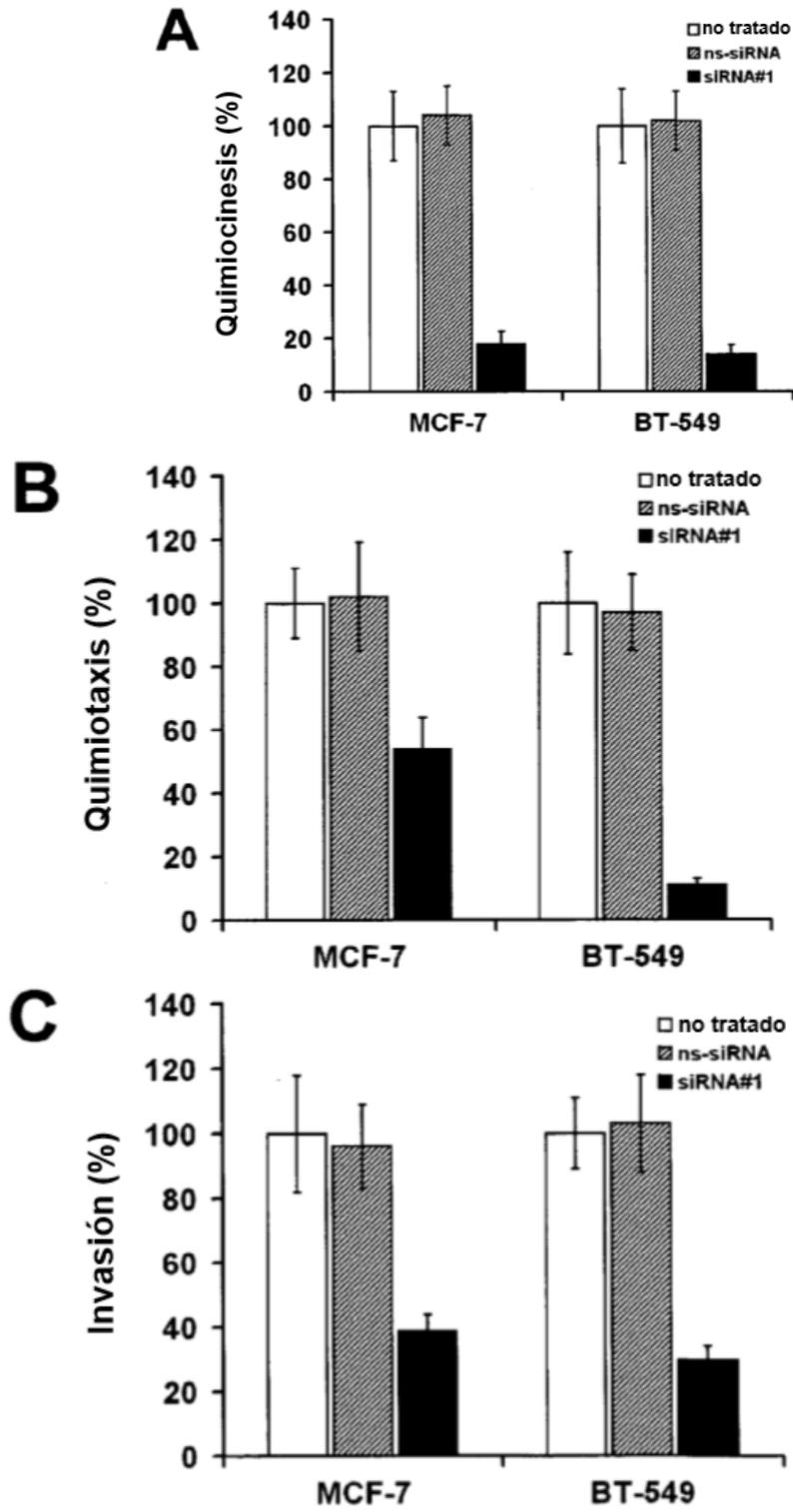


Fig. 4

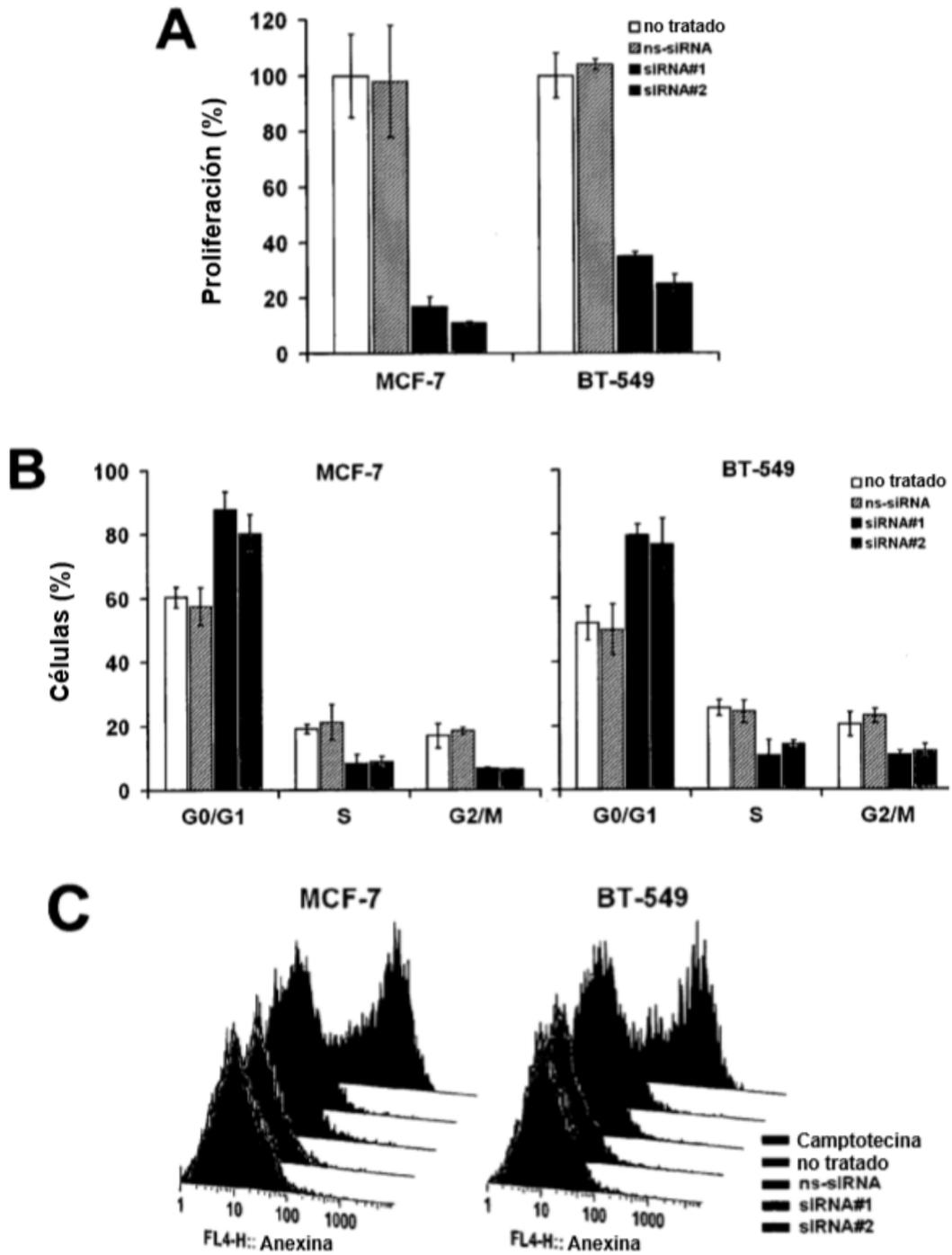


Fig. 5

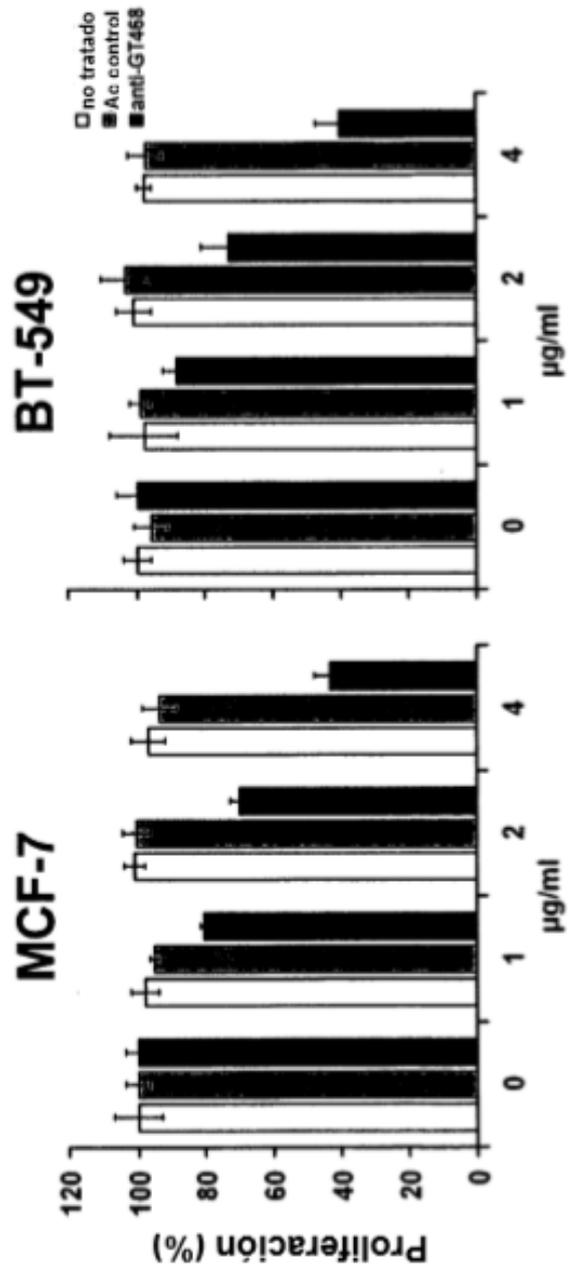


Fig. 6

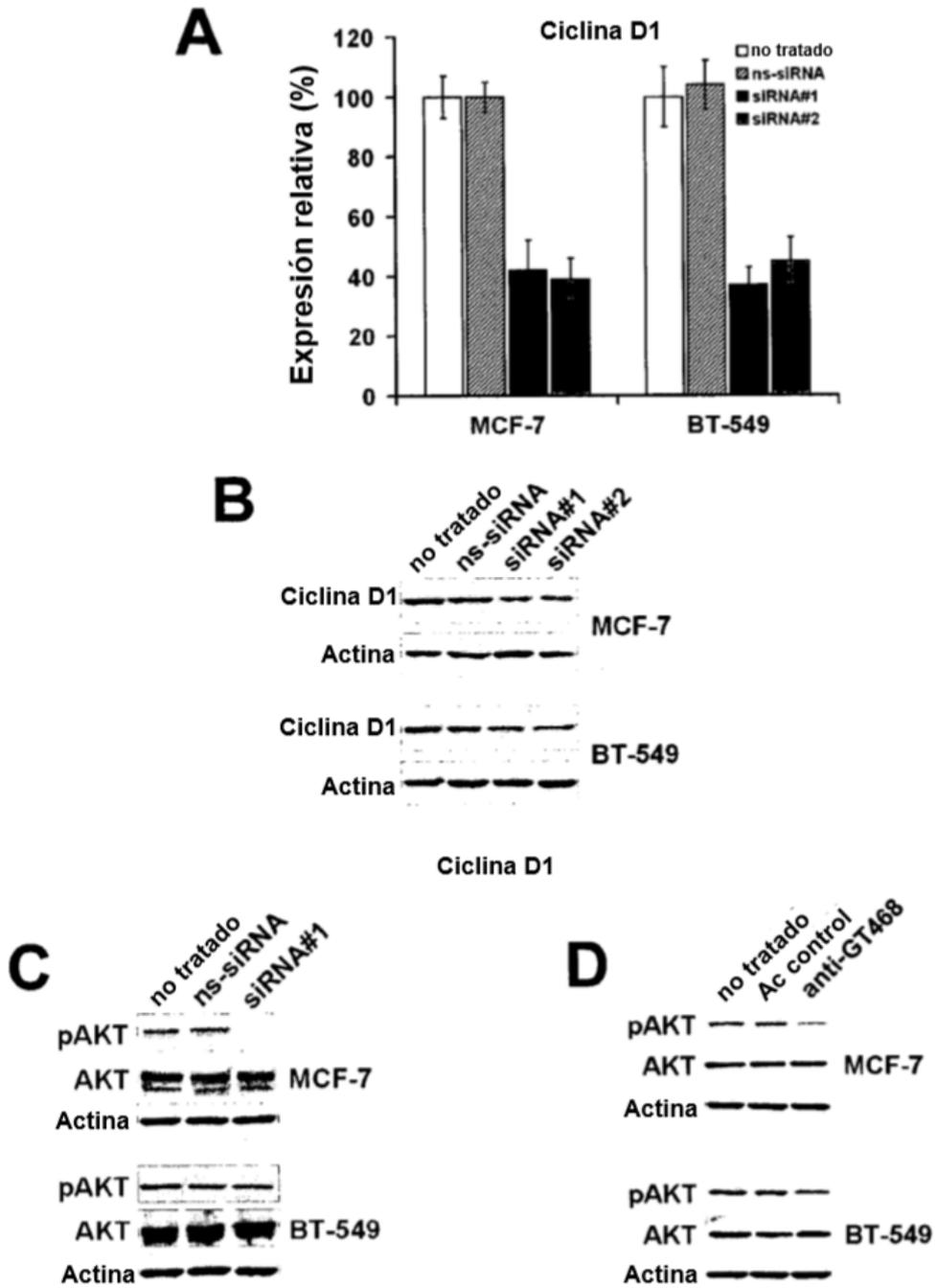


Fig. 7

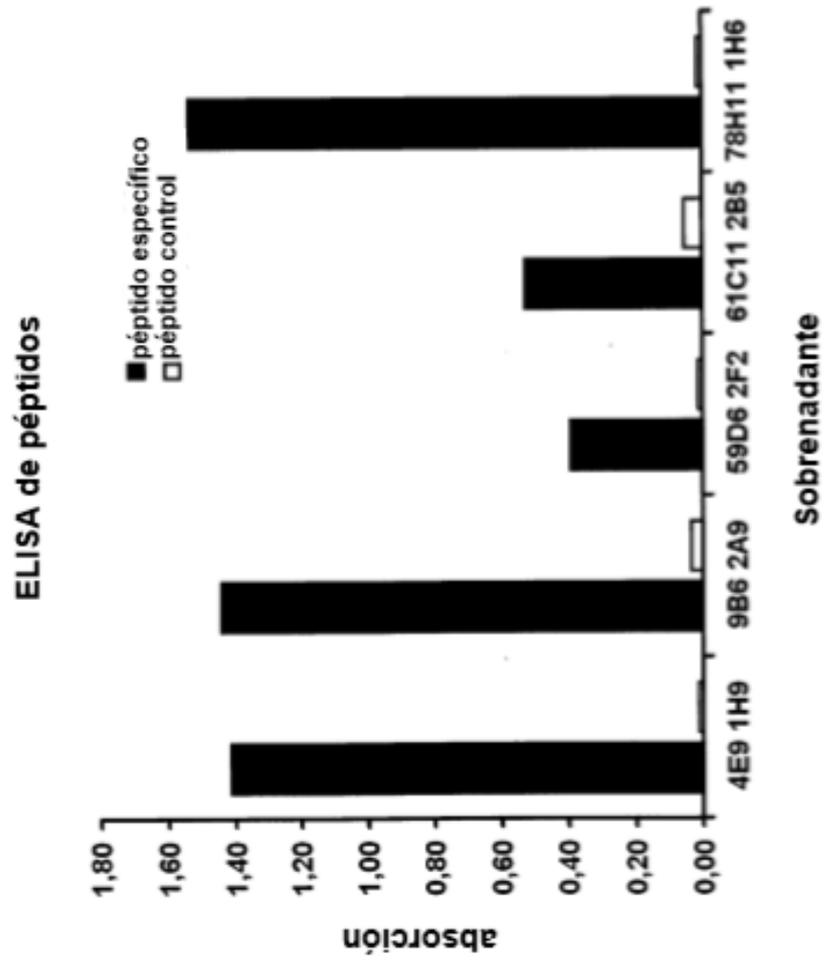


Fig. 8

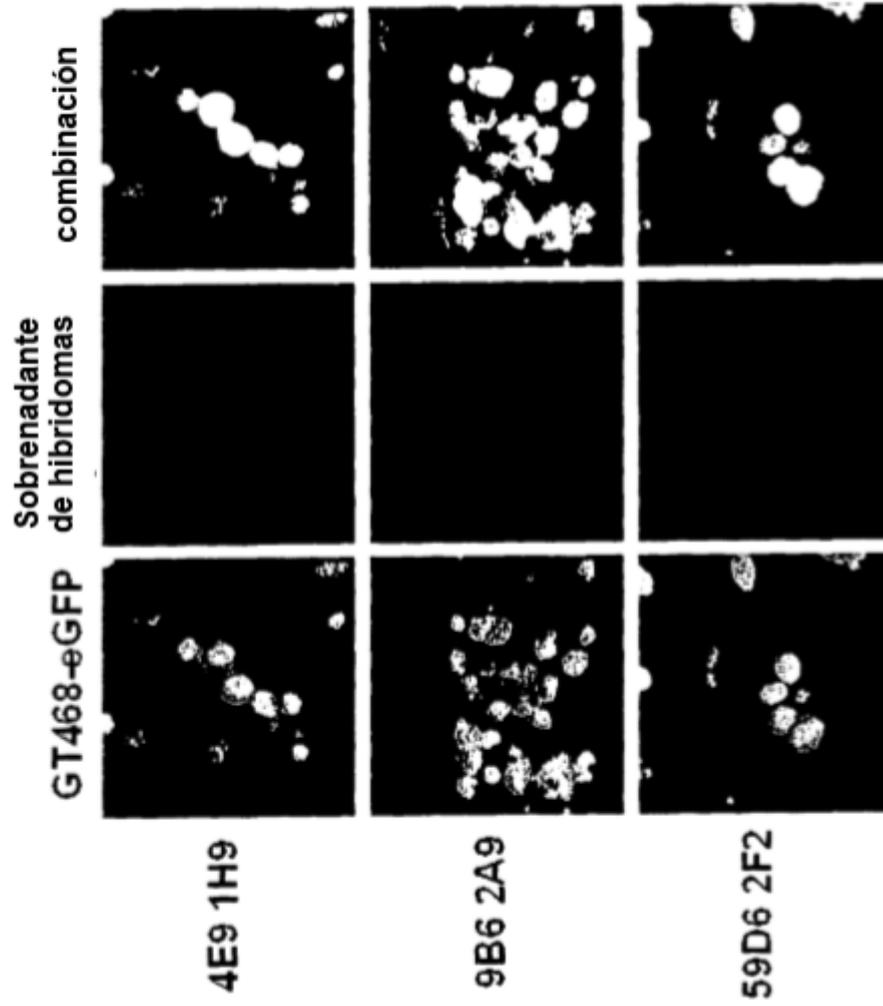


Fig. 9

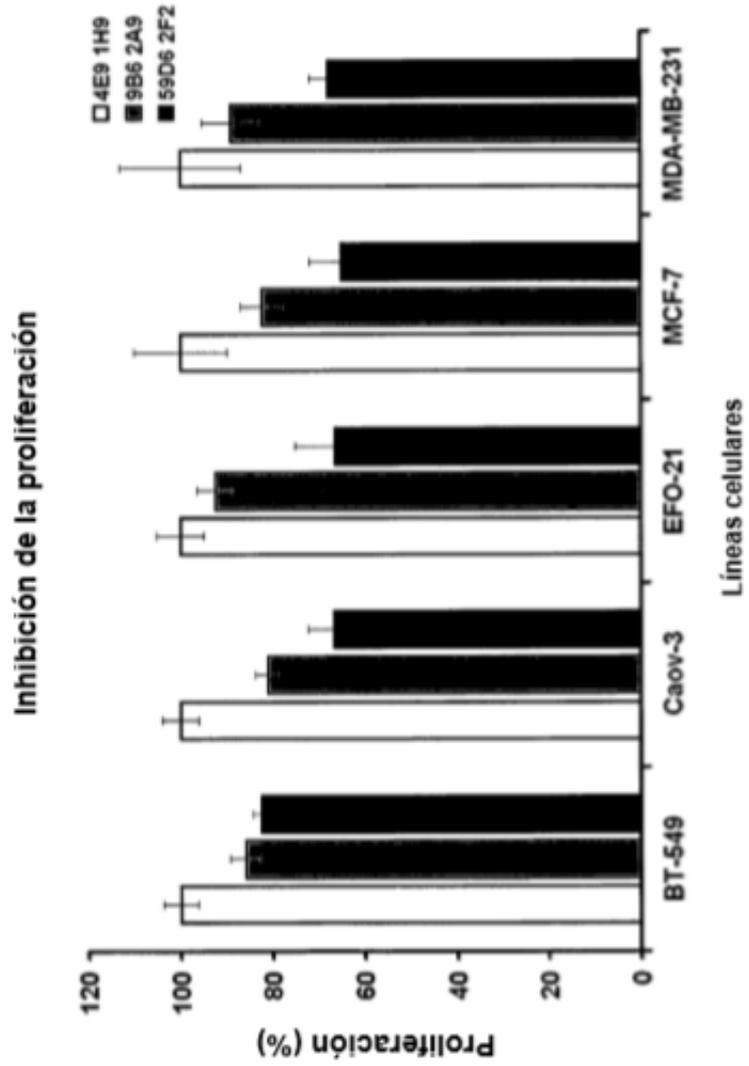


Fig. 10

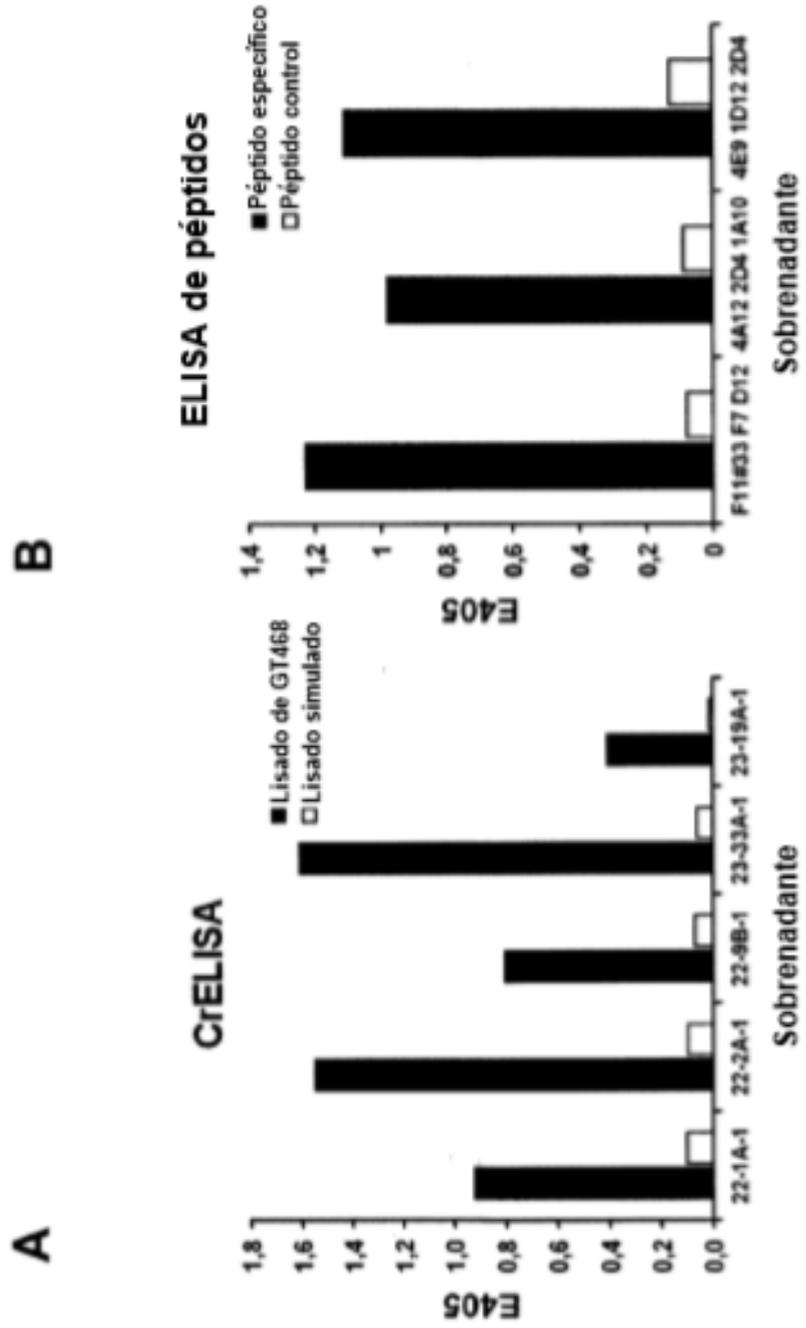


Fig. 11

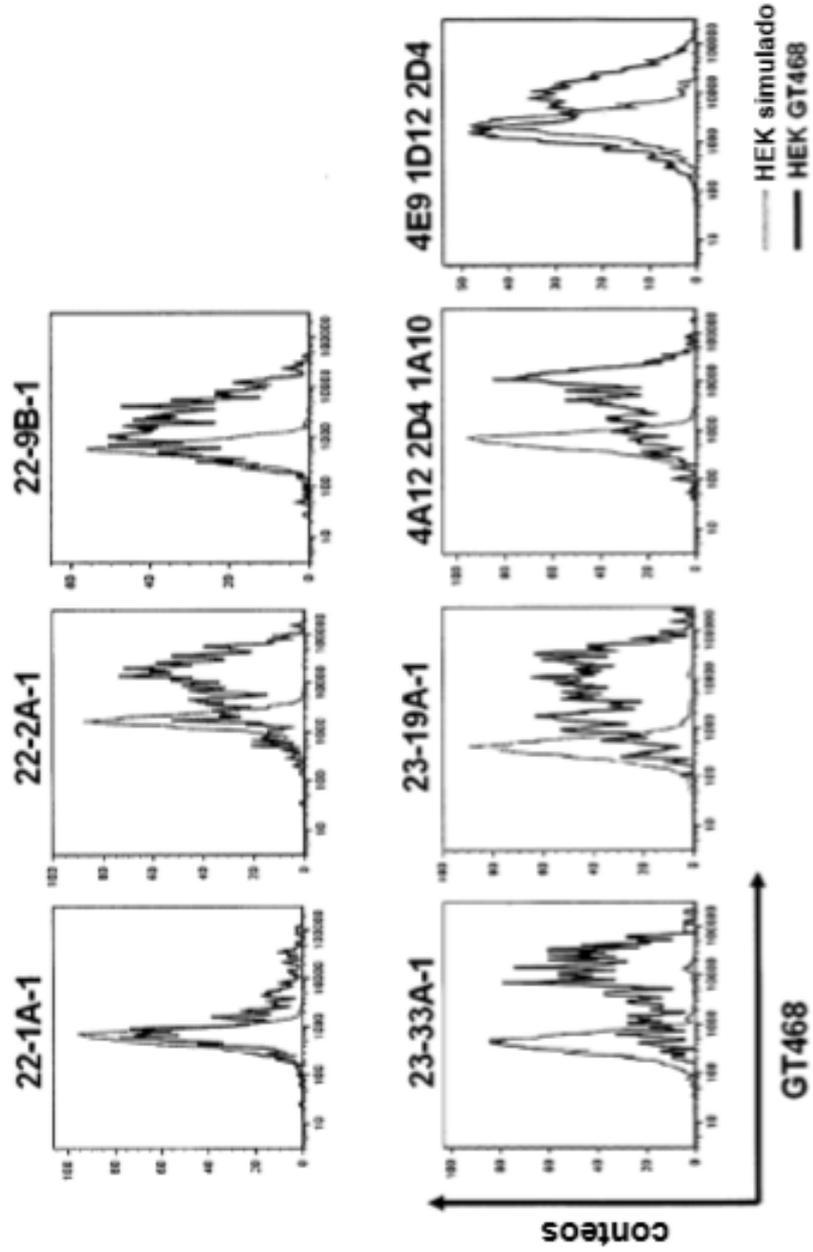


Fig. 12

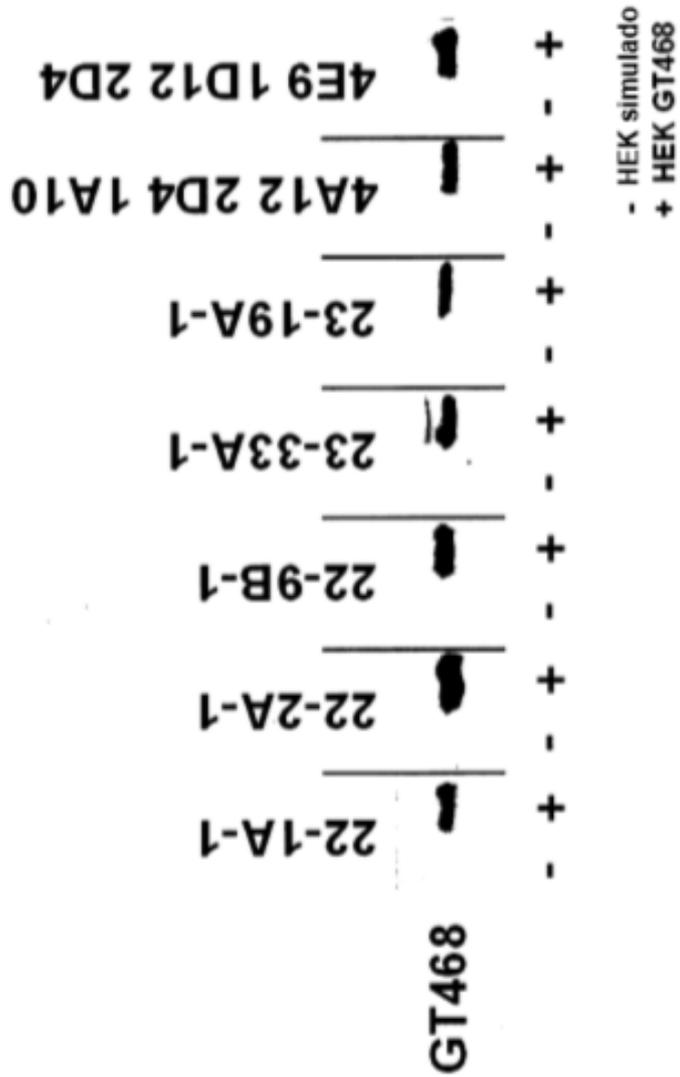


Fig. 13

Péptido	Secuencia	Péptido	Secuencia
1	MKVFKFIGLMILLTS	26	SSKGTPSKFVIPVSC
2	KFIGLMILLTSAFSA	27	TPSKFVIPVSCAAPQ
3	LMILLTSAFSAGSGQ	28	FVIPVSCAAPQKSPW
4	LTSAFSAGSGQSPMT	29	VSCAAPQKSPWLTKP
5	FSAGSGQSPMTVLC	30	APQKSPWLTKPCSMR
6	SGQSPMTVLC SIDWF	31	SPWLTKPCSMRVASK
7	PMTVLC SIDWFMVTV	32	TKPCSMRVASKSRAT
8	LCSIDWFMVTVHFPF	33	SMRVASKSRATAQKD
9	DWFMVTVHFPMLNND	34	ASKSRATAQKDEKCY
10	VTVHFPMLNNDVCVH	35	RATAQKDEKCYEVFS
11	PFMLNNDVCVHFHEL	36	QKDEKCYEVFSLSQS
12	NNDVCVHFHELHLGL	37	KCYEVFSLSQSSQRP
13	CVHFHELHLGLGCPP	38	VFSLSQSSQRPNCDC
14	HELHLGLGCPPNHVQ	39	SQSSQRPNCDCPPCV
15	LGLGCPPNHVQPHAY	40	QRPNCDCPPCVFSEE
16	CPPNHVQPHAYQFTY	41	CDCPPCVFSEEEHTQ
17	HVQPHAYQFTYRVTE	42	PCVFSEEEHTQVPCH
18	HAYQFTYRVTECGIR	43	SEEEHTQVPCHQAGA
19	FTYRVTECGIRAKAV	44	HTQVPCHQAGAQAQ
20	VTECGIRAKAVSQDM	45	PCHQAGAQAQPLQP
21	GIRAKAVSQDMVIYS	46	AGAQAQPLQPSHFL
22	KAVSQDMVIYSTEIH	47	EAQPLQPSHFLDI SE
23	QDMVIYSTEIHYSK	48	LQPSHFLDI SEDWSL
24	IYSTEIHYSKGTSP	49	HFLDI SEDWSLHTDD
25	EIHYSKGTSPSKFVI	50	ISEDWSLHTDDMIGS
		51	SEDWSLHTDDMIGSM

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

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

Fig. 14

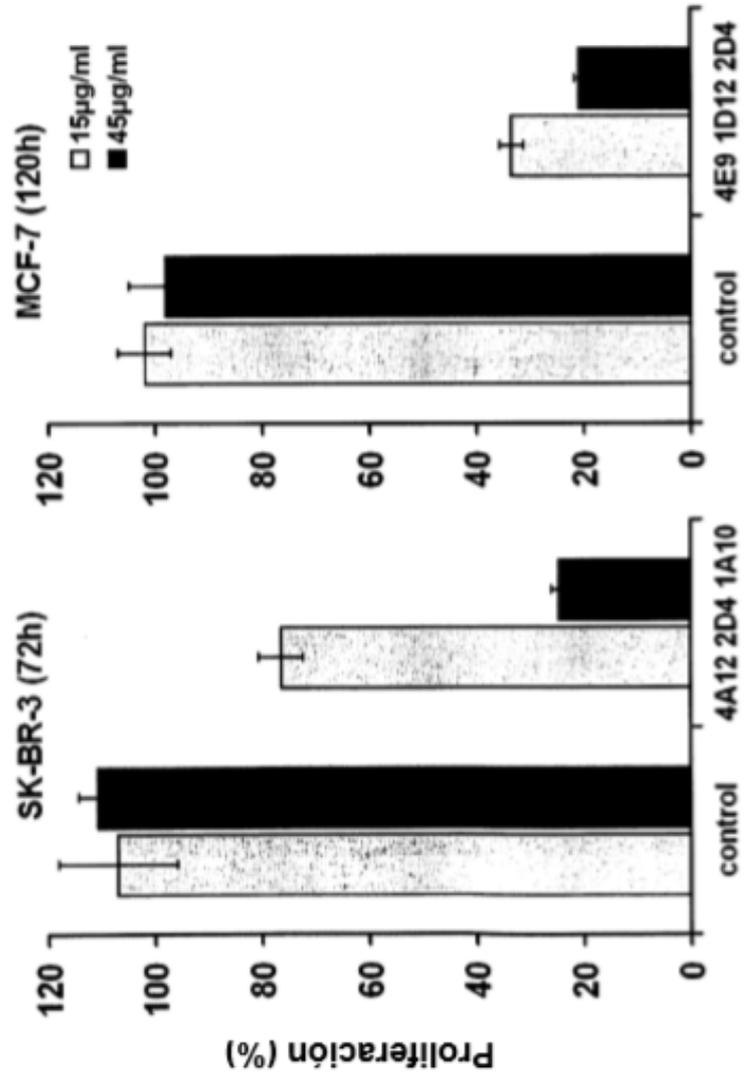


Fig. 15

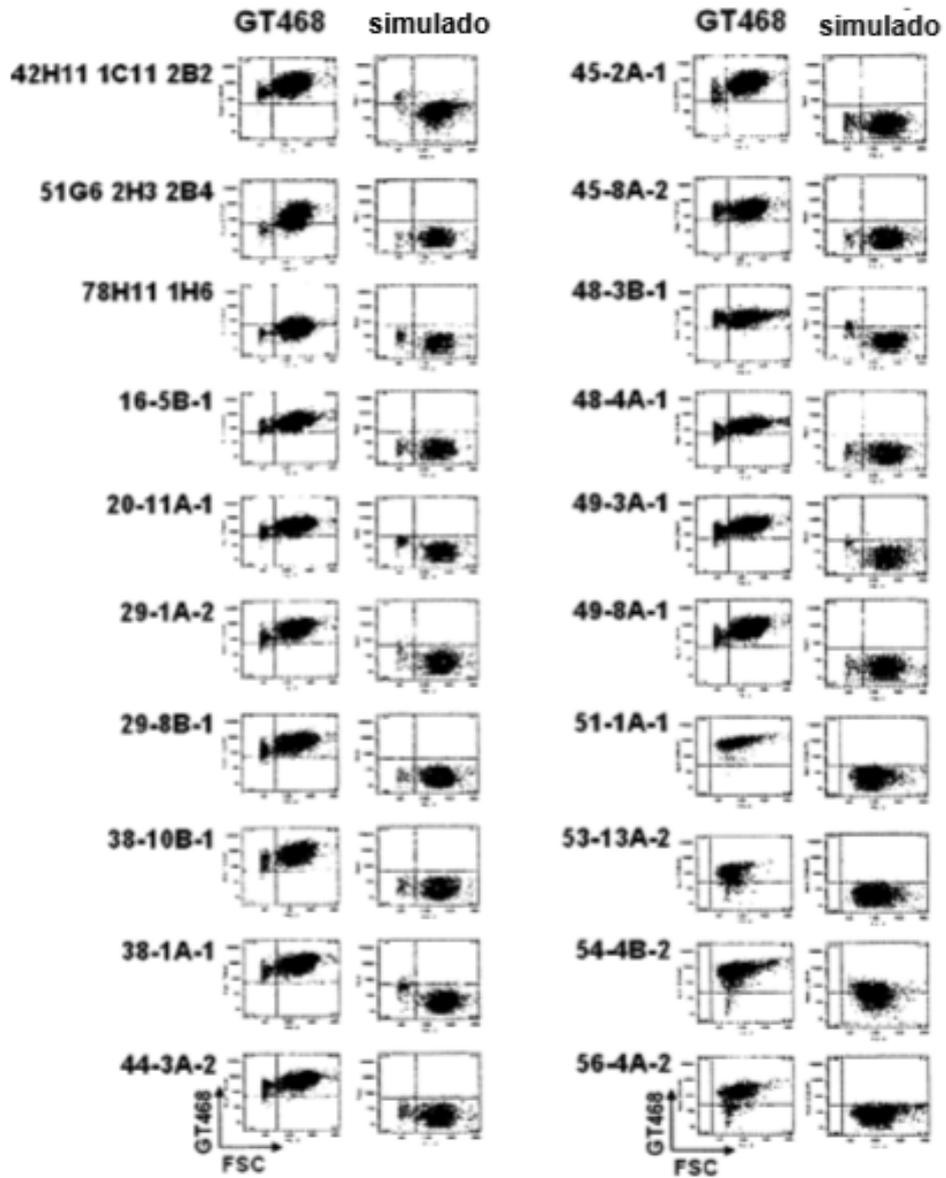


Fig. 16A

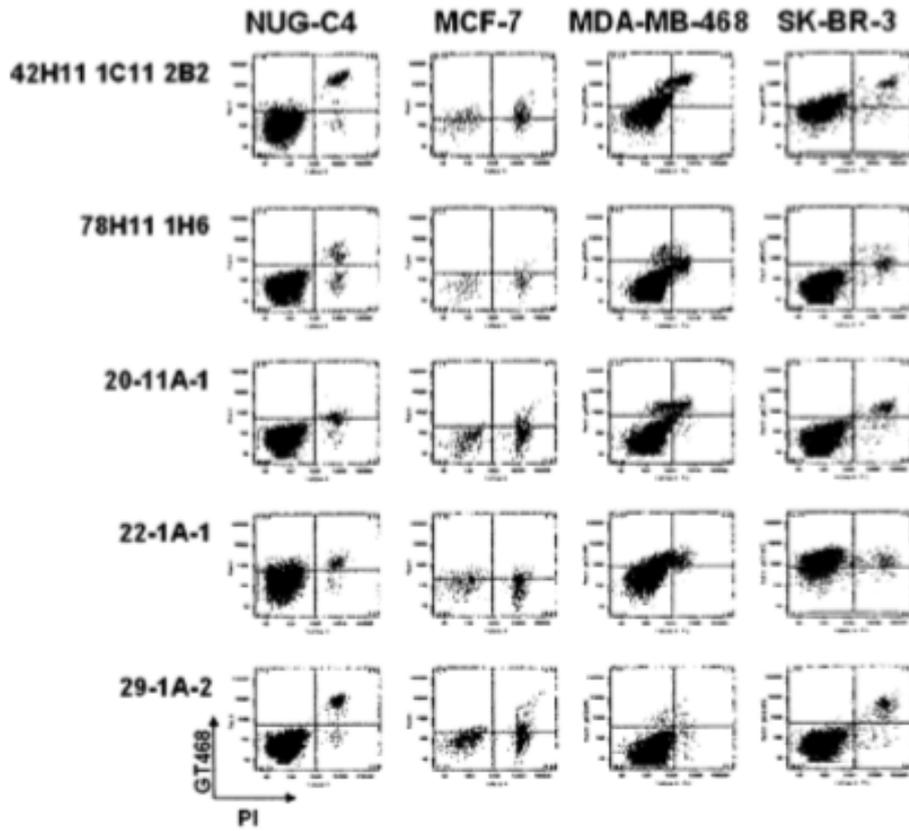


Fig. 16B

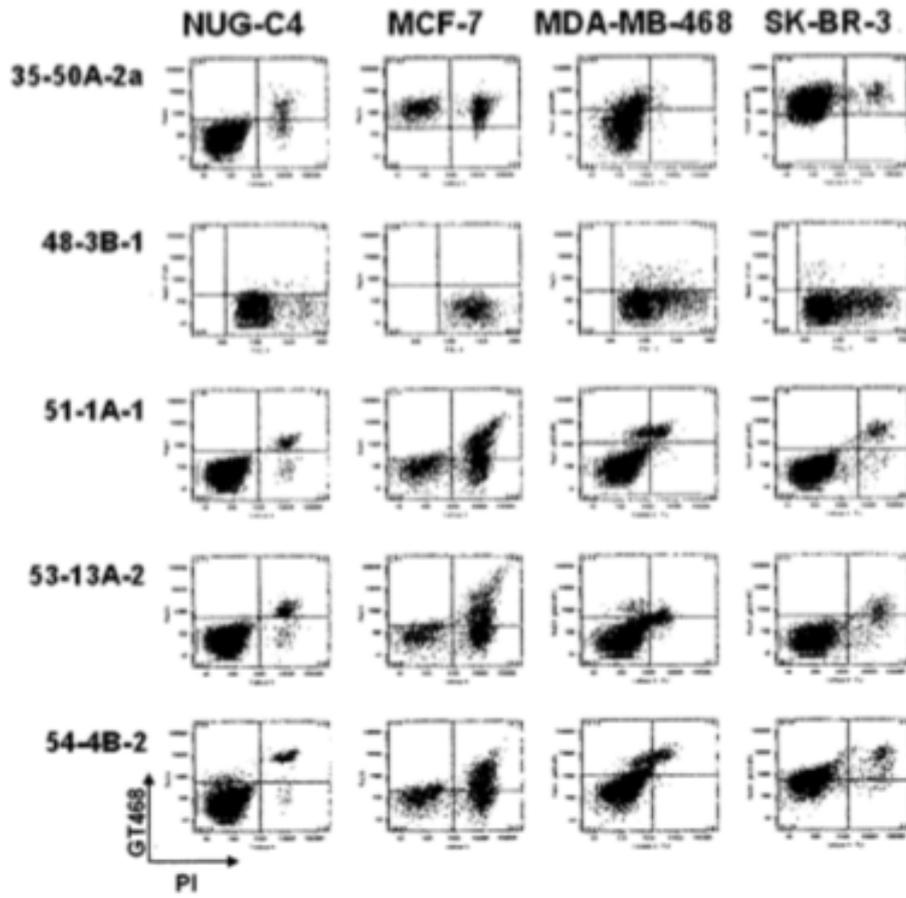


Fig. 17

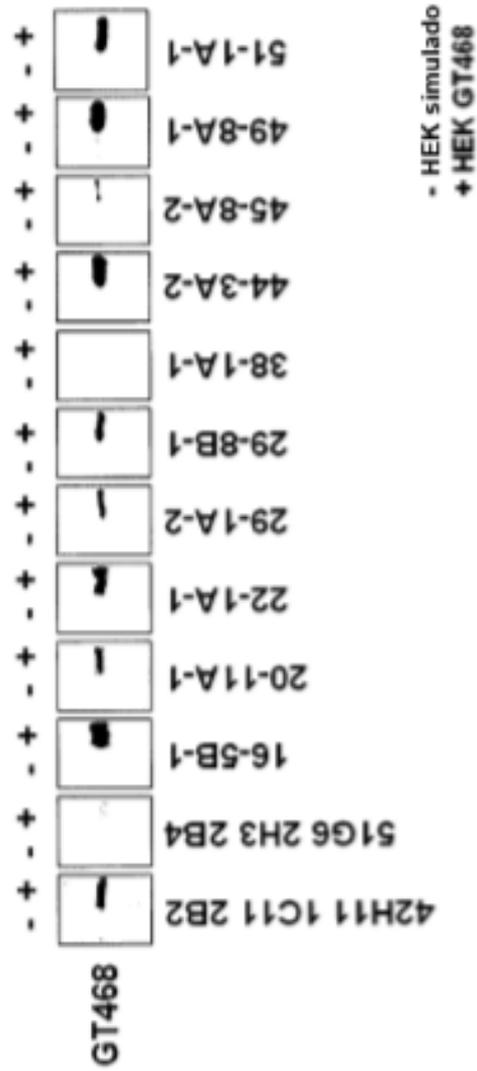


Fig. 18

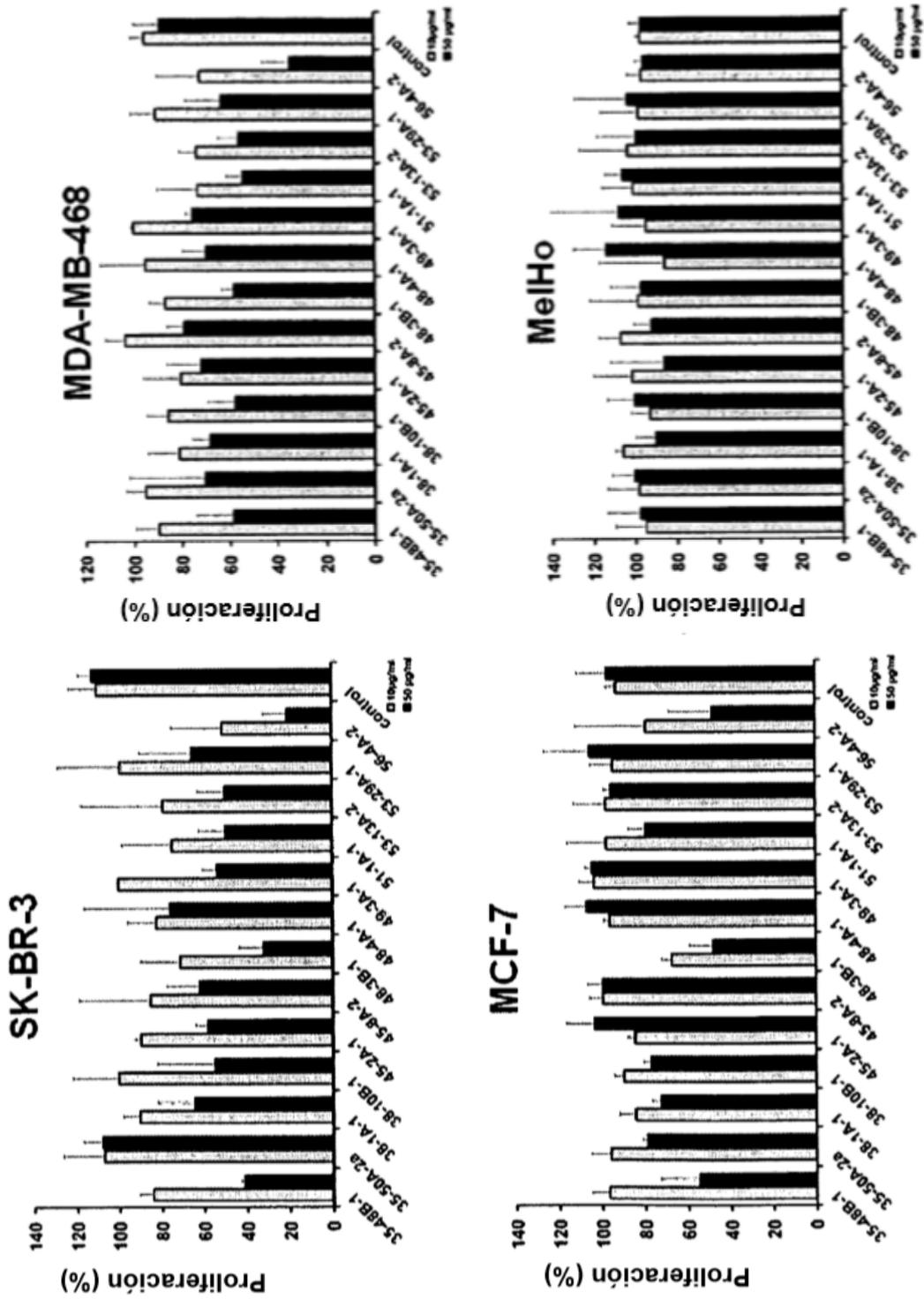


Fig. 19

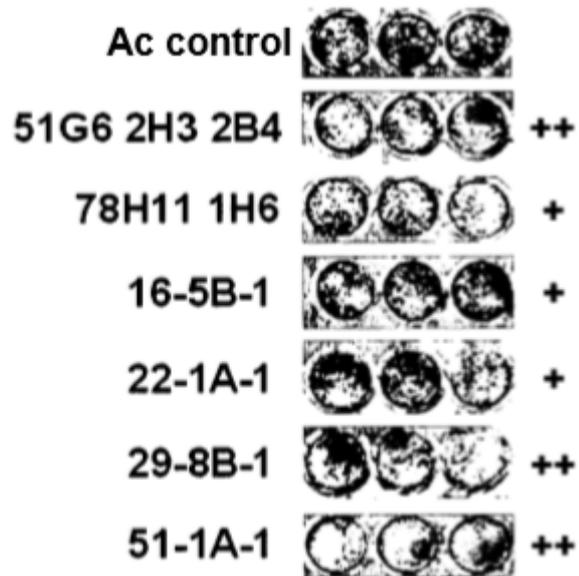


Fig. 20A

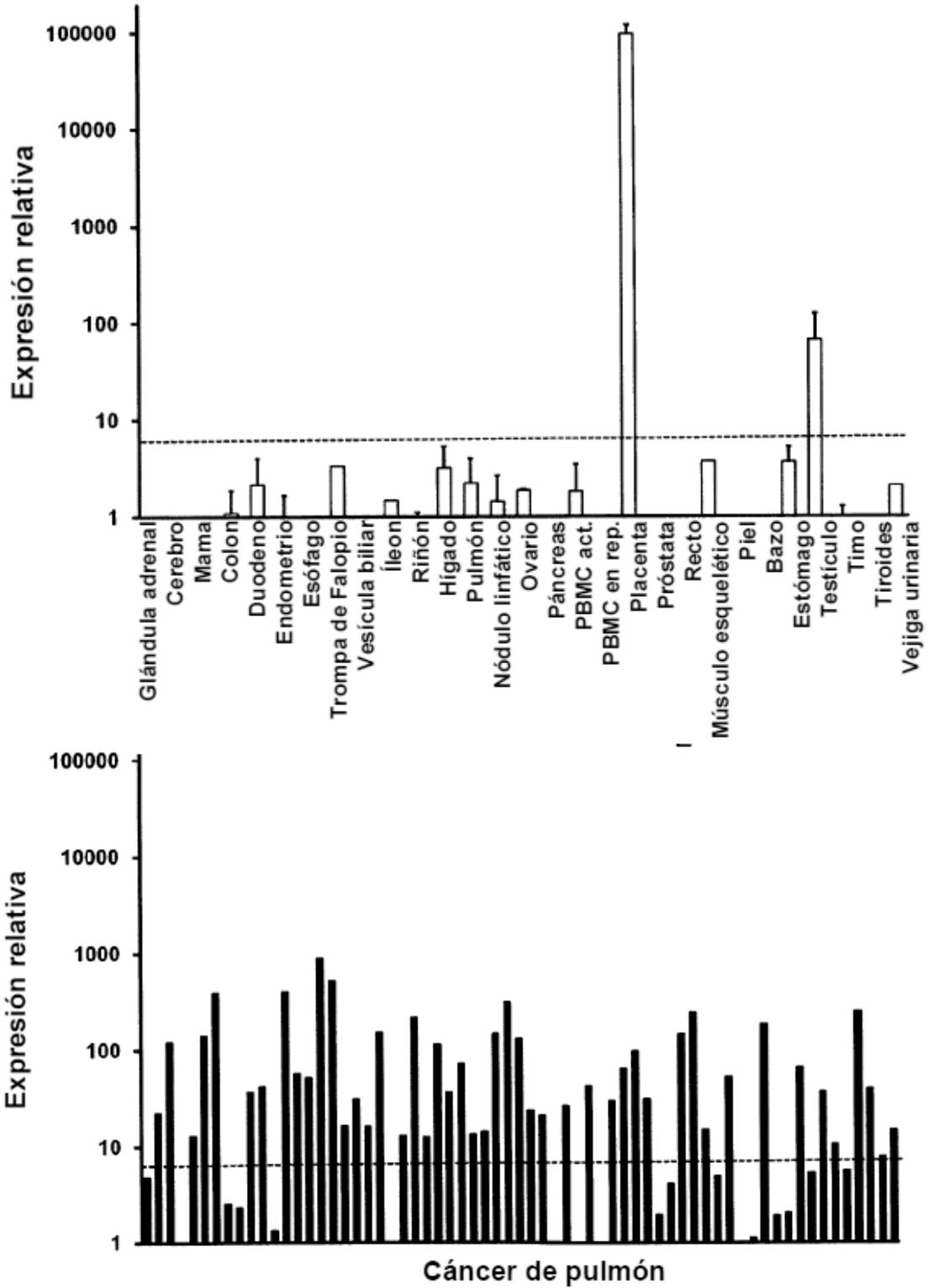


Fig. 20B

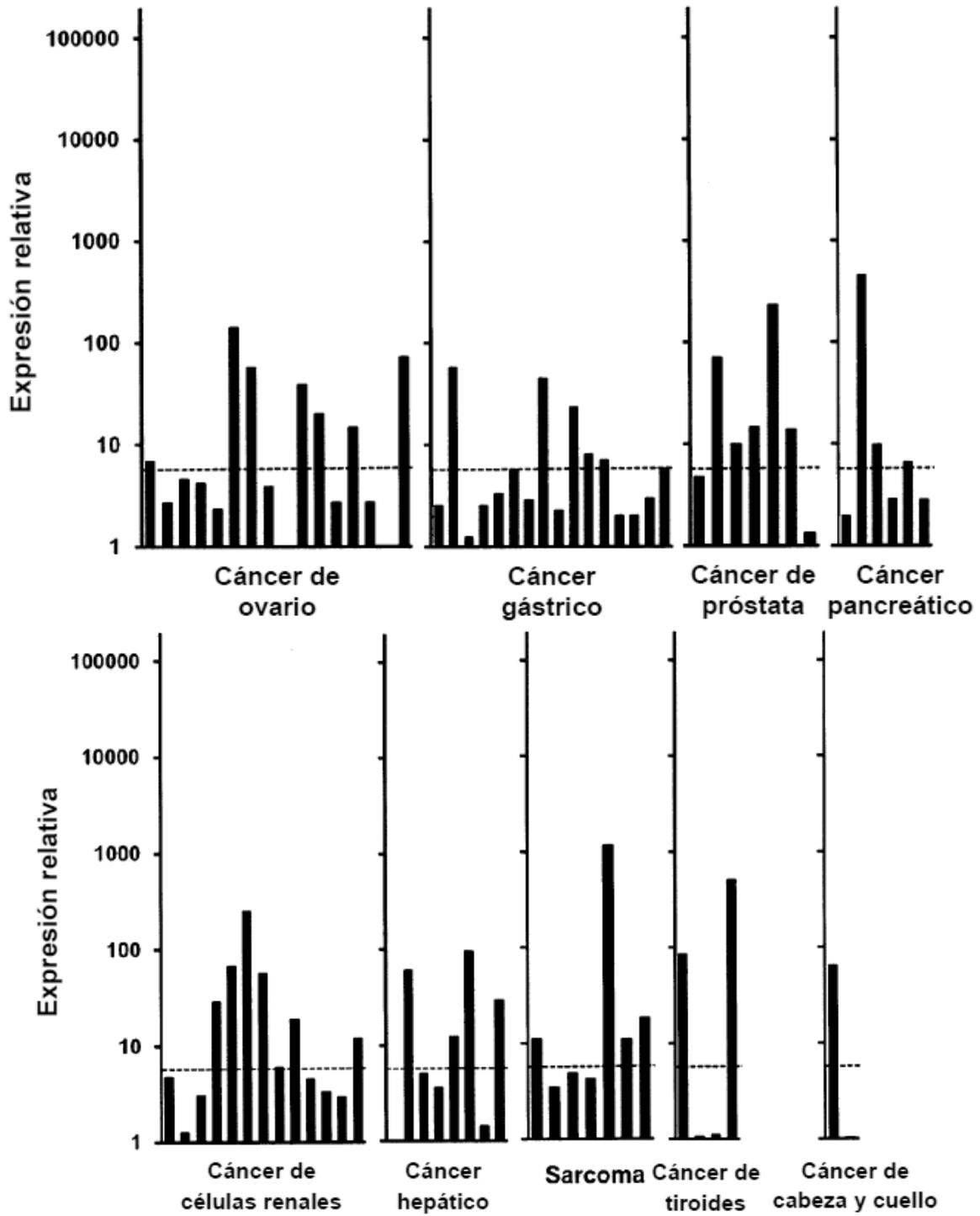


Fig. 21

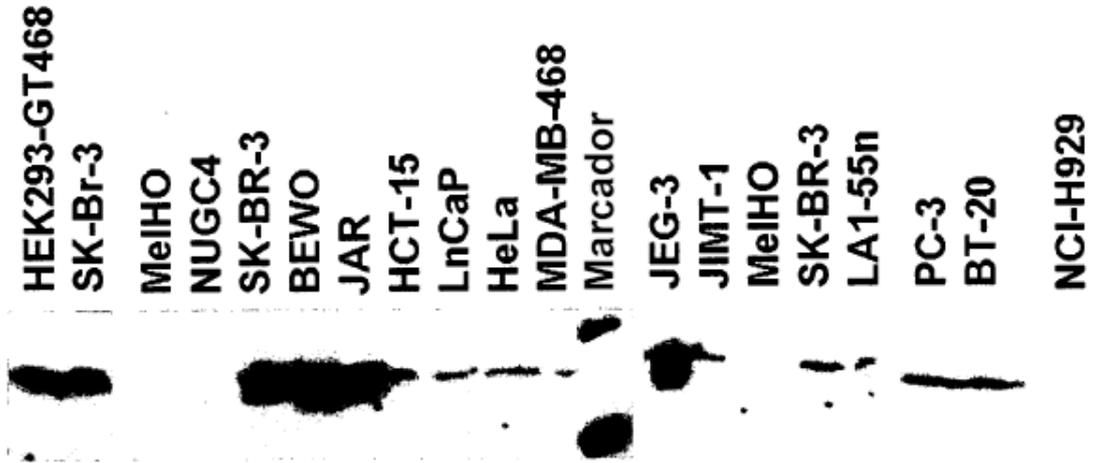


Fig. 22

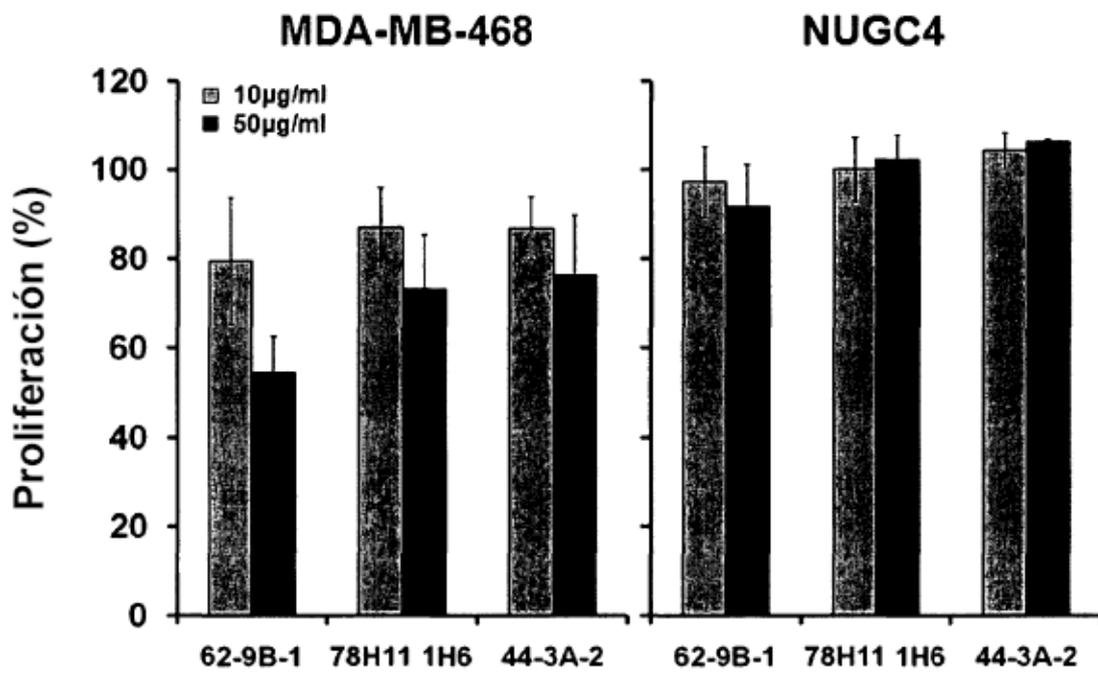


Fig. 23

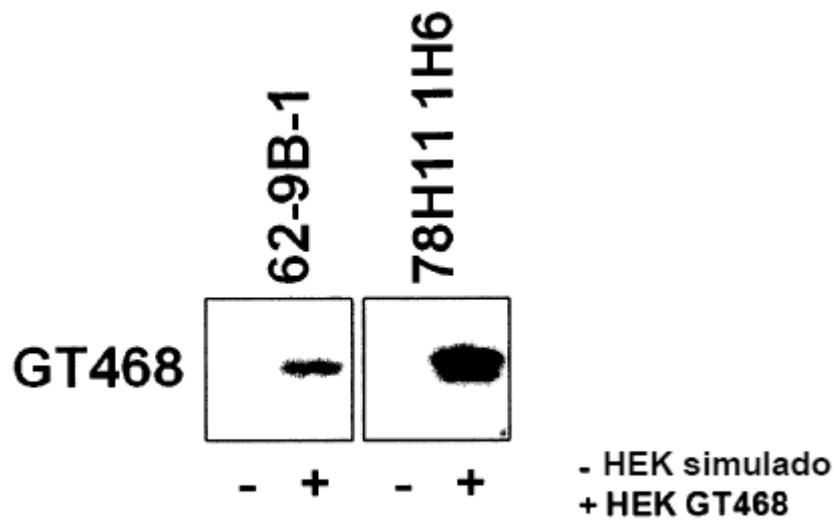


Fig. 24

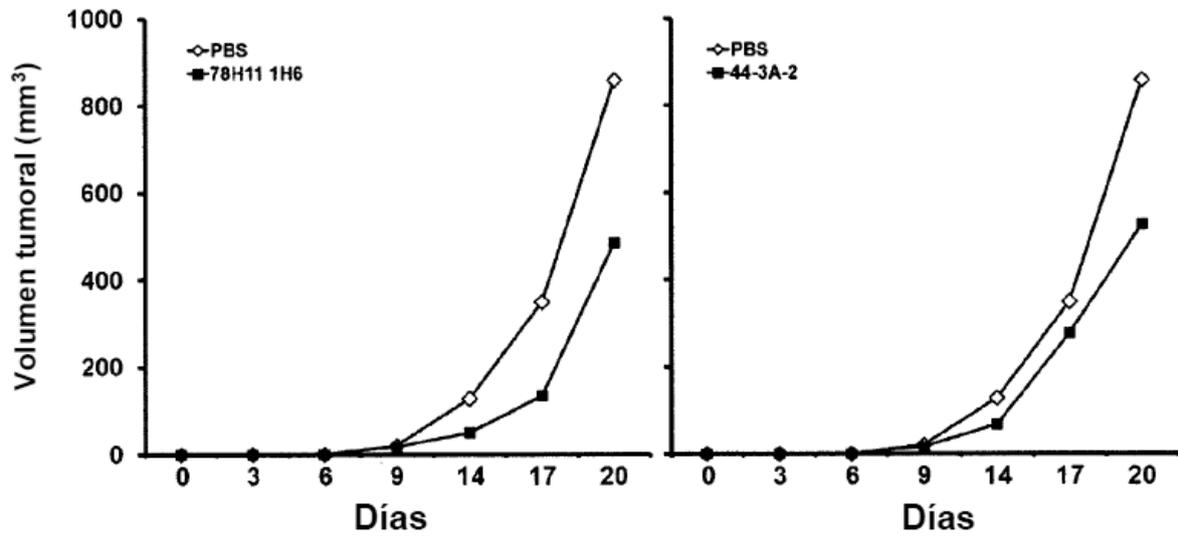


Fig. 25

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

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

Hibridoma	Reactividad (secuencia)
78H11 1H6	WSLHTDDMIGSM
3E5 2G4	29,30
4A5 1E11 1B7	29,30
7H12 2E6 2C4	29,30
11D7 1G10 2B4	29,30
18-2A-1	47,48
63-1A-2	32-34

Fig. 26A

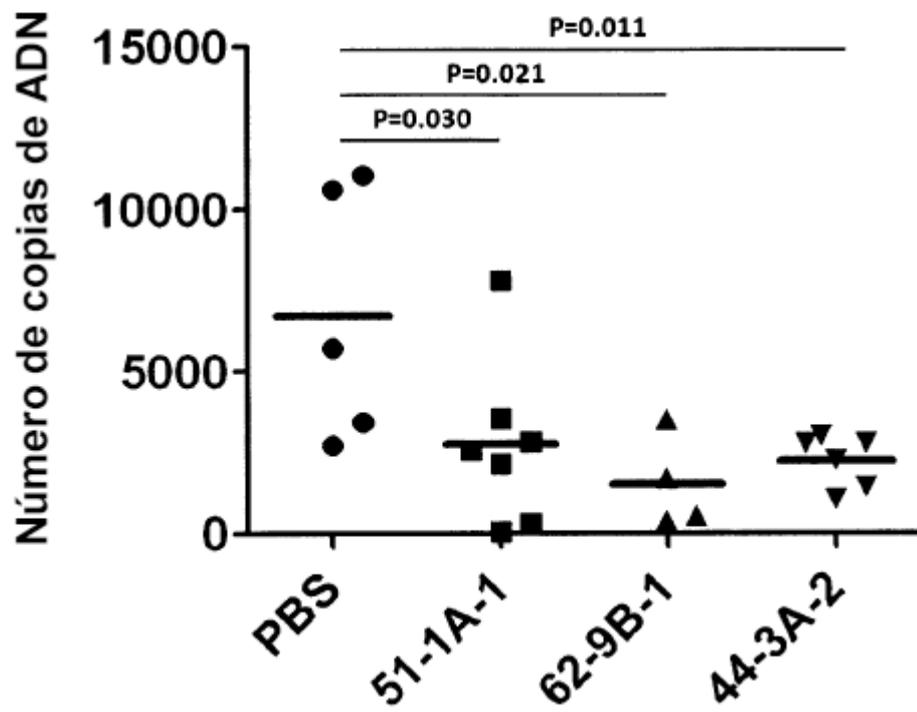


Fig. 26B

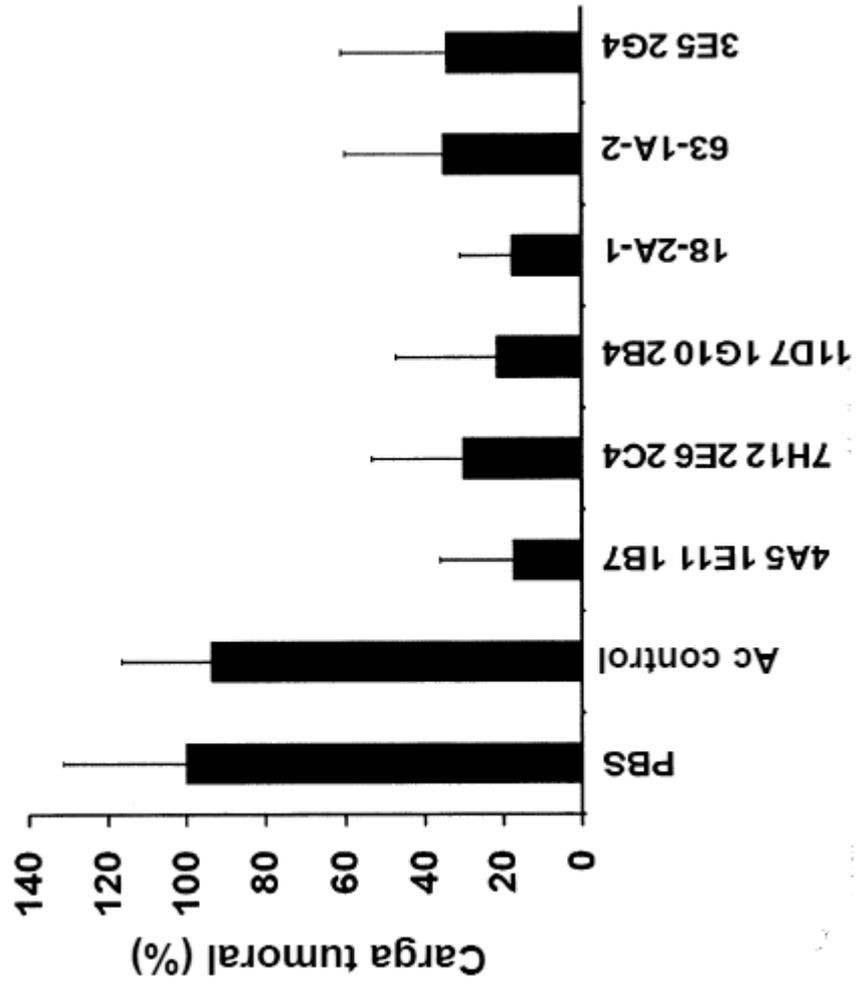


Fig. 27

