

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 734 886**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)
C07K 16/46	(2006.01)
C12N 15/13	(2006.01)
C07K 14/775	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.11.2010 PCT/CA2010/001882**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.06.2011 WO11063523**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.2010 E 10832474 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 2504363**

54 Título: **Anticuerpos anti-clusterina y fragmentos de unión a antígeno y su uso para reducir el volumen tumoral**

30 Prioridad:

24.11.2009 US 263865 P

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

12.12.2019

73 Titular/es:

**ALETHIA BIOTHERAPEUTICS INC. (50.0%)
141 Avenue Président-Kennedy, Suite SB-5100
Montréal, Québec H2X 1Y4, CA y
NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**TREMBLAY, GILLES BERNARD;
FILION, MARIO y
SULEA, TRAIAN**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

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

ES 2 734 886 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 anti-clusterina y fragmentos de unión a antígeno y su uso para reducir el volumen tumoral

5 Campo de la invención

La invención se refiere a anticuerpos anti-clusterina y a su uso para reducir el volumen tumoral. La invención se refiere más particularmente a anticuerpos humanizados, anticuerpos híbridos y fragmento de unión a antígeno que se unen a clusterina y a su uso para reducir el volumen tumoral, para inhibir el crecimiento y la metástasis tumorales.

10

Antecedentes de la invención

Los carcinomas, la malignidad humana más común, surgen de células epiteliales. La progresión de los cánceres epiteliales comienza con la alteración de los contactos célula-célula así como la adquisición de un fenotipo migratorio (de tipo mesenquimatoso). Se considera que este fenómeno, que se denomina transición epitelio-mesenquima (EMT), es un evento crucial en la progresión tumoral de fase tardía y la metástasis.

15

La proteína secretada TGF- β suprime el crecimiento tumoral inicialmente en gran medida debido a su acción de inhibición del crecimiento sobre células tumorales de origen epitelial, entonces en fases posteriores promueve la progresión de células tumorales y la metástasis. Un mecanismo mediante el que la TGF- β puede promover la progresión tumoral es a través de la inducción de una EMT.

20

Debido al papel doble que desempeña la TGF- β en la carcinogénesis, inhibidores directos de la TGF- β pueden ser arriesgados, porque aunque pueden ser beneficiosos en tumores de fase tardía, también pueden acelerar lesiones preneoplásicas. Un mejor agente terapéutico puede ser uno que inhiba la acción de promoción de EMT prooncogénica de TGF- β , al tiempo que deja la acción de inhibición del crecimiento del supresor tumoral de TGF- β inalterada. Para desarrollar un inhibidor de este tipo, sería necesario identificar el punto en el que hay una bifurcación de la ruta de señalización de TGF- β , de modo que los mediadores en una rama de la ruta participan en la respuesta de EMT, pero no en la respuesta de inhibición del crecimiento para TGF- β . Los agentes terapéuticos que inhiben los mediadores que se encuentran exclusivamente en la rama de promoción de EMT de la ruta de señalización de TGF- β reducirá la metástasis al tiempo que tiene poco o ningún efecto sobre la aceleración de lesiones preneoplásicas.

25

30

No se ha identificado generalmente ningún componente específico de la ruta de señalización de TGF- β que promueva o medie en la acción de promoción de EMT de TGF- β , ni esté implicado en la acción de inhibición del crecimiento de TGF- β . Por el contrario, se ha identificado una proteína endógena (el factor nuclear YY1) que puede interferir con (en oposición a promover) la acción de EMT protumorigénica de TGF- β , al tiempo deja intacta la acción de supresión de tumores (inhibición del crecimiento) (Kurisaki *et al.*, 2004).

35

Se conocen inhibidores que seleccionan como diana ligandos de TGF- β , receptores y las proteínas de señalización de Smad. Específicamente, los ectodominios de receptores solubles, anticuerpos y otras proteínas de unión pueden actuar como antagonistas mediante la interacción con ligandos de TGF- β y secuestrarlos alejándolos de los receptores de la superficie celular. Están disponibles moléculas pequeñas que inhiben la actividad cinasa del receptor de TGF- β de tipo I y también se conocen inhibidores endógenos de las proteínas de señalización de Smad.

45

Dado que todos estos componentes de la ruta de señalización están implicados en acciones tanto pro- como anticarcinogénicas de TGF- β , estos inhibidores que los seleccionan como diana pueden ser beneficiosos para tumores de fase tardía, sin embargo, también pueden acelerar las lesiones preneoplásicas.

50

La solicitud de patente internacional n.º PCT/CA2006/001505 presentada el 13 de septiembre de 2006 y publicada el 22 de marzo de 2007 con el n.º WO2007/030930 describe anticuerpos anti-clusterina y fragmentos de unión a antígeno que van dirigidos a un epítipo específico de clusterina y que pueden inhibir la transición epitelio-mesenquima de células de carcinoma. Esta solicitud de patente muestra más particularmente la capacidad de anticuerpos anti-clusterina de inhibir la EMT en carcinoma de próstata y carcinoma de mama.

55

Los anticuerpos anti-clusterina se conocen ampliamente y algunos de ellos se describen previamente por Lenferink *et al.*, 2009 (Oncogene vol. 29, n.º 6; p. 831-844), Sanders *et al.*, 1993 (Molecular Biology of Cell, American Society for Cell Biology vol. 4, supl.; p. 109), Ying-Chun *et al.*, 2008 (J celular & molecular immunology, vol. 24, n.º 1; p. 45-48) y Humphreys *et al.*, 1997 (Biochemistry vol. 36 n.º 49; p. 15233-15243). Sin embargo, la humanización de anticuerpos anti-clusterina ha sido un problema persistente e incluso en momentos de enseñanzas mejoradas en cuanto a la humanización, por ejemplo, en Tsurushita *et al.*, 2005 (Methods, vol. 36; p. 69-83) seguía existiendo una necesidad de soluciones y mejoras alternativas.

60

65

Sumario de la invención

La presente invención se refiere en un aspecto de la misma a un anticuerpo que es capaz de unirse específicamente a clusterina y que comprende una región variable de cadena ligera humanizada y una región variable de cadena pesada humanizada.

Más particularmente, la presente invención proporciona un anticuerpo humanizado de un anticuerpo parental no humano que puede unirse específicamente a clusterina así como anticuerpos híbridos y fragmento de unión a antígeno de los mismos.

Los anticuerpos humanizados o híbridos de la presente invención comprenden una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada que pueden incluir residuos de aminoácido de región de determinación de la complementariedad no humana y residuos de aminoácido de región de entramado humana de un anticuerpo humano natural.

La presente invención también se refiere a un fragmento de unión a antígeno que comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada, que pueden incluir residuos de aminoácido de región de determinación de la complementariedad no humana y residuos de aminoácido de región de entramado humana.

Los anticuerpos y el fragmento de unión a antígeno de la presente invención pueden usarse para inhibir la transición epitelio-mesénquima inducida por clusterina.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un anticuerpo anti-clusterina para su uso en la reducción del volumen tumoral y a métodos para hacer esto.

También están abarcados por la presente invención ácidos nucleicos aislados que codifican para la región variable de cadena ligera y/o la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado, el anticuerpo híbrido o el fragmento de unión a antígeno descritos en el presente documento o el anticuerpo aislado descrito en el presente documento.

También está abarcado por la misma un vector o constructo, que comprende el ácido nucleico descrito en el presente documento. Según la presente invención, el vector puede ser, por ejemplo, y sin limitación, un vector de expresión de mamífero, un vector de expresión bacteriano, etc.

La invención también se refiere a células que comprenden o que expresan el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente invención o que comprenden los ácidos nucleicos o vectores de la presente invención.

En aún un aspecto adicional, la presente invención proporciona un kit que comprende un vial o viales que pueden comprender, por ejemplo, el anticuerpo humanizado descrito en el presente documento, el anticuerpo híbrido descrito en el presente documento, el fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento, el anticuerpo aislado descrito en el presente documento, el ácido nucleico aislado descrito en el presente documento o el vector descrito en el presente documento.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que puede comprender, por ejemplo, el anticuerpo humanizado descrito en el presente documento, el anticuerpo híbrido descrito en el presente documento, el fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento o el anticuerpo aislado descrito en el presente documento y un portador farmacéuticamente aceptable.

Aún otro aspecto de la invención se refiere a una terapia de combinación que incluye la composición farmacéutica descrita en el presente documento y un agente quimioterápico.

También están abarcados por la misma métodos de producción de anticuerpos humanizados o híbridos anti-clusterina o fragmentos de unión a antígeno así como un método de tratamiento de una enfermedad asociada con la expresión o secreción de clusterina usando los anticuerpos humanizados o híbridos anti-clusterina o fragmentos de unión a antígeno.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Modelo 3D de homología de la región variable del anticuerpo anti-clusterina 16B5 de ratón. Las CDR están marcadas (L1, L2, L3 en la cadena ligera, y H1, H2, H3 en la cadena pesada). Los residuos de entramado de ratón reemplazados por residuos de entramado humanos se indican como modelos de esfera.

Figura 2. Alineación de secuencias del entramado 16B5 de ratón, el 16B5 humanizado y el humano seleccionado (enlaces de la base de datos del NCBI proporcionados). Se muestra la numeración de Kabat en la parte superior. Las CDR están destacadas. Los residuos candidato para retromutaciones se destacan debajo de la

alineación de secuencias según la proximidad a las CDR (5: dentro de 5 Angstrom), exposición superficial (B: enterrado) y contacto con el dominio variable emparejado.

Figura 3. Análisis cinético de anticuerpos anti-clusterina humanizados y murinos 16B5.

Figura 4. h16B5 bloquea la migración de líneas celulares de cáncer. El h16B5 es al menos tan activo como el 16B6 de ratón en el ensayo de rayado frente a células de carcinoma de mama de ratón. La figura muestra la capacidad de los anticuerpos en diversas configuraciones para bloquear la migración de las células *in vitro*.

Figura 5. La inhibición de h16B5 reduce la invasividad de las células de cáncer de próstata humanas. El fondo de placas de 12 pocillos se cubrió con 200 μ l de Matrigel con factor de crecimiento reducido (Becton Dickinson). Se resuspendieron las células ($2,5 \times 10^4$) en 200 μ l de Matrigel, que se estratificó encima de esto, y finalmente se añadieron 500 μ l de medio de crecimiento específico de la célula encima del Matrigel. Se añadió h16B5 a cada capa de Matrigel así como el medio en una concentración de 8 μ g/ml. Se incubaron las placas a 37°C durante hasta 3 semanas durante las cuales el medio de crecimiento (+/- h16B5) se repuso semanalmente. Las flechas indican las áreas de células similares a epiteliales.

Figura 6. El tratamiento de tumores de cáncer de próstata con h16B5 reduce el crecimiento de los tumores y aumenta su respuesta a la quimioterapia. Se implantaron células de cáncer de próstata DU145 (2×10^6) de manera subcutánea en ratones SCID y se permitió que crecieron hasta que los tamaños de los tumores eran de aproximadamente 100 mm³. Se midieron los tumores bisemanalmente con un calibre digital y se calcularon los volúmenes de tumor como $L \times W \times H$. Cada grupo contenía 8 animales que se aleatorizaron antes de comienzo de los tratamientos. Los resultados se expresaron como mm³ \pm SEM. Se calcularon los valores de P usando la prueba de la T de Student.

Figura 7. – borrada

Figura 8. – borrada

Figura 9. – borrada

Figura 10. h16B5 inhibe el crecimiento de tumores de próstata PC-3. Se implantaron células de cáncer de próstata PC-3 (2×10^6) de manera subcutánea en ratones SCID y se permitió que crecieron hasta que los tamaños de los tumores eran de aproximadamente 100 mm³. Se midieron los tumores bisemanalmente con un calibre digital y se calcularon los volúmenes de tumor como $L \times W \times H$. Cada grupo contenían 8 animales que se aleatorizaron antes del comienzo de los tratamientos. Los resultados se expresan como mm³ \pm SEM.

Figura 11. La clusterina se expresa en tumores pancreáticos humanos. Se hicieron crecer tumores derivados de líneas celulares de cáncer pancreático (según se indique) en ratones SCID, se recogieron, se fijaron en formalina, se seccionaron y se examinaron usando inmunohistoquímica con h16B5. La tinción positiva se visualizó mediante métodos convencionales usando un anticuerpo secundario conjugado con HRP. El control negativo se realizó en condiciones idénticas con un anticuerpo control de isotipo.

Figura 12. H16B5 inhibe la migración de líneas celulares de cáncer pancreático. Se sembraron células PANC-1 en medio libre de suero en la cámara superior de una placa Transwell de 24 pocillos que contenía una barrera de Matrigel. Los pocillos inferiores se llenaron con medio que contenía 10% FBS como quimioatrayente. Tras una incubación de 24 h en presencia o ausencia de TGF β y/o h16B5 (según se indique), se tiñeron y contaron el número de células en la capa de Matrigel.

Figura 13. La clusterina secretada se internaliza en células de cáncer. Se expresó clusterina humana recombinante en células 293-6E, se purificó y se marcó con Alexa Fluor 488 usando un kit de marcaje comercial (Invitrogen). Se sembraron células de carcinoma de mama de ratón BRI-JM01 en cubreobjetos y se trataron con 250 ng/ml de clusterina secretada marcada. En los momentos indicados, se lavaron las células con PBS helado y se fijaron en paraformaldehído al 2%. Se montaron los portaobjetos con Antifade Gold y se generaron imágenes con un microscopio de fluorescencia.

Figura 14. H16B5 inhibe la internalización de clusterina secretada en células de cáncer. El experimento se realizó tal como se describe para la Figura 13. Se añadió H16B5 a 10 μ g/ml.

Figura 15. Muestra la región de homología entre clusterina humana (NP_001822) y clusterina murina (NP_038520).

Figura 16. Muestra la unión de h16B5 (marcado como AB-16B5 en la figura) a clusterina murina que se expresa en secciones congeladas fijadas generadas a partir de tumores de mama de ratón 4T1. El experimento se realizó usando inmunohistoquímica y la detección se llevó a cabo usando un anticuerpo secundario conjugado con HRP.

Descripción detallada de la invención

5 La presente invención se refiere en un aspecto de la misma a anticuerpos que pueden unirse específicamente a clusterina y que comprenden una región variable de cadena ligera humanizada y una región variable de cadena pesada humanizada.

10 La secuencia de clusterina humana puede encontrarse en el número de registro RefSeq; NM_001831.2 (id. de proteína= NP_001822) mientras que la secuencia de clusterina murina puede encontrarse en el número de registro RefSeq; NM_013492.2 (id. de proteína= NP_038520).

15 Los anticuerpos o el fragmento de unión a antígeno de la presente invención pueden unirse a la forma murina y/o la humana de clusterina. Los anticuerpos o el fragmento de unión a antígeno de la presente invención también pueden unirse a un variante que se produce de manera natural así como a variantes sintéticos de clusterina que tienen, por ejemplo, al menos el 75% (por ejemplo, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 99%) de identidad de aminoácidos con la clusterina humana o murina.

20 Por tanto, la presente invención proporciona un anticuerpo humanizado de un anticuerpo parental no humano que puede unirse específicamente a clusterina o un fragmento de unión a antígeno del mismo así como fragmentos de unión a antígeno del mismo.

Según una realización de la invención, el anticuerpo humanizado puede inhibir (reducir) el crecimiento de células tumorales que expresan o secretan clusterina.

25 Según una realización adicional de la invención, el anticuerpo humanizado puede reducir el volumen de un tumor que comprende células que expresan o secretan clusterina.

Según otra realización de la invención, el anticuerpo humanizado puede inhibir (reducir) la migración o invasión de células tumorales que expresan o secretan clusterina.

30 Por tanto, según aún otra realización de la invención, el anticuerpo humanizado puede inhibir (reducir) la metástasis que se produce a partir de células tumorales que expresan o secretan clusterina.

35 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para reducir el volumen de un tumor que comprende células que expresan clusterina que puede comprender administrar un anticuerpo anti-clusterina a un mamífero que lo necesite. El método contempla más particularmente administrar un anticuerpo humanizado.

40 El término "anticuerpo" se refiere a un anticuerpo intacto, a anticuerpos monoclonales, (completa o parcialmente) humanizados, híbridos, quiméricos o policlonales así como a anticuerpos humanos aislados. El término "anticuerpo" también abarca anticuerpos multiespecíficos tales como anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos humanos están compuestos habitualmente de dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas que comprenden cada una regiones variables y regiones constantes. La región variable de cadena ligera comprende 3 CDR, identificadas en el presente documento como CDRL1, CDRL2 y CDRL3 flanqueadas por regiones de entramado. La región variable de cadena pesada comprende 3 CDR, identificadas en el presente documento como CDRH1, CDRH2 y CDRH3 flanqueadas por regiones de entramado.

45 El término "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo que comprende desde una hasta seis CDR que comprenden residuos de aminoácido de CDR no humana y una parte sustancial de su región de entramado de cadena pesada y/o cadena ligera que es del repertorio de anticuerpos humanos. En algún caso, la totalidad de la región de entramado de cadena pesada y/o cadena ligera del anticuerpo humanizado puede ser idéntica a la de un anticuerpo que se codifica (puede codificarse) por el repertorio de anticuerpos humanos (un anticuerpo humano natural). En otros casos, la región de entramado de cadena pesada y/o cadena ligera del anticuerpo humanizado puede comprender desde uno hasta treinta aminoácidos del anticuerpo no humano que se pretende humanizar y siendo la parte restante de un anticuerpo humano natural. En casos adicionales, el anticuerpo humanizado puede comprender desde 1 hasta 6 CDR completamente no humanas y a menudo las seis CDR son completamente no humanas. En aún otros casos, un "anticuerpo humanizado" puede comprender una región constante que es o humana o de otro origen (de un mamífero).

50 El término "anticuerpo híbrido" se refiere a un anticuerpo que comprende una de su región variable de cadena pesada o ligera (su cadena pesada o ligera) que está humanizada o es de un anticuerpo humano natural (que tienen afinidad por clusterina) mientras que la otra de la región variable de cadena pesada o ligera (la cadena pesada o ligera) sigue siendo no humana.

55 El término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que tiene una(s) región/regiones variable(s) no humanas y una región constante humana.

60 El término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que tiene una(s) región/regiones variable(s) no humanas y una región constante humana.

65 El término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que tiene una(s) región/regiones variable(s) no humanas y una región constante humana.

El término “anticuerpo humano natural” se refiere a un anticuerpo que se codifica (puede codificarse) por el repertorio de anticuerpos humanos, es decir, la secuencia de línea germinal.

Tal como se usa en el presente documento, un anticuerpo humano aislado se “deriva de” una secuencia de línea germinal particular si el anticuerpo se obtiene de un sistema usando secuencias de inmunoglobulina humana, por ejemplo, inmunizando un ratón transgénico que porta genes de inmunoglobulina humana o examinando una biblioteca génica de inmunoglobulina humana. Un anticuerpo humano aislado que se “deriva de” una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana puede identificarse como tal comparando la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano con la secuencia de aminoácidos de inmunoglobulinas de línea germinal humanas. Un anticuerpo humano seleccionado normalmente es al menos idéntico al 90% en la secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos codificada por un gen de inmunoglobulina de línea germinal humana y contiene residuos de aminoácido que identifican el anticuerpo humano como humano en comparación con las secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina de línea germinal de otras especies (por ejemplo, secuencias de línea germinal murinas). En ciertos casos, un anticuerpo humano puede ser idéntico al menos en el 95%, o incluso al menos en el 96%, el 97%, el 98% o el 99% en la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal. Normalmente, un anticuerpo humano derivado de una secuencia de línea germinal humana particular presentará no más de 10 diferencias de aminoácido con respecto a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal humana. En ciertos casos, el anticuerpo humano puede presentar no más de 5, o incluso no más de 4, 3, 2 o 1 diferencia de aminoácido con respecto a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal.

El término “fragmento de unión a antígeno”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse a un antígeno. Se ha mostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término “fragmento de unión a antígeno” de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , C_L y C_{H1} ; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos mediante un puente disulfuro en la región de bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios V_H y C_{H1} ; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un único brazo de un anticuerpo, y (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) Nature 341:544-546), que consiste en un dominio V_H . Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H , se codifican por genes independientes, pueden juntarse, usando métodos recombinantes, mediante un ligador sintético que posibilita que se hagan como cadena polipeptídica individual en la que las regiones V_L y V_H se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase, por ejemplo, Bird *et al.* (1988) Science 242:423-426; y Huston *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). También se pretende que tales anticuerpos de cadena sencilla estén abarcados dentro del término “fragmento de unión a antígeno” de un anticuerpo. Además, los fragmentos de unión a antígeno incluyen proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión que comprenden (i) un polipéptido de dominio de unión (tal como una región variable de cadena pesada, una región variable de cadena ligera, o una región variable de cadena pesada fusionada con una región variable de cadena ligera a través de un péptido ligador) que se fusiona con un polipéptido de región bisagra de inmunoglobulina, (ii) una región constante CH2 de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada con la región bisagra, y (iii) una región constante CH3 de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada con la región constante CH2. La región bisagra puede modificarse reemplazando uno o más residuos de cisteína por residuos de serina para impedir la dimerización. Tales proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión se dan a conocer adicionalmente en los documentos US 2003/0118592 y US 2003/0133939. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se examinan para determinar su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

Un sitio de unión a antígeno típico está compuesto por las regiones variables formadas por el emparejamiento de una inmunoglobulina de cadena ligera y una inmunoglobulina de cadena pesada. La estructura de las regiones variables de anticuerpo es muy consistente y presenta estructuras muy similares. Estas regiones variables está compuestas normalmente por regiones de entramado (FR) relativamente homólogas espaciadas con tres regiones hipervariables denominadas regiones de determinación de la complementariedad (CDR). La actividad de unión global del fragmento de unión a antígeno está dictada a menudo por la secuencia de las CDR. Sin embargo, las FR desempeñan a menudo un papel en la situación y la alineación apropiadas en tres dimensiones de las CDR para una unión a antígeno óptima.

Un anticuerpo humanizado de la presente invención puede comprender una región variable de cadena pesada que puede incluir residuos de aminoácido de región de determinación de la complementariedad no humana y residuos de aminoácido de región de entramado humana de un anticuerpo humano natural y una cadena ligera de complementariedad.

Un anticuerpo humanizado de la presente invención puede comprender una región variable de cadena ligera que puede incluir residuos de aminoácido de región de determinación de la complementariedad no humana y residuos de aminoácido de región de entramado humana de un anticuerpo humano natural y una cadena pesada de complementariedad.

Un anticuerpo humanizado de la presente invención puede inhibir la metástasis, la migración o invasión de células tumorales o puede inhibir el crecimiento de células que expresan clusterina incluyendo, por ejemplo, células de carcinoma. De hecho, el solicitante llegó al descubrimiento inesperado de que los anticuerpos anti-clusterina incluyendo los anticuerpos humanizados de la presente invención reducen el volumen tumoral *in vivo*.
 5 Alternativamente, el anticuerpo humanizado de la presente invención puede usarse para detectar células que expresan clusterina.

El anticuerpo humano natural que se selecciona para la humanización del anticuerpo parental no humano puede comprender una región variable que tiene una estructura tridimensional similar a la de (que puede superponerse a)
 10 una región variable (modelada) del anticuerpo parental no humano. Como tal, el anticuerpo humanizado o híbrido tiene una mayor probabilidad de tener una estructura tridimensional similar a la del anticuerpo parental no humano.

El anticuerpo humanizado de la presente invención tiene una alta afinidad por clusterina. De hecho, se ha mostrado en el presente documento que el anticuerpo humanizado se une a clusterina monomérica recombinante con una
 15 afinidad de $4,49 \times 10^{-9} \text{ M} \pm 8,5 \times 10^{-10}$ o mejor.

Según la presente invención, los residuos de aminoácido de región de entramado humana de la cadena ligera de anticuerpo humanizado son de una región de entramado de cadena ligera de anticuerpo humano natural. La región de entramado de cadena ligera del anticuerpo humano natural seleccionado con fines de humanización, puede
 20 tener, por ejemplo, al menos una identidad del 70% con una región de entramado de cadena ligera del anticuerpo parental no humano. Preferiblemente, el anticuerpo humano natural seleccionado con fines de humanización puede tener el mismo o sustancialmente el mismo número de aminoácidos en su región de determinación de la complementariedad de cadena ligera que el de una región de determinación de la complementariedad de cadena ligera del anticuerpo parental no humano.

En otras realizaciones, los residuos de aminoácido de región de entramado humana de la cadena ligera de anticuerpo humanizado son de una región de entramado de cadena ligera de anticuerpo humano natural que tiene al menos un identidad del 75, del 80, del 83% (o más) con la región de entramado de cadena ligera del anticuerpo
 25 parental no humano.

También según la presente invención, los residuos de aminoácido de región de entramado humana de la cadena pesada de anticuerpo humanizado son de una región de entramado de cadena pesada de anticuerpo humano natural que tiene al menos una identidad del 70% con una región de entramado de cadena pesada del anticuerpo parental no humano. Preferiblemente, el anticuerpo humano natural seleccionado con fines de humanización puede
 30 tener el mismo o sustancialmente el mismo número de aminoácidos en su región de determinación de la complementariedad de cadena pesada que el de una región de determinación de la complementariedad de cadena pesada del anticuerpo parental no humano.

En otras realizaciones, los residuos de aminoácido de región de entramado humana de la cadena pesada de anticuerpo humanizado son de una región de entramado de cadena pesada de anticuerpo humano natural que tiene al menos una identidad del 73, del 75, del 80% con la región de entramado de cadena pesada del anticuerpo parental no humano.
 35

En una realización de la invención, la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado puede por tanto comprender al menos una región de determinación de la complementariedad no humana.
 40

Alternativamente, en otras realizaciones de la invención, la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado puede comprender al menos dos regiones de determinación de la complementariedad no humanas o incluso tres regiones de determinación de la complementariedad no humanas.
 45

En una realización adicional de la invención, la región variable de cadena ligera puede comprender al menos una región de determinación de la complementariedad no humana.
 50

Alternativamente, en realizaciones aún adicionales de la invención, la región variable de cadena ligera comprende al menos dos regiones de determinación de la complementariedad no humanas o incluso tres regiones de determinación de la complementariedad no humanas.
 55

El anticuerpo humanizado puede por tanto comprender ventajosamente las seis CDR del anticuerpo no humano. En el caso de un anticuerpo humanizado divalente, las doce CDR pueden ser del anticuerpo no humano.
 60

Las células que expresan clusterina que pueden detectarse mediante un anticuerpo humanizado comprenden células de carcinoma. El anticuerpo humanizado también puede usarse para inhibir el crecimiento de células que expresan clusterina de carcinoma y especialmente, células de carcinoma humanas. Se ha mostrado que varios tipos de células de carcinoma humanas expresan o secretan clusterina, entre las que están células de carcinoma endometrial, de carcinoma de mama, de carcinoma hepatocelular, de carcinoma de próstata, de carcinoma de células renales, de carcinoma de ovario, de cáncer colorrectal, de carcinoma pancreático, etc.
 65

Una realización a modo de ejemplo de la invención incluye, por ejemplo, el anticuerpo humanizado que comprende residuos de aminoácido de región de entramado humana de la cadena pesada de anticuerpo humano natural tal como se describe en el presente documento y CDR de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en una CDRH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:1, una CDRH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:2 y una CDRH3 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:3. En otra realización a modo de ejemplo, el anticuerpo humanizado puede comprender residuos de aminoácido de región de entramado humana de la cadena pesada de anticuerpo humano natural tal como se describe en el presente documento y al menos dos CDR de cadena pesada seleccionadas del grupo que consiste en una CDRH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:1, una CDRH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:2 y una CDRH3 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:3. Alternativamente, en otra realización a modo de ejemplo, el anticuerpo humanizado de la presente invención puede comprender residuos de aminoácido de región de entramado humana de la cadena pesada de anticuerpo humano natural tal como se describe en el presente documento y una CDRH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:1, una CDRH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:2 y una CDRH3 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:3.

En una realización más específica de la divulgación, el anticuerpo humanizado o híbrido (o cualquier fragmento de unión a antígeno derivado del mismo) puede comprender una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO.:26 (h16B5 VL consenso1):
 DIVMXQSPXSLAVSXGEXXTXXCKSSQSLNLSRTRKNILAWYQQKPGQXPKLLIYWASTRESGVPDRFXGSGSGTD
 FTLTISSXAEDXAVYYCKQSYNLWTFGXGTKLEX K; en la que al menos uno de los aminoácidos identificados con X es una sustitución de aminoácido en comparación con un aminoácido correspondiente en el polipéptido expuesto en SEQ ID NO.:25 (la VL de 16B5 murino). La sustitución de aminoácido puede ser, por ejemplo, conservativa o no conservativa. Según la divulgación, la sustitución de aminoácido puede ser conservativa.

El anticuerpo humanizado o híbrido (o cualquier fragmento de unión a antígeno derivado del mismo) puede comprender una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO.:27 (16B5 VL consenso2):

DIVMX_{a1}QSPX_{a2}SLAVSX_{a3}GEX_{a4}X_{a5}TX_{a6}X_{a7}CKSSQSLNLSRTRKNYLAWYQQKPGQX
{a8}PKLLIYWASTRESGVPDRFX{a9}GSGSGTDFTLTISSX_{a10}QAEDX_{a11}AVYYCKQSYNLW
 TFGX_{a12}GTKLEX_{a13}K;

en la que X_{a1} puede ser un aminoácido hidrófilo neutro tal como, por ejemplo, T o S;

en la que X_{a2} puede ser, por ejemplo, D o S;

en la que X_{a3} puede ser un aminoácido hidrófobo tal como, por ejemplo, L o A;

en la que X_{a4} puede ser un aminoácido básico tal como, por ejemplo, R o K;

en la que X_{a5} puede ser un aminoácido hidrófobo tal como, por ejemplo, A o V;

en la que X_{a6} puede ser un aminoácido hidrófobo como, por ejemplo, I o M;

en la que X_{a7} puede ser, por ejemplo, N o S;

en la que X_{a8} puede ser, por ejemplo, P o S;

en la que X_{a9} puede ser un aminoácido hidrófilo neutro tal como, por ejemplo, S o T;

en la que X_{a10} puede ser un aminoácido hidrófobo tal como, por ejemplo, L o V;

en la que X_{a11} puede ser un aminoácido hidrófobo tal como, por ejemplo, V o L;

en la que X_{a12} puede ser, por ejemplo, Q o G;

en la que X_{a13} puede ser, por ejemplo, I o F y;

en la que la región variable de cadena ligera puede comprender al menos una de las sustituciones de aminoácido anteriores en comparación con SEQ ID NO.:25.

El anticuerpo humanizado o híbrido (o cualquier fragmento de unión a antígeno derivado del mismo) puede comprender una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO.:28 (16B5 VL consenso3):

DIVM_{a1}QSPX_{a2}SLAVSX_{a3}GEX_{a4}X_{a5}TX_{a6}X_{a7}CKSSQSLNLSRTRKNYLAWYQQKPGQX
{a8}PKLLIYWASTRESGVPDRFX{a9}GSGSGTDFTLTISSX_{a10}QAEDX_{a11}AVYYCKQSYNLW
 TFGX_{a12}GTKLEX_{a13}K;

- 5 en la que X_{a1} puede ser, por ejemplo, T o S;
- en la que X_{a2} puede ser, por ejemplo, D o S;
- en la que X_{a3} puede ser, por ejemplo, L o A;
- 10 en la que X_{a4} puede ser, por ejemplo, R o K;
- en la que X_{a5} puede ser, por ejemplo, A o V;
- 15 en la que X_{a6} puede ser, por ejemplo, I o M;
- en la que X_{a7} puede ser, por ejemplo, N o S;
- en la que X_{a8} puede ser, por ejemplo, P o S;
- 20 en la que X_{a9} puede ser, por ejemplo, S o T;
- en la que X_{a10} puede ser, por ejemplo, L o V;
- 25 en la que X_{a11} puede ser, por ejemplo, V o L;
- en la que X_{a12} puede ser, por ejemplo, Q o G;
- en la que X_{a13} puede ser, por ejemplo, I o F y;
- 30 en la que la región variable de cadena ligera puede comprender al menos una de las sustituciones de aminoácido anteriores en comparación con SEQ ID NO.:25.

En otra realización más específica, el anticuerpo humanizado o híbrido (o cualquier fragmento de unión a antígeno derivado del mismo) puede comprender una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO.:30 (16B5 VH consenso 1);

XVQLXQSGAEXXKPGAXVXXSCXXSGFNIKDIYMHVWXQXPXXGLEWXGRIDPA
 YGNTKYDPKFQGX_{b1}TITADTSXX_{b2}TAYXXLSSLX_{b3}SEDTAVYYCARRYDTAMDYWG
 QGTXTVSS;

- 40 en la que al menos uno de los aminoácidos identificados con X es una sustitución de aminoácido en comparación con un aminoácido correspondiente en el polipéptido expuesto en SEQ ID NO.:29 (la VH de 16B5 murino). La sustitución de aminoácido puede ser, por ejemplo, conservativa o no conservativa. Según la invención, la sustitución de aminoácido puede ser conservativa.

El anticuerpo humanizado o híbrido (o cualquier fragmento de unión a antígeno derivado del mismo) puede comprender una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO.:31 (16B5 VH consenso2):

X_{b1}VQLX_{b2}QSGAEX_{b3}X_{b4}KPGAX_{b5}VX_{b6}X_{b7}SCX_{b8}X_{b9}SGFNIKDIYMHVWX_{b10}QX_{b11}PX_{b12}
 X_{b13}GLEWX_{b14}GRIDPAYGNTKYDPKFQGX_{b15}X_{b16}TITADTSX_{b17}X_{b18}TAYX_{b19}X_{b20}LSSL
 X_{b21}SEDTAVYYCARRYDTAMDYWGQGTXTVSS;

- en la que X_{b1} puede ser, por ejemplo, Q o E;
- 50 en la que X_{b2} puede ser, por ejemplo, V o Q;
- en la que X_{b3} puede ser un aminoácido hidrófobo tal como, por ejemplo, V o L;
- en la que X_{b4} puede ser, por ejemplo, K o V;
- 55 en la que X_{b5} puede ser un aminoácido hidrófilo neutro tal como, por ejemplo, T o S;

- en la que X_{b6} puede ser un aminoácido básico tal como, por ejemplo, K o R;
- 5 en la que X_{b7} puede ser un aminoácido hidrófobo tal como, por ejemplo, I o L;
- en la que X_{b8} puede ser, por ejemplo, K o T;
- en la que X_{b9} puede ser, por ejemplo, V o T;
- 10 en la que X_{b10} puede ser un aminoácido básico tal como, por ejemplo, Q o K;
- en la que X_{b11} puede ser, por ejemplo, A o R;
- 15 en la que X_{b12} puede ser, por ejemplo, G o E;
- en la que X_{b13} puede ser un aminoácido básico tal como, por ejemplo, K o Q;
- en la que X_{b14} puede ser un aminoácido hidrófobo tal como, por ejemplo, M o I;
- 20 en la que X_{b15} puede ser un aminoácido básico tal como, por ejemplo, R o K;
- en la que X_{b16} puede ser un aminoácido hidrófobo tal como, por ejemplo, V o A;
- 25 en la que X_{b17} puede ser un aminoácido hidrófilo neutro tal como, por ejemplo, T o S;
- en la que X_{b18} puede ser, por ejemplo, D o N;
- en la que X_{b19} puede ser un aminoácido hidrófobo tal como, por ejemplo, M o L;
- 30 en la que X_{b20} puede ser, por ejemplo, E o Q;
- en la que X_{b21} puede ser, por ejemplo, R o T;
- 35 en la que X_{b22} puede ser as por ejemplo, L o S y;
- en la que la región variable de cadena pesada puede comprender al menos una de las sustituciones de aminoácido anteriores en comparación con SEQ ID NO.:29.
- 40 El anticuerpo humanizado o híbrido (o cualquier fragmento de unión a antígeno derivado del mismo) puede comprender una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO.:32 (16B5 VH consenso3):
- X_{b1} VQLX $_{b2}$ QSGAEX $_{b3}$ X $_{b4}$ KPGAX $_{b5}$ VX $_{b6}$ X $_{b7}$ SCX $_{b8}$ X $_{b9}$ SGFNKDIYMHVWX $_{b10}$ QX $_{b11}$ PX $_{b12}$
- X_{b13} GLEWX $_{b14}$ GRIDPAYGNTKYDPKFQGX $_{b15}$ X $_{b16}$ TITADTSX $_{b17}$ X $_{b18}$ TAYX $_{b19}$ X $_{b20}$ LSSL
- X_{b21} SEDTAVYYCARRYDTAMDYWGQGTX $_{b22}$ VTVSS;
- 45 en la que X_{b1} puede ser, por ejemplo, Q o E;
- en la que X_{b2} puede ser, por ejemplo, V o Q;
- en la que X_{b3} puede ser, por ejemplo, V o L;
- 50 en la que X_{b4} puede ser, por ejemplo, K o V;
- en la que X_{b5} puede ser, por ejemplo, T o S;
- 55 en la que X_{b6} puede ser, por ejemplo, K o R;
- en la que X_{b7} puede ser, por ejemplo, I o L;
- en la que X_{b8} puede ser, por ejemplo, K o T;
- 60 en la que X_{b9} puede ser, por ejemplo, V o T;
- en la que X_{b10} puede ser, por ejemplo, Q o K;

en la que X_{b11} puede ser, por ejemplo, A o R;

5 en la que X_{b12} puede ser, por ejemplo, G o E;

en la que X_{b13} puede ser, por ejemplo, K o Q;

en la que X_{b14} puede ser, por ejemplo, M o I;

10 en la que X_{b15} puede ser, por ejemplo, R o K;

en la que X_{b16} puede ser, por ejemplo, V o A;

15 en la que X_{b17} puede ser, por ejemplo, T o S;

en la que X_{b18} puede ser, por ejemplo, D o N;

en la que X_{b19} puede ser, por ejemplo, M o L;

20 en la que X_{b20} puede ser, por ejemplo, E o Q;

en la que X_{b21} puede ser, por ejemplo, R o T;

25 en la que X_{b22} puede ser, por ejemplo, L o S y;

en la que la región variable de cadena pesada puede comprender al menos una de las sustituciones de aminoácido anteriores en comparación con SEQ ID NO.:29.

30 En una realización más específica, el anticuerpo humanizado puede comprender una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:7.

Aún una realización más específica de la invención incluye un anticuerpo humanizado que puede comprender una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:9.

35 El anticuerpo humanizado de la presente invención puede tener una cadena pesada o región variable de cadena pesada tal como se especifica en el presente documento y una cadena ligera o región variable de cadena ligera complementaria.

40 Por otro lado, el anticuerpo humanizado de la presente invención puede tener una cadena ligera o región variable de cadena ligera tal como se especifica en el presente documento y una cadena pesada o región variable de cadena pesada complementaria.

45 Por tanto, el anticuerpo humanizado o híbrido de la presente divulgación puede comprender residuos de aminoácido de región de entramado humana de la cadena ligera de anticuerpo humano tal como se describe en el presente documento y una CDR de cadena ligera seleccionada, por ejemplo, del grupo que consiste en una CDRL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:4, una CDRL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:5 y una CDRL3 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:6. En una realización adicional, el anticuerpo humanizado o híbrido puede comprender residuos de aminoácido de región de entramado humana de la cadena ligera de anticuerpo humano tal como se describe en el presente documento y al menos dos CDR de cadena ligera seleccionadas del grupo que consiste en una CDRL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:4, una CDRL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:5 y una CDRL3 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:6. En aún una realización adicional, el anticuerpo humanizado o híbrido puede comprender residuos de aminoácido de región de entramado humana de la cadena ligera de anticuerpo humano tal como se describe en el presente documento y una CDRL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:4, una CDRL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:5 y una CDRL3 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:6. En una realización más particular, el anticuerpo humanizado o híbrido puede comprender una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:8.

60 En una realización incluso más particular, el anticuerpo humanizado o híbrido de la presente divulgación puede comprender una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:10. Otras realizaciones específicas de la invención abarcan un anticuerpo humanizado que tiene una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:7 y una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:8.

Una realización específica adicional de la invención abarca un anticuerpo humanizado que tiene una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:9 y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.: 10.

5 La presente divulgación se refiere en un aspecto adicional a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que puede unirse específicamente a clusterina y que puede seleccionarse del grupo que consiste en:

10 un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que puede tener una región variable de cadena ligera al menos idéntica al 80% (por ejemplo, al 85%, al 90%, al 95%, al 99%) con SEQ ID NO.:25 y/o una región variable de cadena pesada al menos idéntica al 80% (por ejemplo, al 85%, al 90%, al 95%, al 99%) con SEQ ID NO.:29 pudiendo comprender el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, por ejemplo, al menos una sustitución de aminoácido en comparación con SEQ ID NO.:25 o SEQ ID NO.:29 y pudiendo estar la sustitución de aminoácido, por ejemplo, fuera de una región de determinación de la complementariedad (CDR).

15 Según la presente divulgación, la al menos una sustitución de aminoácido puede estar, por ejemplo, en la región variable de cadena ligera.

20 Según la presente divulgación, la al menos una sustitución de aminoácido puede estar, por ejemplo, en la región variable de cadena pesada.

La sustitución de aminoácido puede ser conservativa o no conservativa. En una realización más específica, la sustitución de aminoácido puede ser conservativa.

25 Según una realización de la invención, los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno de la presente invención se unen a clusterina humana. Según otra realización de la invención, los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno de la presente invención se unen a clusterina murina. Los anticuerpos y el fragmento de unión a antígeno de la presente invención también pueden unirse a un variante que se produce de manera natural o sintética de clusterina murina o humana. Tal variante puede tener, por ejemplo, al menos una identidad de secuencia de aminoácidos del 75% con la clusterina humana o con la clusterina murina.

30 Las CDR de SEQ ID NO.:29 (idénticas a las de SEQ ID NOs. 30, 31, 32 y 7) se identificaron usando las definiciones de Kabat y Chothia. Las secuencias de CDR correspondientes se identifican en el presente documento tal como sigue; la CDR1 de la región variable de cadena pesada corresponde a SEQ ID NO.: 1, la CDR2 de la región variable de cadena pesada corresponde a SEQ ID NO.:2 y la CDR3 de la región variable de cadena pesada corresponde a SEQ ID NO.:3.

35 Versiones más cortas de SEQ ID NOs.:1, 2 y 3 se presentaron en la solicitud internacional n.º PCT/CA2006/001505 presentada el 13 de septiembre de 2006 (es decir, la sol. 1505) y publicada con el n.º WO2007/030930. En esta solicitud de patente, las CDR de SEQ ID NO.:29 (que corresponde a SEQ ID NO.:23 en la sol. '1505) se identificaron con el software de búsqueda IMGT/V que implementa la definición de IMGT. Las secuencias correspondientes se identifican en el presente documento tal como sigue; la CDR1 de la región variable de cadena pesada corresponde a SEQ ID NO.:44, la CDR2 de la región variable de cadena pesada corresponde a SEQ ID NO.:45 y la CDR3 de la región variable de cadena pesada corresponde a SEQ ID NO.:46.

45 Tal como se usa en el presente documento, el término "sustitución de aminoácido...fuera de una región de determinación de la complementariedad (CDR)" con respecto a SEQ ID NO.:29 se refiere en general a aminoácidos (fuera de) que rodean a SEQ ID NOs.:1, 2 y 3. En algunas realizaciones, este término puede hacer referencia alternativamente a aminoácidos (fuera de) que rodean a SEQ ID NOs.:44, 45 y 46.

50 Las CDR de SEQ ID NO.:25 (idénticas a las de SEQ ID NOs. 26, 27, 28 y 8) se identificaron usando las definiciones de Kabat y Chothia. Las secuencias de CDR correspondientes se identifican en el presente documento tal como sigue; la CDR1 de la región variable de cadena ligera corresponde a SEQ ID NO.:4, la CDR2 de la región variable de cadena ligera corresponde a SEQ ID NO.:5 y la CDR3 de la región variable de cadena ligera corresponde a SEQ ID NO.:6.

55 Versiones más cortas de SEQ ID NOs. 4, 5 y 6 se presentaron en la solicitud internacional n.º PCT/CA2006/001505 presentada el 13 de septiembre de 2006 (es decir, la sol. 1505) y publicada con el n.º WO2007/030930. En esta solicitud de patente, las CDR de SEQ ID NO.:25 (que corresponde a SEQ ID NO.:12 en la sol. '1505) se identificaron con el software de búsqueda IMGT/V que implementa la definición de IMGT. Las secuencias correspondientes se identifican en el presente documento tal como sigue; la CDR1 de la región variable de cadena ligera corresponde a SEQ ID NO.:47, la CDR2 de la región variable de cadena ligera corresponde a SEQ ID NO.:48 y la CDR3 de la región variable de cadena ligera corresponde a SEQ ID NO.:49.

65 Tal como se usa en el presente documento, el término "sustitución de aminoácido...fuera de una región de determinación de la complementariedad (CDR)" con respecto a SEQ ID NO.:25 se refiere en general a aminoácidos

(fuera de) que rodean a SEQ ID NOs.:4, 5 y 6. En algunas realizaciones, este término puede hacer referencia alternativamente a aminoácidos (fuera de) que rodean a SEQ ID NOs.:47, 48 y 49.

5 El anticuerpo humanizado (o cualquier fragmento de unión a antígeno derivado del mismo) puede comprender una región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO.:7, SEQ ID NO.:26 o SEQ ID NO.:27 y una región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO.:8, SEQ ID NO.:29 o SEQ ID NO.:30.

10 El anticuerpo híbrido (o cualquier fragmento de unión a antígeno derivado del mismo) puede comprender una región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO.:7, SEQ ID NO.:26 o SEQ ID NO.:27 y una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO.:28.

15 Alternativamente, el anticuerpo híbrido (o cualquier fragmento de unión a antígeno derivado del mismo) puede comprender una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO.:25 y una región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO.:8, SEQ ID NO.:29 o SEQ ID NO.:30.

20 Otra realización a modo de ejemplo del anticuerpo humanizado o fragmento de unión a antígeno incluye, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno que tiene una región variable de cadena ligera que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de cualquiera de SEQ ID NO.:26, SEQ ID NO.:27, SEQ ID NO.:28 o SEQ ID NO.:8.

25 Tal como se usa en el presente documento, el término "al menos 90 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO.:26" también incluye los términos "al menos 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111 o al menos 112 aminoácidos consecutivos". El término "al menos 90 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO.:26" abarca cualquier posible secuencia de al menos 90 aminoácidos consecutivos encontrada en SEQ ID NO.:26 y especialmente aquellas secuencias que incluyen las 3 CDR de SEQ ID NO.:26, tal como, por ejemplo, una secuencia que comprende los aminoácidos 6 a 108, 5 a 109, 13 a 103, 9 a 111 de SEQ ID NO.:26, etcétera.

30 Tal como se usa en el presente documento, el término "al menos 90 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO.:27" también incluye los términos "al menos 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111 o al menos 112 aminoácidos consecutivos". El término "al menos 90 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO.:27" abarca cualquier posible secuencia de al menos 90 aminoácidos consecutivos encontrada en SEQ ID NO.:27 y especialmente aquellas secuencias que incluyen las 3 CDR de SEQ ID NO.:27, tal como, por ejemplo, una secuencia que comprende los aminoácidos 7 a 109, 12 a 104, 22 a 113, 18 a 112 de SEQ ID NO.:27, etcétera.

35 Los términos "al menos 90 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO.:28" o "al menos 90 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO.:8" tienen un significado similar.

40 Según la presente invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente invención puede tener, por ejemplo, una región variable de cadena ligera tal como se expone en SEQ ID NO.:8.

45 También según la presente invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente invención puede tener, por ejemplo, una cadena ligera tal como se expone en SEQ ID NO.:10.

50 El anticuerpo humanizado o fragmento de unión a antígeno incluye (o incluye además), por ejemplo, una región variable de cadena pesada que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NOs.:30, 31, 32 o 7.

55 Tal como se usa en el presente documento, el término "al menos 90 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO.:30" también incluye los términos "al menos 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116 o al menos 117 aminoácidos consecutivos". El término "al menos 90 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO.:30" abarca cualquier posible secuencia de al menos 90 aminoácidos consecutivos encontrada en SEQ ID NO.:30 y especialmente aquellas secuencias que incluyen las 3 CDR de SEQ ID NO.:30, tal como, por ejemplo, una secuencia que comprende los aminoácidos 1 a 108, 2 a 112, 11 a 113, 7 a 109 de SEQ ID NO.:30, etcétera.

60 Tal como se usa en el presente documento, el término "al menos 90 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO.:31" también incluye los términos "al menos 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116 o al menos 117 aminoácidos consecutivos". El término "al menos 90 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO.:31" abarca cualquier posible secuencia de al menos 90 aminoácidos consecutivos encontrada en SEQ ID NO.:31 y especialmente aquellas secuencias que incluyen las 3 CDR de SEQ ID NO.:31, por ejemplo, una secuencia que comprende los aminoácidos 6 a 109, 8 a 113, 1 a 108, 2 a 115 de SEQ ID NO.:31, etcétera.

65

Los términos “al menos 90 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO.:32” o “al menos 90 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO.:7” tienen un significado similar.

5 Según la presente invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente invención puede tener, por ejemplo, una región variable de cadena pesada tal como se expone en SEQ ID NO.:7.

También según la presente invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente invención puede tener, por ejemplo, una cadena pesada tal como se expone en SEQ ID NO.:9.

10 Según la presente divulgación, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno puede comprender, por ejemplo,

a) una región variable de cadena ligera que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO.:26 y una región variable de cadena pesada que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de cualquiera de SEQ ID NO.:30, SEQ ID NO.:31, SEQ ID NO.:32 o SEQ ID NO.:7;

15 b) una región variable de cadena ligera que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO.:27 y una región variable de cadena pesada que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de cualquiera de SEQ ID NO.:30, SEQ ID NO.:31, SEQ ID NO.:32 o SEQ ID NO.:7;

20 c) una región variable de cadena ligera que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO.:28 y una región variable de cadena pesada que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de cualquiera de SEQ ID NO.:30, SEQ ID NO.:31, SEQ ID NO.:32 o SEQ ID NO.:7 o;

25 d) una región variable de cadena ligera que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO.:8 y una región variable de cadena pesada que puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de cualquiera de SEQ ID NO.:30, SEQ ID NO.:31, SEQ ID NO.:32 o SEQ ID NO.:7.

30 Según una realización más específica de la divulgación, la región variable de cadena ligera puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO.:8 y la región variable de cadena pesada puede comprender al menos 90 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO.:7.

Según una realización incluso más específica de la invención, la región variable de cadena ligera puede ser tal como se expone en SEQ ID NO.:8 y la región variable de cadena pesada puede ser tal como se expone en SEQ ID NO.:7.

35 Naturalmente, la cadena ligera o cadena pesada o su región variable descrita en el presente documento puede contener también un péptido señal. Tal péptido señal puede ser de una secuencia original o puede estar diseñado para optimizar una localización celular particular del polipéptido. Naturalmente, péptidos señal deseables son aquellos que pueden permitir la secreción del polipéptido (por ejemplo, escindible).

40 El anticuerpo humanizado de la presente invención puede tener una región constante, preferiblemente una región constante humana. Aunque pueden seleccionarse otros subtipos, el anticuerpo humanizado o híbrido puede comprender residuos de aminoácido de una región constante de una inmunoglobulina de un subtipo de IgG1, IgG2 o IgG3.

45 La presente invención también se refiere en otro aspecto a un fragmento de unión a antígeno que comprende una región variable de cadena ligera (o un fragmento de la misma) y una región variable de cadena pesada (o un fragmento de la misma), que puede incluir residuos de aminoácido de región de determinación de la complementariedad no humana y residuos de aminoácido de región de entramado humana.

50 El fragmento de unión a antígeno de la presente invención puede unirse a clusterina y puede tener ventajosamente una afinidad mejor que un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo parental no humano.

De hecho, se ha mostrado en el presente documento que el fragmento de unión a antígeno se une a clusterina monomérica recombinante con una afinidad de $1,7 \times 10^{-8} \text{ M} \pm 2,97 \times 10^{-9}$ o mejor.

55 En una realización a modo de ejemplo, el fragmento de unión a antígeno puede comprender residuos de aminoácido de región de entramado humana de la cadena pesada de anticuerpo humano natural tal como se describe en el presente documento y una CDR de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en una CDRH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:1, una CDRH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:2 y una CDRH3 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:3. En otra realización a modo de ejemplo, el fragmento de unión a antígeno puede comprender residuos de aminoácido de región de entramado humana de la cadena pesada de anticuerpo humano natural tal como se describe en el presente documento y al menos dos CDR de cadena pesada seleccionadas del grupo que consiste en una CDRH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:1, una CDRH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:2 y una CDRH3 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:3.

65

En aún otra realización a modo de ejemplo, el fragmento de unión a antígeno puede comprender residuos de aminoácido de región de entramado humana de la cadena pesada de anticuerpo humano natural tal como se describe en el presente documento y una CDRH1 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:1, una CDRH2 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:2 y una CDRH3 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:3.

En una realización más particular, el fragmento de unión a antígeno puede comprender una región variable de cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:7 (o un fragmento de la misma).

En una realización a modo de ejemplo adicional, el fragmento de unión a antígeno puede comprender residuos de aminoácido de región de entramado humana de la cadena ligera de anticuerpo humano tal como se describe en el presente documento y una CDR de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en una CDRL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:4, una CDRL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:5 y una CDRL3 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:6.

En aún una realización a modo de ejemplo adicional, el fragmento de unión a antígeno puede comprender residuos de aminoácido de región de entramado humana de la cadena ligera de anticuerpo humano tal como se describe en el presente documento y al menos dos CDR de cadena ligera seleccionadas del grupo que consiste en una CDRL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:4, una CDRL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:5 y una CDRL3 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:6.

En todavía una realización a modo de ejemplo adicional, el fragmento de unión a antígeno puede comprender residuos de aminoácido de región de entramado humana de la cadena ligera de anticuerpo humano tal como se describe en el presente documento y una CDRL1 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:4, una CDRL2 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:5 y una CDRL3 que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:6.

En una realización más específica, el fragmento de unión a antígeno puede comprender una región variable de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:8 o un fragmento de la misma.

Según la presente invención, el fragmento de unión a antígeno puede ser, por ejemplo, un fragmento Fab, a F(ab')₂ fragmento, un fragmento Fd, un fragmento Fv o un fragmento dAb. Preferiblemente, el fragmento de unión a antígeno puede ser, por ejemplo, un fragmento Fab o un fragmento F(ab')₂.

La presente invención también abarca un anticuerpo aislado que comprende la secuencia de aminoácidos del fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento. El anticuerpo aislado también puede comprender una región constante.

Anticuerpo y fragmentos de unión a antígeno variantes

Aunque la sustitución de las CDR de anticuerpos de roedor por las CDR humanas en entramados humanos es en ocasiones suficiente para transferir afinidad de unión a antígeno alta (Jones, P.T. *et al.*, Nature 321:522-525 (1986); Verhoeyen, M. *et al.*, Science 239:1534-1536 (1988)), en otros casos es necesario reemplazar adicionalmente uno (Riechmann, L. *et al.*, Nature 332:323-327 (1988)) o varios (Queen, C. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989)) residuos de región de entramado. Todavía existe una imprevisibilidad sustancial en la técnica de la humanización de anticuerpos. Por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 7.537.931, intentos por transferir las CDR de un anticuerpo murino a un anticuerpo humano dieron como resultado la pérdida de unión al antígeno. Si el proceso de humanización no da como resultado un anticuerpo humanizado o híbrido que tenga las características deseadas (es decir, especificidad, afinidad, etc.), es posible sustituir residuos de entramado de aminoácidos no humanos por residuos de entramado de aminoácidos humanos.

Por tanto, la presente divulgación abarca variantes de los anticuerpos humanizados o híbridos o fragmentos de unión a antígeno descritos en el presente documento. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno variantes incluidos son aquellos que tienen una variación en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo humanizado o híbrido o fragmentos de unión a antígeno descrita en el presente documento. Por ejemplo, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno variantes abarcados por la presente invención son aquellos que tienen una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada que pueden incluir residuos de aminoácido de región de determinación de la complementariedad no humana y residuos de aminoácido de región de entramado humana de un anticuerpo humano natural y que comprenden además al menos una variación de aminoácido (preferiblemente en la región de entramado).

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno variantes incluidos en la presente divulgación son aquellos que tienen, por ejemplo, características similares o mejoradas en comparación con el anticuerpo humanizado o híbrido o fragmento de unión a antígeno pero que portan al menos una variación de aminoácido en comparación con el anticuerpo humanizado o híbrido descrito en el presente documento.

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno variantes abarcados por la presente divulgación son aquellos que pueden comprender una inserción, una delección o una sustitución de aminoácido (conservativa o no conservativa). Por tanto, algunos variantes tienen al menos un residuo de aminoácido en su secuencia de aminoácidos eliminado y un residuo diferente insertado en su lugar.

5 Los sitios de interés para la mutagénesis sustitucional pueden incluir las regiones hipervariables (CDR), la región de entramado o incluso la región constante. Las sustituciones conservativas pueden realizarse intercambiando un amino de uno de los grupos enumerados a continuación (grupo 1 a 6) por otro aminoácido del mismo grupo.

10 Otras realizaciones a modo de ejemplo de sustituciones conservativas se muestran en la tabla 1A bajo el encabezado de "sustituciones preferidas". Si tales sustituciones dan como resultado una propiedad no deseada, entonces pueden introducirse más cambios sustanciales, denominados "sustituciones a modo de ejemplo" en la tabla 1A, o tal como se describe adicionalmente más adelante en referencia a clases de aminoácidos, y examinarse los productos.

15 Ejemplos de sustituciones identificadas como "sustituciones conservativas" se muestran en la tabla 1A. Si tales sustituciones dan como resultado un cambio no deseado, entonces se introducen otro tipo de sustituciones, denominadas "sustituciones a modo de ejemplo" en la tabla 1A, o tal como se describe adicionalmente en el presente documento en referencia a clases de aminoácidos, y se examinan los productos.

20 Pueden llevarse a cabo modificaciones sustancias en la función o identidad inmunológica seleccionando sustituciones que difieren significativamente en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura de la estructura principal del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como conformación laminar o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana, o (c) el volumen de la cadena lateral. Los residuos que se producen de manera natural se dividen en grupos basándose en las propiedades de las cadenas laterales comunes:

(grupo 1) hidrófobos: norleucina, metionina (Met), alanina (Ala), valina (Val), leucina (Leu), isoleucina (Ile)

(grupo 2) hidrófilos neutros: cisteína (Cys), serina (Ser), treonina (Thr)

(grupo 3) ácidos: ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu)

(grupo 4) básicos: asparagina (Asn), glutamina (Gln), histidina (His), lisina (Lys), arginina (Arg)

(grupo 5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: glicina (Gly), prolina (Pro); y

(grupo 6) aromáticos: triptófano (Trp), tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe)

Las sustituciones no conservativas implicarán el intercambio de un miembro de una de estas clases por otro.

Tabla 1A. Sustitución de aminoácidos

Residuo original	Sustitución a modo de ejemplo	Sustitución conservativa
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg, Asp	Gln
Asp (D)	Glu, Asn	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp, Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg,	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser

Residuo original	Sustitución a modo de ejemplo	Sustitución conservativa
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, norleucina	Leu

La variación en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno variante puede incluir una adición, delección, inserción, sustitución de aminoácido, etc., una o más modificaciones en la estructura principal o cadena lateral de uno o más aminoácidos, o una adición de un grupo u otra molécula a uno o más aminoácidos (cadenas laterales o estructura principal).

El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno variante puede tener una similitud de secuencia y/o identidad de secuencia sustancial en su secuencia de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos del anticuerpo o fragmento de unión a antígeno original. El grado de similitud entre dos secuencias se basa en el porcentaje de identidades (aminoácidos idénticos) y de sustitución conservativa.

Cuando se determina el porcentaje de identidad de una región de entramado en comparación con otra región de entramado, preferiblemente no deben tenerse en cuenta la secuencia de aminoácidos de las CDR. El porcentaje de identidad de una región de entramado en comparación con otra se determina preferiblemente por toda la región de entramado y no entramado por entramado.

Generalmente, el grado de similitud e identidad entre cadenas variables se ha determinado en el presente documento usando el programa de secuencias Blast2 (Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden (1999), "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174:247-250) usando ajustes por defecto, es decir, programa blastp, matriz BLOSUM62 (hueco abierto 11 y penalización por extensión de hueco 1; gapx dropoff 50, esperado 10,0, tamaño de palabra 3) y filtros activados.

Por tanto, el porcentaje de identidad será indicativo de aminoácidos que son idénticos en comparación con el péptido original y que puede ocupar la misma posición o una similar.

El porcentaje de similitud será indicativo de aminoácidos que son idénticos y aquellos que están reemplazados con sustitución conservativa de aminoácidos en comparación con el péptido original en la misma posición o una similar.

Por tanto, los variantes de la presente invención comprenden aquellos que puede tener al menos el 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad de secuencia con una secuencia original o una parte de una secuencia original.

Realizaciones a modo de ejemplo de variantes son aquellas que tienen al menos el 81% de identidad de secuencia con una secuencia descrita en el presente documento y el 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de similitud de secuencia con una secuencia original o una parte de una secuencia original.

Otras realizaciones a modo de ejemplo de variantes son aquellas que tienen al menos el 82% de identidad de secuencia con una secuencia descrita en el presente documento y el 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de similitud de secuencia con una secuencia original o una parte de una secuencia original.

Realizaciones adicionales a modo de ejemplo de variantes son aquellas que tienen al menos el 85% de identidad de secuencia con una secuencia descrita en el presente documento y el 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de similitud de secuencia con una secuencia original o una parte de una secuencia original.

Otras realizaciones a modo de ejemplo de variantes son aquellas que tienen al menos el 90% de identidad de secuencia con una secuencia descrita en el presente documento y el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de similitud de secuencia con una secuencia original o una parte de una secuencia original.

Realizaciones a modo de ejemplo adicionales de variantes son aquellas que tienen al menos el 95% de identidad de secuencia con una secuencia descrita en el presente documento y el 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de similitud de secuencia con una secuencia original o una parte de una secuencia original.

Realizaciones a modo de ejemplo aún adicionales de variantes son aquellas que tienen al menos el 97% de identidad de secuencia con una secuencia descrita en el presente documento y el 97%, 98%, 99% o 100% de similitud de secuencia con una secuencia original o una parte de una secuencia original. Con el propósito de ser conciso, el solicitante proporciona en el presente documento una tabla 1B que ilustra realizaciones a modo de

ejemplo de variantes individuales abarcados por la presente invención y que comprende el % de identidad de secuencia y el % de similitud de secuencia especificados. Debe interpretarse que cada "X" define un variante dado.

Tabla 1B		Porcentaje (%) de identidad de secuencia																				
		80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
Porcentaje (%) de similitud de secuencia	80	X																				
	81	X	X																			
	82	X	X	X																		
	83	X	X	X	X																	
	84	X	X	X	X	X																
	85	X	X	X	X	X	X															
	86	X	X	X	X	X	X	X														
	87	X	X	X	X	X	X	X	X													
	88	X	X	X	X	X	X	X	X	X												
	89	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X											
	90	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X										
	91	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X									
	92	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X								
	93	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X							
	94	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X						
	95	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X					
96	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X					
	97	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X				
	98	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			
	99	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
	100	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	

5

Por tanto, la presente divulgación abarca un anticuerpo humanizado o híbrido en el que vuelven a introducirse residuos de entramado de aminoácidos no humanos o en el que se hacen otros tipos de modificaciones de aminoácidos. Aquellos aminoácidos que se seleccionan particularmente para optimizar las características del anticuerpo incluyen aquellos que están implicados en la unión a antígeno. Ejemplos de tales aminoácidos se proporcionan en la Figura 2.

10

Por tanto, en una realización a modo de ejemplo, el anticuerpo humanizado o híbrido de la presente divulgación puede comprender de uno a veintiuno residuos de aminoácido de región de entramado no humana en la región variable de cadena pesada (retromutaciones).

15

En otra realización a modo de ejemplo, el anticuerpo humanizado o híbrido puede comprender de uno a veinte residuos de aminoácido de región de entramado no humana en la región variable de cadena ligera (retromutaciones).

20

Tal como se usa en el presente documento, el término "de uno a veinte" incluye cada valor individual e intervalo tal como, por ejemplo, 1, 2, 3 y hasta 20; de 1 a 20; de 1 a 19; de 1 a 18; de 1 a 17; de 1 a 16; de 1 a 15, etcétera; de 2 a 20; de 2 a 19; de 2 a 18; de 2 a 17, etcétera; de 3 a 20; de 3 a 19; de 3 a 18, etcétera; de 4 a 20; de 4 a 19; de 4 a 18; de 4 a 17; de 4 a 16, etcétera; de 5 a 20; de 5 a 19; de 5 a 18; de 5 a 17, etcétera, etc. Igualmente, el término "de uno a doce" incluye cada valor individual e intervalo tal como, por ejemplo, 1, 2, 3 y hasta 12; de 1 a 12; de 1 a 11; de 1 a 10, etcétera; de 2 a 12; de 2 a 11, de 2 a 10; de 2 a 9; de 2 a 8, etcétera; de 3 a 12; de 3 a 11; de 3 a 10; de 3 a 9, etcétera; de 4 a 12; de 4 a 11, etcétera; de 5 a 12; de 5 a 11; de 5 a 10; de 5 a 9; de 5 a 8; de 5 a 7, etcétera, etc.

25

Los términos similares deben interpretarse de manera similar.

30

La divulgación abarca o usa una secuencia de aminoácidos que tiene un % de identidad deseado con otra secuencia de aminoácidos, por ejemplo, "una región de entramado de cadena ligera de anticuerpo humano natural que tiene al menos el 70% de identidad con la región de entramado de cadena ligera del anticuerpo parental no humano" o "una región de entramado de cadena pesada de anticuerpo humano natural que tiene al menos el 70% de identidad con la región de entramado de cadena pesada del anticuerpo parental no humano".

35

Producción de los anticuerpos en células

Los anticuerpos que se dan a conocer en el presente documento pueden prepararse mediante una variedad de métodos familiares para los expertos en la técnica (métodos de ADN recombinante, síntesis química, etc.).

40

Con el fin de expresar los anticuerpos, pueden insertarse secuencias de nucleótidos que pueden codificar para una cualquiera de una cadena de inmunoglobulina ligera y una pesada descritas en el presente documento en un vector de expresión, por ejemplo, un vector que contiene los elementos para el control transcripcional y traduccional de la secuencia codificante insertada en un huésped particular. Estos elementos pueden incluir secuencias reguladoras, tales como potenciadores, promotores constitutivos e inducibles, y regiones no traducidas en 5' y 3'. Pueden usarse

45

métodos que se conocen ampliamente por los expertos en la técnica para construir tales vectores de expresión. Estos métodos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas de síntesis, y recombinación genética *in vivo*.

5 Una variedad de sistemas de vector de expresión/célula huésped conocidos por los expertos en la técnica pueden utilizarse para expresar un polipéptido o ARN derivado de secuencias de nucleótidos que pueden codificar para una cualquiera de una cadena de inmunoglobulina ligera y una pesada descritas en el presente documento. Estos incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias transformadas con bacteriófago recombinante, plásmido o vectores de expresión de ADN cósmidos; levadura transformada con vectores de expresión de levadura; sistemas de células de insecto infectados con vectores de baculovirus; sistemas de células vegetales transformados con vectores de expresión virales o bacterianos; o sistemas de células animales. Para la producción a largo plazo de proteínas recombinantes en sistemas de mamífero, puede efectuarse una expresión estable en líneas celulares. Por ejemplo, secuencias de nucleótidos que pueden codificar para una cualquiera de una cadena de inmunoglobulina ligera y una pesada descritas en el presente documento pueden transformarse en líneas celulares usando vectores de expresión que pueden contener orígenes virales de replicación y/o elementos de expresión endógenos y un marcador seleccionable o visible en el mismo vector o en un vector independiente. La invención no debe estar limitada por el vector o la célula huésped empleados. En determinadas realizaciones de la presente invención, las secuencias de nucleótidos que pueden codificar para una cualquiera de una cadena de inmunoglobulina ligera y una pesada descritas en el presente documento pueden ligarse cada una a un vector de expresión independiente y expresarse cada cadena por separado. En otra realización, la cadena tanto ligera como la pesada que pueden codificar para una cualquiera de una cadena de inmunoglobulina ligera y una pesada descritas en el presente documento pueden estar ligadas a un único vector de expresión y expresarse simultáneamente.

25 Alternativamente, un ARN y/o polipéptido puede expresarse a partir de un vector que comprende secuencias de nucleótidos que pueden codificar para una cualquiera de una cadena de inmunoglobulina ligera y una pesada descritas en el presente documento usando un sistema de transcripción *in vitro* o un sistema de transcripción/traducción *in vitro* acoplado.

30 En general, las células huésped que contienen secuencias de nucleótidos que pueden codificar para una cualquiera de una cadena de inmunoglobulina ligera y una pesada descritas en el presente documento y/o que expresan un polipéptido codificado por las secuencias de nucleótidos que pueden codificar para una cualquiera de una cadena de inmunoglobulina ligera y una pesada descritas en el presente documento, o una parte de la misma, pueden identificarse mediante una variedad de procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, hibridaciones ADN/ADN o ADN/ARN, amplificación mediante PCR y técnicas de bioensayo o inmunoensayo de proteínas que incluyen tecnologías basadas en membrana, disolución o chip para la detección y/o cuantificación de secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos. En la técnica se conocen métodos inmunológicos para detectar y medir la expresión de polipéptidos usando anticuerpos o bien policlonales o bien monoclonales específicos. Los ejemplos de tales técnicas incluyen ensayos de inmunoabsorción ligada a enzima (ELISA), radioinmunoensayos (RIA) y clasificación de células activada por fluorescencia (FACS). Los expertos en la técnica pueden adaptar fácilmente estas metodologías a la presente invención.

45 Por tanto, las células huésped que comprenden secuencias de nucleótidos que pueden codificar para una cualquiera de una cadena de inmunoglobulina ligera y una pesada descritas en el presente documento pueden cultivarse en condiciones para la transcripción del ARN correspondiente y/o la expresión del polipéptido a partir del cultivo celular. El polipéptido producido mediante una célula puede secretarse o puede retenerse intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o el vector usados. En una realización a modo de ejemplo, los vectores de expresión que contienen secuencias de nucleótidos que pueden codificar para una cualquiera de una cadena de inmunoglobulina ligera y una pesada descritas en el presente documento pueden estar diseñados para contener secuencias de señalización que dirigen la secreción del polipéptido a través de una membrana celular procariota o eucariota.

50 Una realización a modo de ejemplo de un ácido nucleico que codifica para una región variable de cadena pesada se proporciona en SEQ ID NO.:21.

55 Una realización a modo de ejemplo de un ácido nucleico que codifica para una región variable de cadena ligera se proporciona en SEQ ID NO.:23 Debido a la degeneración inherente del código genético, otras secuencias de ADN que codifican para la misma, sustancialmente la misma o un secuencia de aminoácidos funcionalmente equivalente pueden producirse y usarse, por ejemplo, para expresar un polipéptido codificado por secuencias de nucleótidos que pueden codificar para una cualquiera de una cadena de inmunoglobulina ligera y una pesada descritas en el presente documento. Las secuencias de nucleótidos de la presente invención pueden modificarse mediante ingeniería usando métodos conocidos generalmente en la técnica con el fin de alterar las secuencias de nucleótidos para una variedad de propósitos que incluyen, pero no se limitan a, modificación de la clonación, procesamiento y/o expresión del producto génico. El barajado de ADN mediante fragmentación aleatoria y reorganización mediante PCR de fragmentos génicos y oligonucleótidos sintéticos puede usarse para modificar mediante ingeniería las secuencias de nucleótidos. Por ejemplo, la mutagénesis dirigida al sitio mediada por oligonucleótidos puede usarse para introducir mutaciones que creen nuevos sitios de restricción, alteren patrones de glicosilación, cambien la preferencia de codones, produzcan variantes de corte y empalme, etcétera.

Además, una cepa de células huésped puede elegirse por su capacidad para modular la expresión de las secuencias insertadas o para procesar el polipéptido expresado del modo deseado. Tales modificaciones del polipéptido incluyen, pero no se limitan a, acetilación, carboxilación, glicosilación, fosforilación, lipidación y acilación.

En una realización a modo de ejemplo, pueden desearse anticuerpos que contienen estructuras o patrones de glicosilación particulares. El procesamiento postraduccional, que escinde una forma "prepro" del polipéptido, también puede usarse para especificar la selección como diana de proteínas, el plegado y/o la actividad. Diferentes células huésped que tienen una maquinaria celular específica y mecanismos característicos para actividades postraducionales (por ejemplo, CHO, HeLa, MDCK, HEK293 y W138) están disponibles comercialmente y de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) y pueden elegirse para garantizar la modificación y el procesamiento correctos del polipéptido expresado.

Los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que secuencias de ácido nucleico naturales, modificadas o recombinantes pueden ligarse a una secuencia heteróloga dando como resultado la traducción de un polipéptido de fusión que contiene restos de polipéptido heterólogo en cualquiera de los sistemas huésped mencionados anteriormente. Tales restos de polipéptido heterólogo pueden facilitar la purificación de polipéptidos de fusión usando matrices de afinidad disponibles comercialmente. Tales restos incluyen, pero no se limitan a, glutatión S-transferasa (GST), proteína de unión a maltosa, tiorredoxina, péptido de unión a calmodulina, 6-His (His), FLAG, c-myc, hemaglutinina (HA) y epítomos de anticuerpo tales como epítomos de anticuerpo monoclonal.

En aún un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un polinucleótido que puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica para una proteína de fusión. La proteína de fusión puede comprender una pareja de fusión (por ejemplo, HA, Fc, etc.) fusionada con el polipéptido (por ejemplo, cadena ligera completa, cadena pesada completa, regiones variables, CDR, etc.) descrito en el presente documento.

Los expertos en la técnica reconocerán también fácilmente que las secuencias de ácido nucleico y de polipéptido pueden sintetizarse, en su totalidad o en parte, usando métodos químicos o enzimáticos ampliamente conocidos en la técnica. Por ejemplo, la síntesis de péptidos puede realizarse usando diversas técnicas en fase sólida y pueden usarse máquinas tales como el sintetizador de péptidos ABI 431A (PE Biosystems) para automatizar la síntesis. Si se desea, la secuencia de aminoácidos puede alterarse durante la síntesis y/o combinarse con secuencias de otras proteínas para producir una proteína variante.

Cuando solo está disponible uno del dominio de la cadena ligera variable o el dominio de la cadena pesada variable, puede reconstituirse un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno examinando una biblioteca de dominios variables de complementariedad usando métodos conocidos en la técnica (Portolano *et al.* The Journal of Immunology (1993) 150:880-887, Clarkson *et al.*, Nature (1991) 352:624-628). Como tal, conociendo solo una de las secuencias de aminoácidos de región variable (región variable de cadena pesada o región variable de cadena ligera) a menudo es suficiente reconstituir un anticuerpo intacto que tiene la especificidad de unión a antígeno deseada. Por tanto, ácidos nucleicos que codifican para una región variable de cadena ligera o una región variable de cadena pesada de un anticuerpo pueden ser útiles en la identificación de una cadena de complementariedad que cuando se ensamblan entre sí forman un fragmento de unión a antígeno o anticuerpo que tiene una especificidad de unión a antígeno suficiente. Un ácido nucleico monocatenario (por ejemplo, oligo) o su complemento que tiene un alto nivel de identidad de secuencia con los ácidos nucleicos que codifican para una región variable de cadena ligera o una región variable de cadena pesada de un anticuerpo puede ser útil para detectar estas últimas o para detectar cualquier otra secuencia de ácido nucleico que comparta un alto nivel de identidad de secuencia.

Por tanto, en un aspecto adicional, la presente invención también proporciona un ácido nucleico aislado que codifica para la región variable de cadena ligera y/o la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado descrito en el presente documento, que codifica para el fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento o el anticuerpo aislado descrito en el presente documento.

En aún un aspecto adicional, la presente invención proporciona un vector o constructo, que comprende el ácido nucleico (aislado) descrito en el presente documento. Según la presente invención, el vector puede ser, por ejemplo, un vector de expresión de mamífero, un vector de expresión bacteriano, etc. La presente invención también abarca una célula aislada que comprende el ácido nucleico aislado descrito en el presente documento o el vector descrito en el presente documento. También están abarcadas por la presente células aisladas que expresan el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente invención. Las células adecuadas incluyen, por ejemplo, una célula de mamífero, una célula bacteriana, etc.

Aún otro aspecto de la divulgación se refiere a un método para preparar un anticuerpo anti-clusterina híbrido o humanizado que puede comprender introducir residuos de aminoácido de CDR de cadena pesada no humana de un anticuerpo no humano que puede unirse específicamente a clusterina en una región de entramado de una región variable de cadena pesada de anticuerpo humano natural.

Aún un aspecto adicional de la divulgación se refiere a un método para preparar un anticuerpo anti-clusterina híbrido o humanizado que puede comprender transformar una célula con un ácido nucleico que codifica para una región

variable de cadena pesada (o una cadena pesada completa) que comprende residuos de aminoácido de CDR de cadena pesada no humana de un anticuerpo no humano que puede unirse específicamente a clusterina y aminoácidos de región de entramado de una región variable de cadena pesada de anticuerpo humano natural. El método también puede comprender transformar la célula con un ácido nucleico que codifica para una región variable de cadena ligera complementaria (o una cadena ligera completa).

En otro aspecto, la divulgación se refiere a un método para preparar un anticuerpo anti-clusterina híbrido o humanizado que puede comprender expresar una región variable de cadena pesada (o una cadena pesada completa) que comprende residuos de aminoácido de CDR de cadena pesada no humana de un anticuerpo no humano que puede unirse específicamente a clusterina y aminoácidos de región de entramado de una región variable de cadena pesada de anticuerpo humano natural. El método también puede comprender expresar una región variable de cadena ligera complementaria (o una cadena ligera completa).

La región variable de cadena pesada de anticuerpo humano natural que puede seleccionarse con fines de humanización puede tener las siguientes características: a) una estructura tridimensional similar a o idéntica (superponible) a la de una cadena pesada del anticuerpo no humano, b) una región de entramado que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 70% a una región de entramado de cadena pesada del anticuerpo no humano, y/o; c) (un número de) residuos de aminoácido en una CDR de cadena pesada (por ejemplo, las tres CDR) que es igual o sustancialmente igual a la de los residuos de aminoácido de CDR de cadena pesada no humana.

Por tanto, el método puede comprender, por ejemplo, introducir residuos de aminoácido de CDR de cadena pesada no humana de al menos dos CDR del anticuerpo no humano. Por tanto, el ácido nucleico usado en métodos de preparación de anticuerpos humanizados o híbridos puede codificar para al menos dos CDR del anticuerpo no humano. Por tanto, la región variable de cadena pesada que se expresa en métodos de preparación de anticuerpos humanizados o híbridos puede comprender al menos dos CDR del anticuerpo no humano.

El método puede comprender preferiblemente introducir residuos de aminoácido de CDR de cadena pesada no humana de las tres CDR. Por tanto, el ácido nucleico usado en métodos de preparación de anticuerpos humanizados o híbridos puede codificar para tres CDR del anticuerpo no humano. Por tanto, la región variable de cadena pesada que se expresa en métodos de preparación de anticuerpos humanizados o híbridos puede comprender tres CDR del anticuerpo no humano.

Por tanto, el método incluye introducir las CDR no humanas que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:1, SEQ ID NO.:2 y SEQ ID NO.:3. Por tanto, el ácido nucleico usado en métodos de preparación de anticuerpos humanizados o híbridos puede codificar para SEQ ID NO.:1, SEQ ID NO.:2 y SEQ ID NO.:3. Por tanto, la región variable de cadena pesada que se expresa en métodos de preparación de anticuerpos humanizados o híbridos puede comprender SEQ ID NO.:1, SEQ ID NO.:2 y SEQ ID NO.:3.

Alternativamente, pueden introducirse versiones más cortas de las CDR mencionadas anteriormente en una región de entramado de una región variable de cadena pesada de anticuerpo humano natural.

El método de la presente divulgación puede comprender además introducir residuos de aminoácido de CDR de cadena ligera no humana de un anticuerpo no humano que puede unirse específicamente a clusterina en una región de entramado de una región variable de cadena ligera de anticuerpo humano natural.

El método de la presente divulgación puede comprender permitir la expresión de un ácido nucleico que codifica para una región variable de cadena ligera (o una cadena ligera completa) que comprende residuos de aminoácido de CDR de cadena ligera no humana de un anticuerpo no humano que puede unirse específicamente a clusterina y aminoácidos de región de entramado de una región variable de cadena ligera de anticuerpo humano natural. El método también puede comprender transformar la célula con un ácido nucleico que codifica para una región variable de cadena pesada complementaria (o una cadena pesada completa).

En otro aspecto, la divulgación se refiere a un método para preparar un anticuerpo anti-clusterina híbrido o humanizado que puede comprender expresar una región variable de cadena ligera (o una cadena pesada completa) que comprende residuos de aminoácido de CDR de cadena ligera no humana de un anticuerpo no humano que puede unirse específicamente a clusterina y aminoácidos de región de entramado de una región variable de cadena ligera de anticuerpo humano natural. El método también puede comprender expresar una región variable de cadena pesada complementaria (o una cadena pesada completa).

El anticuerpo humano natural región variable de cadena ligera que puede seleccionarse con fines de humanización puede tener las siguientes características: a) una estructura tridimensional similar a o idéntica (superponible) a la de una cadena ligera del anticuerpo no humano, b) una región de entramado que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 70% a una región de entramado de cadena ligera del anticuerpo no humano, y/o; c) (un número de) residuos de aminoácido en una cadena ligera CDR (por ejemplo, las tres CDR) que es igual o sustancialmente igual al de los residuos de aminoácido de CDR de cadena ligera no humana.

5 Por tanto, el método puede comprender, por ejemplo, introducir residuos de aminoácido de CDR de cadena ligera no humana de al menos dos CDR del anticuerpo no humano. Por tanto, el ácido nucleico usado en métodos de preparación de anticuerpos humanizados o híbridos puede codificar para al menos dos CDR del anticuerpo no humano. Por tanto, la región variable de cadena ligera que se expresa en métodos de preparación de anticuerpos humanizados o híbridos puede comprender al menos dos CDR del anticuerpo no humano.

10 El método puede comprender preferiblemente introducir residuos de aminoácido de CDR de cadena ligera no humana de las tres CDR. Por tanto, el ácido nucleico usado en métodos de preparación de anticuerpos humanizados o híbridos puede codificar para tres CDR del anticuerpo no humano. Por tanto, la región variable de cadena ligera que se expresa en métodos de preparación de anticuerpos humanizados o híbridos puede comprender tres CDR del anticuerpo no humano.

15 Por tanto, el método incluye introducir las CDR no humanas que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:4, SEQ ID NO.:5 y SEQ ID NO.:6. Por tanto, el ácido nucleico usado en métodos de preparación de anticuerpos humanizados o híbridos puede codificar para SEQ ID NO.:4, SEQ ID NO.:5 y SEQ ID NO.:6. Por tanto, la región variable de cadena ligera que se expresa en métodos de preparación de anticuerpos humanizados o híbridos puede comprender SEQ ID NO.:4, SEQ ID NO.:5 y SEQ ID NO.:6.

20 Alternativamente, pueden introducirse versiones más cortas de las CDR mencionadas anteriormente en una región de entramado de una región variable de cadena pesada de anticuerpo humano natural.

25 Un aspecto adicional de la divulgación se refiere a un método para preparar un anticuerpo anti-clusterina humanizado que puede comprender introducir residuos de aminoácido de CDR de cadena pesada no humana de un anticuerpo no humano que puede unirse específicamente a clusterina en una región de entramado de una región variable de cadena pesada de anticuerpo humano natural e introducir residuos de aminoácido de CDR de cadena ligera no humana de un anticuerpo no humano que puede unirse específicamente a clusterina en una región de entramado de una región variable de cadena ligera de anticuerpo humano natural.

30 Aún un aspecto adicional de la divulgación se refiere a un método para preparar un anticuerpo anti-clusterina humanizado que puede comprender permitir la expresión de un ácido nucleico que codifica para residuos de aminoácido de CDR de cadena pesada no humana de un anticuerpo no humano que puede unirse específicamente a clusterina y una región de entramado de una región variable de cadena pesada de anticuerpo humano natural y permitir la expresión de un ácido nucleico que codifica para a residuos de aminoácido de CDR de cadena ligera no humana de un anticuerpo no humano que puede unirse específicamente a clusterina y una región de entramado de una región variable de cadena ligera de anticuerpo humano natural.

35 La región variable de cadena pesada de anticuerpo humano natural que puede seleccionarse con fines de humanización puede tener las siguientes características: a) comprender una región de entramado que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 70% a una región de entramado de cadena pesada del anticuerpo no humano, y; b) tener (un número de) residuos de aminoácido en una CDR de cadena pesada (por ejemplo, las tres CDR) que es igual o sustancialmente igual al de los residuos de aminoácido de CDR de cadena pesada no humana, mientras que el anticuerpo humano natural región variable de cadena ligera que puede seleccionarse con fines de humanización puede tener las siguientes características: a) comprender una región de entramado que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 70% a una región de entramado de cadena ligera del anticuerpo no humano, y; b) tener (un número de) residuos de aminoácido en una cadena ligera CDR (por ejemplo, las tres CDR) que es igual o sustancialmente igual al de los residuos de aminoácido de CDR de cadena ligera no humana. La(s) región/regiones variable(s) de anticuerpo humano natural tiene(n) preferiblemente una estructura tridimensional similar a o idéntica (superponible) a la de la(s) región/regiones variable(s) de anticuerpo no humano.

40 Según la presente divulgación, el método puede comprender introducir residuos de aminoácido de CDR de cadena pesada no humana de al menos dos CDR del anticuerpo no humano. Por tanto, el ácido nucleico usado en métodos de preparación de anticuerpos humanizados o híbridos puede codificar para al menos dos CDR del anticuerpo no humano. Por tanto, la región variable de cadena pesada que se expresa en métodos de preparación de anticuerpos humanizados o híbridos puede comprender al menos dos CDR del anticuerpo no humano.

45 Alternativamente, el método puede comprender introducir residuos de aminoácido de CDR de cadena pesada no humana de las tres CDR. Por tanto, el ácido nucleico usado en métodos de preparación de anticuerpos humanizados o híbridos puede codificar para tres CDR del anticuerpo no humano. Por tanto, la región variable de cadena pesada que se expresa en métodos de preparación de anticuerpos humanizados o híbridos puede comprender tres CDR del anticuerpo no humano.

50 También según la presente divulgación, el método puede comprender introducir residuos de aminoácido de CDR de cadena ligera no humana de al menos dos CDR del anticuerpo no humano. Por tanto, el ácido nucleico usado en métodos de preparación de anticuerpos humanizados o híbridos puede codificar para al menos dos CDR del

anticuerpo no humano. Por tanto, la región variable de cadena ligera que se expresa en métodos de preparación de anticuerpos humanizados o híbridos puede comprender al menos dos CDR del anticuerpo no humano.

5 Alternativamente, el método puede comprender introducir residuos de aminoácido de CDR de cadena ligera no humana de las tres CDR. Por tanto, el ácido nucleico usado en métodos de preparación de anticuerpos humanizados o híbridos puede codificar para tres CDR del anticuerpo no humano. Por tanto, la región variable de cadena ligera que se expresa en métodos de preparación de anticuerpos humanizados o híbridos puede comprender tres CDR del anticuerpo no humano.

10 Usando el método descrito en el presente documento, se importan ventajosamente CDR que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:1, SEQ ID NO.:2 y SEQ ID NO.:3 a la región variable de cadena pesada de anticuerpo humano natural. Por tanto, el ácido nucleico usado en métodos de preparación de anticuerpos humanizados o híbridos puede codificar para SEQ ID NO.:1, SEQ ID NO.:2 y SEQ ID NO.:3. Por tanto, la región variable de cadena ligera que se expresa en métodos de preparación de anticuerpos humanizados o híbridos puede comprender SEQ ID NO.:1, SEQ ID NO.:2 y SEQ ID NO.:3.

15 Usando el método descrito en el presente documento, se importan ventajosamente CDR que comprenden la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:4, SEQ ID NO.:5 y SEQ ID NO.:6 a la región variable de cadena ligera de anticuerpo humano natural. Por tanto, el ácido nucleico usado en métodos de preparación de anticuerpos humanizados o híbridos puede codificar para SEQ ID NO.:4, SEQ ID NO.:5 y SEQ ID NO.:6. Por tanto, la región variable de cadena ligera que se expresa en métodos de preparación de anticuerpos humanizados o híbridos puede comprender SEQ ID NO.:4, SEQ ID NO.:5 y SEQ ID NO.:6.

20 En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para preparar un anticuerpo anti-clusterina híbrido o humanizado que puede comprender transformar una célula huésped con un ácido nucleico que codifica para la región variable de cadena pesada descrita en el presente documento.

25 Realizaciones a modo de ejemplo de una región variable de cadena pesada adecuada son aquellas del anticuerpo no humano que puede comprender tres CDR que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:1, SEQ ID NO.:2 y SEQ ID NO.:3 y región de entramado de cadena pesada de anticuerpo humano natural que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 70% a una región de entramado de cadena pesada del anticuerpo no humano. Preferiblemente, el anticuerpo humano natural puede comprender (un número de) CDR de cadena pesada residuos de aminoácido que es igual o sustancialmente igual al de una CDR (por ejemplo, las tres CDR) de la cadena pesada no humana.

30 El método de la presente divulgación puede comprender además transformar una célula huésped con un ácido nucleico que codifica para una cadena ligera de complementariedad.

35 Si se desea, la cadena ligera complementaria puede codificarse mediante el mismo ácido nucleico que el codifica para la cadena pesada.

40 Tal cadena ligera complementaria puede comprender una región variable de cadena ligera de un anticuerpo no humano que puede comprender tres CDR que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:4, SEQ ID NO.:5 y SEQ ID NO.:6 y región de entramado de cadena ligera de anticuerpo humano natural que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 70% a una región de entramado de cadena ligera del anticuerpo no humano. Preferiblemente, el anticuerpo humano natural puede comprender (un número de) cadena ligera CDR residuos de aminoácido que es igual o sustancialmente igual al de una CDR (por ejemplo, las tres CDR) de la cadena ligera no humana.

45 En aún otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método para preparar un anticuerpo anti-clusterina híbrido o humanizado que puede comprender transformar una célula huésped con un ácido nucleico que codifica para una región variable de cadena ligera.

50 Realizaciones a modo de ejemplo de una región variable de cadena ligera adecuada son aquellas de un anticuerpo no humano que puede comprender tres CDR que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO.:4, SEQ ID NO.:5 y SEQ ID NO.:6 y región de entramado de cadena ligera de anticuerpo humano natural que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 70% a una región de entramado de cadena ligera del anticuerpo no humano. Preferiblemente, el anticuerpo humano natural comprende (un número de) cadena ligera CDR residuos de aminoácido que es igual o sustancialmente igual al de una CDR (por ejemplo, las tres CDR) de la cadena ligera no humana.

55 El método de la presente divulgación puede comprender además transformar una célula huésped con un ácido nucleico que codifica para una cadena pesada de complementariedad.

60 Si se desea, la cadena pesada de complementariedad puede codificarse mediante el mismo ácido nucleico que codifica para la cadena ligera.

65

Composiciones farmacéuticas de los anticuerpos y su uso

5 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que puede comprender, por ejemplo, el anticuerpo humanizado descrito en el presente documento, el fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento o el anticuerpo aislado descrito en el presente documento y un portador farmacéuticamente aceptable.

10 Aún otros aspectos de la invención se refieren al uso del anticuerpo aislado o fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento en el tratamiento o diagnóstico de enfermedades.

Aún otro aspecto de la invención se refiere a una terapia de combinación que incluye la composición farmacéutica descrita en el presente documento y un agente quimioterápico.

15 Según la presente invención, la composición farmacéutica puede administrarse (es administrable) simultáneamente con el agente quimioterápico.

También según la presente invención, la composición farmacéutica y el agente quimioterápico pueden administrarse (son administrables) en diferentes intervalos de tiempo. Además, según la presente invención, el agente quimioterápico puede estar conjugado con el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno.

20 Además de los principios activos, una composición farmacéutica puede contener portadores farmacéuticamente aceptables que comprenden agua, PBS, soluciones salinas, gelatinas, aceites, alcoholes y otros excipientes y agentes auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos para dar preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. En otros casos, tales preparaciones pueden esterilizarse.

30 Tal como se usa en el presente documento, "composición farmacéutica" significa cantidades terapéuticamente eficaces del agente junto con diluyentes, conservantes, solubilizantes, emulsionantes, adyuvante y/o portadores farmacéuticamente aceptable. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" tal como se usa en el presente documento se refiere a aquella cantidad que proporciona un efecto terapéutico para un estado y régimen de administración dados. Tales composiciones son líquidas o formulaciones liofilizadas o secadas de otra manera e incluyen diluyentes de diverso contenido en tampón (por ejemplo, Tris-HCl, acetato, fosfato), pH y concentración iónica, aditivos tales como albúmina o gelatina para impedir la absorción a superficies, detergentes (por ejemplo, Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, sales de ácido biliar), agentes solubilizantes (por ejemplo, glicerol, polietilenglicerol), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio), conservantes (por ejemplo, timerosal, alcohol bencílico, parabenos), sustancia de carga o modificadores de la tonicidad (por ejemplo, lactosa, manitol), enlace covalente de polímeros tal como polietilenglicol a la proteína, complejación con iones de metal, o incorporación del material en o sobre preparaciones particuladas de compuestos poliméricos tales como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, hidrogeles, etc., o sobre liposomas, microemulsiones, micelas, vesículas unilaminares o multilaminares, fantasmas de eritrocitos o esferoplastos. Tales composiciones influirán en el estado físico, la solubilidad, la estabilidad, la tasa de liberación *in vivo* y la tasa de aclaramiento *in vivo*. Las composiciones de liberación controlada o sostenida incluyen formulación en depósitos lipófilos (por ejemplo, ácidos grasos, ceras, aceites). También están comprendidas por la invención composiciones particuladas recubiertas con polímeros (por ejemplo, poloxámeros o poloxaminas). Otras realizaciones de las composiciones de la invención incorporan formas particuladas de recubrimientos protectores, inhibidores de proteasa o potenciadores de la permeación para diversas vías de administración, incluyendo las vías parenteral, pulmonar, nasal, oral, vaginal, rectal. En una realización, la composición farmacéutica se administra por vía parenteral, por vía paracancer, por vía transmucosa, por vía transdérmica, por vía intramuscular, por vía intravenosa, por vía intradérmica, por vía subcutánea, por vía intraperitoneal, por vía intraventricular, por vía intracraneal y por vía intratumoral.

50 Adicionalmente, tal como se usa en el presente documento "portador farmacéuticamente aceptable" o "portador farmacéutico" son conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, tampón fosfato 0,01-0,1 M o 0,05 M o solución salina al 0,8%. Adicionalmente, tales portadores farmacéuticamente aceptables pueden ser disoluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, disoluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen disolución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer lactado o aceites fijados. Los vehículos intravenosos incluyen rellenos de fluido y nutriente, rellenos de electrolito tales como lo que son a base de dextrosa de Ringer, y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, tal como, por ejemplo, agentes antimicrobianos, antioxidantes, de agrupación, gases inertes y similares.

65 Las composiciones farmacéuticas utilizadas en esta invención pueden administrarse mediante cualquier número de vías que incluyen, pero no se limitan a, oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópica, sublingual o rectal.

El término “tratamiento” para los propósitos de esta divulgación se refiere tanto a un tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas, en las que el objeto es prevenir o ralentizar (reducir) el trastorno o estado patológico seleccionado como diana. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya tienen el trastorno así como aquellos que son susceptibles de tener el trastorno o aquellos en los que debe prevenirse el trastorno.

Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno pueden tener usos terapéuticos en el tratamiento de diversas enfermedades. En ciertos casos, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno pueden interactuar con células que expresan un antígeno de interés e inducir una reacción inmunológica mediante la ADCC. En otros casos, los anticuerpos o fragmentos pueden bloquear la interacción del antígeno con sus parejas proteicas. En aún otros casos, los anticuerpos o fragmentos pueden secuestrar el antígeno.

Un “agente quimioterápico” es un compuesto útil en el tratamiento de cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterápicos incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa y ciclosfosfamida; sulfonatos de alquilo tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocouona, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosfaoramida y trimetilolomelamina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clomafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, óxido de mecloretamina clorhidrato, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, carminomicina, carcinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiomicina, puomicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexata, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxilfluridina, enocitabina, floxuridina; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona; antiadrenales tales como aminoglucetimidina, mitotano, trilostano; rellenos de ácido fólico tal como ácido frolinico; aceglatona; glicósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicouona; elfomitina; acetato de eliptinio; etoglucida; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; ácido podfilínico; 2-etilhidrazida; procarbazona; PSK7; razoxano; sizofirano; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicouona; 2,2',2''-triclortrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido (“Ara-C”); ciclofosfamida; tiotepa; taxanos, por ejemplo, paclitaxel y doxetaxel; clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); ácido retinoico; esperamicinas; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores. También se incluyen en esta definición agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre tumores tales como antiestrógenos que incluyen, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles que inhiben la aromatasas, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (Fareston); y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida y goserelina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

Conjugados de anticuerpo

El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente invención puede estar conjugado con un resto detectable (es decir, con fines de detección o de diagnóstico) o con un resto terapéutico (con fines terapéuticos, por ejemplo, agente quimioterápico)

Un “resto detectable” es un resto detectable mediante medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, químicos y/u otros físicos. Un resto detectable puede acoplarse o bien directamente y/o indirectamente (por ejemplo, a través de un enlace, tal como, sin limitación, un enlace DOTA o NHS) a anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno del mismo de la presente invención usando métodos ampliamente conocidos en la técnica. Puede usarse una amplia variedad de restos detectables, dependiendo la elección de la sensibilidad requerida, la facilidad de conjugación, los requisitos de estabilidad y los instrumentos disponibles. Un resto detectable adecuada incluye, pero no se limita a, una marca fluorescente, una marca radiactiva (por ejemplo, sin limitación, ¹²⁵I, ¹¹¹In, ⁹⁹Tc, ¹³¹I e incluyendo isótopos de emisión de positrones para un escáner de PET, etc.), una marca activa de resonancia magnética nuclear, una marca luminiscente, una marca quimioluminiscente, una marca cromófora, una marca enzimática (por ejemplo, y sin limitación peroxidasa del rábano, fosfatasa alcalina, etc.), puntos cuánticos y/o una nanopartícula. El resto detectable puede provocar y/o producir una señal detectable permitiendo de ese modo que se detecte una señal del resto detectable.

En otra realización a modo de ejemplo de la divulgación, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo puede estar acoplado (modificado) con un resto terapéutico (por ejemplo, fármaco, resto citotóxico).

En una realización a modo de ejemplo, los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno pueden comprender un agente quimioterápico o agente citotóxico. Por ejemplo, el anticuerpo y los fragmentos de unión a antígeno pueden estar conjugados con el agente quimioterápico o agente citotóxico. Además de los enumerados en otra parte en la presente solicitud, tales agentes quimioterápicos o citotóxicos incluyen, pero no se limitan a, itrio-90, escandio-47, renio-186, yodo-131, yodo-125 y muchos otros reconocidos por los expertos en la técnica (por ejemplo, lutecio (por ejemplo, Lu¹⁷⁷), bismuto (por ejemplo, Bi²¹³), cobre (por ejemplo, Cu⁶⁷)). En otros casos, el agente quimioterápico o citotóxico puede estar compuesto por, entre otros conocidos por los expertos en la técnica, 5-fluorouracil, adriamicina, irinotecán, taxanos, endotoxina de *Pseudomonas*, ricina y otras toxinas.

Alternativamente, con el fin de llevar a cabo los métodos de la presente divulgación y tal como se conoce en la técnica, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente invención (conjugado o no) puede usarse en combinación con una segunda molécula (por ejemplo, un anticuerpo secundario, etc.) que puede unirse específicamente al anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la presente invención y que puede portar un resto detectable, de diagnóstico o terapéutico deseable.

Métodos de tratamiento

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un método de reducción del crecimiento de una célula cancerosa que expresa clusterina o reducción del volumen de un tumor que comprende células que expresan clusterina. El método puede comprender, por ejemplo, administrar a un mamífero que lo necesite un anticuerpo anti-clusterina. El método puede comprender además administrar un agente quimioterápico.

La presente invención también se refiere en un aspecto adicional de la misma a un método de tratamiento de una enfermedad asociada con una expresión o secreción de clusterina aumentada. El método puede comprender administrar el anticuerpo humanizado descrito en el presente documento, el fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento o el anticuerpo aislado descrito en el presente documento a un mamífero que lo necesite.

Un mamífero que lo necesite que podría beneficiarse de un método de tratamiento de este tipo puede incluir, por ejemplo, un mamífero que tiene un carcinoma, un mamífero que tiene un nivel elevado de clusterina, un mamífero que tiene un nivel elevado de clusterina en plasma o en sangre, un mamífero que porta o susceptible de portar células que pueden realizar la transición epitelio-mesénquima, un mamífero que tiene una enfermedad relacionada con un nivel aumentado de clusterina (pre-clusterina o clusterina secretada) o de la expresión o secreción de clusterina (incluyendo clusterina en sangre o en plasma), etc.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso del anticuerpo humanizado descrito en el presente documento, el fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento o el anticuerpo aislado descrito en el presente documento en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad asociada con la expresión o secreción de clusterina.

Kits y ensayos

En aún un aspecto adicional, la presente invención proporciona un kit que comprende un vial o viales que pueden comprender, por ejemplo, el anticuerpo humanizado descrito en el presente documento, el fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento o el anticuerpo aislado descrito. El kit puede usarse con fines de detección o con fines terapéuticos.

En otra realización a modo de ejemplo, el kit puede comprender el ácido nucleico aislado descrito en el presente documento o el vector descrito en el presente documento. Tal kit puede utilizarse para detectar ácidos nucleicos complementarios, expresando la proteína que codifica o de otra manera.

Por tanto, la presente divulgación también se refiere a un método de detección de clusterina (pre-clusterina y clusterina secretada) poniendo en contacto una muestra que contiene o de la que se sospecha que contiene clusterina con el anticuerpo humanizado o híbrido descrito en el presente documento, el fragmento de unión a antígeno descrito en el presente documento o el anticuerpo aislado descrito. La detección se lleva a cabo con un aparato que tiene sensores apropiados que pueden detectar la unión de un antígeno a un anticuerpo (por ejemplo, BIAcore™, lector de microplacas, espectrofotómetro, etc.). Tal aparato puede estar dotado de un sistema informático.

Tal como se usa en el presente documento, el término “estructura tridimensional similar a la de o superponible a” con respecto a una región variable significa que tras usar un modelo computarizado, una región variable especificada tiene una conformación que permite exponer el sitio de unión a antígeno de una manera similar a otra región variable. Se dice que las regiones variables son superponibles cuando la representación computarizada de los aminoácidos de región variable ocupa una posición similar en el espacio que los aminoácidos correspondientes de otra región variable.

Tal como se usa en el presente documento, el término “una región variable modelada” significa una representación computarizada de una región variable que se obtiene de estructuras tridimensionales conocidas de una región variable de anticuerpo estrechamente relacionada.

5 Tal como se usa en el presente documento, el término “no humano” abarca sin limitación roedor (por ejemplo, ratón, ratas, etc.), conejo o primate no humano, etc.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término “residuos de aminoácido de región de determinación de la complementariedad no humana” significa por tanto que residuos de aminoácido de la región de determinación de la complementariedad se originan de un ser no humano, normalmente un roedor tal como un ratón.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término “anticuerpo parental no humano” abarca por tanto un anticuerpo obtenido de un ser no humano que se usa como material de partida para procedimientos de humanización.

20 El término “transformar una célula huésped” incluye varias técnicas conocidas en la técnica para transferir o introducir un ácido nucleico deseado en una célula huésped. Tales técnicas incluyen, sin limitación, transfección, infección, lipofección, inyección, transducción, nucleofección, electroporación, sonoporación, choque térmico, magnetofección, etc.

25 El término “importar” con respecto a residuos de aminoácido de CDR de cadena pesada o cadena ligera no humana abarca métodos físicos y computarizados, por ejemplo, técnicas de clonación, síntesis química de un ácido nucleico o proteína, anticuerpos humanizados generados por ordenador, etc. Tal como se usa en el presente documento, el término “sustancialmente el mismo” con respecto al número de aminoácidos, significa que puede tolerarse una variación de +/- 3 aminoácidos o preferiblemente +/- 2 aminoácidos o incluso más preferiblemente +/- 1 aminoácido.

Ejemplo 1- Humanización mediante el diseño de los anticuerpos monoclonales de ratón anti-clusterina

Modelado tridimensional de las regiones variables del anticuerpo monoclonal 16B5 de ratón.

30 Esta tarea se llevó a cabo fácilmente mutando 3 residuos de cadena ligera y 7 residuos de cadena pesada en las estructuras cristalinas disponibles de dos anticuerpos de ratón diferentes (códigos Protein Data Bank (PDB) 1Q9Q y 1TY7, respectivamente) seguido del ensamblaje de las cadenas ligera y pesada superponiendo las estructuras de plantilla. Parte del bucle CDR-H3 se basaba en otra estructura de anticuerpo (código PDB 1UJ3, un anticuerpo humanizado) que también tiene una alta similitud de secuencia con la cadena pesada de 16B5 pero que, a diferencia de la estructura de plantilla de ratón, presenta la misma longitud para el bucle CDR-H3. La estructura resultante se refinó mediante minimización de energía con el campo de fuerza AMBER y entonces se usó en el análisis posterior. En este caso se espera una buena calidad del modelo de homología resultante, dada la alta homología de la secuencia 16B5 de ratón con las plantillas estructurales disponibles. No obstante, se obtuvieron resultados comparables en experimentos de modelado control paralelos, en los que se modeló la región variable 16B5 de ratón empleando programas de modelado de homología 3D genéricos como Modeller o Composer, o un modelado de homología 3D especializado para anticuerpos tal como se implementa en el software WAM. Una representación de las regiones variables modeladas del anticuerpo 16B5 de ratón se proporciona en la Figura 1.

45 *Caracterización de la secuencia de aminoácidos (de ratón) donadoras de fuente de 16B5 y estructura modelada.*

50 Esta etapa se llevó a cabo para estimar el índice de humanidad, para delinear las CDR, residuos canónicos, empaquetamiento intercatenario (residuos interfaciales VH/VL), empaquetamiento de región variable/constante (residuos interfaciales VH/CH y VL/CL), residuos de entramado inusuales, sitios de N- y O-glicosilación potenciales, residuos enterrados, residuos de la zona de Vernier y la proximidad a las CDR. Se usaron recursos disponibles en Internet y software local para evaluar estas propiedades.

Selección de los mejores entramados de cadena ligera y cadena pesada humana para las CDR de ratón.

55 La selección de los mejores entramados de cadena ligera y cadena pesada humana se realizó mediante comparación de homología de secuencias convencional frente a una copia local de bases de datos de líneas germinales humanas (VBASE), frente a otras bibliotecas de secuencias (Genbank y SwissProt), así como el conjunto de secuencias consenso de entramado humanas. Se llevaron a cabo búsquedas BLAST para recuperar coincidencias de secuencia con la mayor homología en la región de entramado solo (por tanto excluyendo las CDR) al tiempo que se hacía coincidir la longitud de los bucles de CDR. Las estructuras de las secuencias variables humanas o humanizadas más similares a las secuencias variables 16B5 identificadas de PDB se superpusieron sobre la estructura modelada de la región variable 16B5 para comparación estructural. Varias secuencias de entramado humanas con la máxima similitud se conservaron inicialmente con el fin de evaluar la variabilidad de aminoácidos en posiciones candidatas para la mutación, así como para proporcionar un conjunto de secuencias de entramado adecuadas como reserva en el caso de pérdida de afinidad tras la humanización. Las secuencias de entramado humanas más próximas se alinean con las secuencias 16B5 murinas en la Figura 2.

Identificación de los residuos de entramado de ratón que pueden influir en la conformación y unión a antígeno.

5 La identificación de los residuos de entramado de ratón que pueden influir en la conformación y unión a antígeno es una etapa importante que marca los residuos de aminoácido que deben mutarse con las secuencias humanas correspondientes con particular cuidado. Estos residuos representan candidatos primarios para retromutaciones con la secuencia de ratón en el caso de pérdida de afinidad. Esta es la etapa de humanización más difícil e impredecible por el diseño, particularmente en la ausencia de una estructura experimental del complejo anticuerpo-antígeno. Esta etapa se basa en la identificación de residuos en una o más de las siguientes categorías: residuos canónicos, de CDR-H3, de zona de Vernier, inusuales, CDR-proximales (dentro de 5 Å), empaquetamiento intercatenario y de sitio de glicosilación. Estos residuos pueden afectar al sitio de unión a antígeno y a la afinidad directa o indirectamente. Las secuencias humanizadas finales del Acm anti-clusterina 16B5 requieren 13 mutaciones de entramado en la cadena ligera y 22 mutaciones de entramado en la cadena pesada en relación con las secuencias murinas, mientras que no alteran las regiones CDR. Sorprendentemente, un análisis de secuencias comparativas y estructural cuidadoso indicó una alta probabilidad de conservación alta afinidad de unión a antígeno introduciendo todas estas mutaciones, buscando por tanto alcanzar el grado más alto de humanización permitido por la técnica de injerto de CDR (es decir, el 100%, excluyendo las CDR). El modelado tridimensional del anticuerpo humanizado diseñado respalda esta predicción. No obstante, hemos identificado residuos candidato para retromutaciones, incluyendo residuos CDR-proximales (3 en la cadena ligera y 9 en la cadena pesada dentro de 5 Å desde las CDR), un residuo de cadena ligera en contacto con la cadena pesada, así como varios residuos enterrados (y por tanto probablemente no inmunogénicos) que pueden convertirse de vuelta en la secuencia de ratón (4 en la cadena ligera y 6 en la cadena pesada). Residuos murados y residuos candidatos para retromutaciones se indican en la Figura 1 y la Figura 2.

Análisis estructural adicional.

Antes de someter la secuencia humanizada a expresión recombinante, el análisis estructural adicional incluyó la selección de péptido señal, selección de isotipo y el análisis de compatibilidad estructural en las uniones región variable/constante. Además, un análisis comparativo del empaquetamiento intercatenario y del empaquetamiento región variable/constante entre anticuerpos de ratón y humanizados indicó que en el caso de humanización 16B5, era factible generar anticuerpos híbridos combinando cadenas humanizadas y quiméricas (región variable de ratón), es decir, ratón/ratón (M/M), ratón/humanizada (M/H), humanizada/ratón (H/M) y humanizada/humanizada (H/H) como emparejamiento de cadena ligera/cadena pesada. El isotipo seleccionado para los anticuerpos anti-clusterina era IgG2 humana. La IgG2 humana no alberga funciones efectoras potentes, lo que es el distintivo de los anticuerpos de bloqueo tal como se da a conocer en el presente documento. Además, la IgG2 humana es menos susceptible de escisión proteolítica, lo que proporciona anticuerpos de este isotipo de manera más estable *in vivo*.

Modelado tridimensional de las regiones variables del anticuerpo monoclonal 21B12 de ratón.

40 El modelado del anticuerpo anti-clusterina de ratón 21B12 se llevó a cabo según las enseñanzas descritas anteriormente para 16B5. El 21B12 humanizado resultante era 100 humanizado y requería 18 mutaciones en la cadena pesada y 14 mutaciones en la cadena ligera.

Ejemplo 2. Análisis cinético de anticuerpos anti-clusterina

45 El propósito de estas investigaciones es determinar los parámetros cinéticos de anticuerpos anti-clusterina. En particular, determinar si la humanización del anticuerpo monoclonal anti-clusterina 16B5 y 21B12 afecta a los parámetros cinéticos de su unión a clusterina humana. Con este fin, se desarrolló un análisis cinético usando el BIAcore 3000. Se inmovilizó clusterina humana sobre un chip sensor. Se inyectaron anticuerpos de longitud completa o fragmentos Fab y se permitió que interaccionaran con la clusterina inmovilizada. Este ejemplo describía el anticuerpo a modo de ejemplo 16B5, pero el anticuerpo a modo de ejemplo 21B12 se preparó y sometió a prueba de manera similar.

Inmovilización de clusterina

55 Se usó HBST (Hepes 10 mM pH 7,4, NaCl135 mM, EDTA 3,4 mM, Tween 20 al 0,005%) como tampón de ejecución para todos los experimentos BIAcore. Se inmovilizó clusterina monomérica recombinante sobre un chip CM3 con el método de acoplamiento de amina normal a un flujo de 5 µl/min. Se activó la superficie con 35 µl de una mezcla de NHS 50 mM/EDC 0,2 M. Se inyectó clusterina en acetato de Na 10 mM pH 4,5 hasta que se capturó una cantidad deseada (por debajo de 60RU). Se desactivaron los ésteres sin reaccionar con 35 µl de clorhidrato de etanolamina 1 M-NaOH pH 8,5. Se preparó una superficie control inyectando NHS/EDC y etanolamina de la misma manera.

Preparación de anticuerpos de IgG2 anti-clusterina humanizados

65 Se expresaron vectores de expresión que contenían los ADNc que codifican para las inmunoglobulinas de cadena ligera y pesada en células 293 usando métodos de transfección temporal familiares para los expertos en la técnica.

Gracias a los péptidos señal incorporados en los extremos amino-terminales de ambas cadenas de inmunoglobulina, se recogió la IgG2 madura del medio de cultivo libre de suero de las células. Se continuó con el crecimiento de las células durante 5 días tras la transfección, tras lo cual se recogió el medio de cultivo para la purificación de los anticuerpos quiméricos monoclonales de IgG2. La proteína se purificó usando proteína-A agarosa tal como indica el fabricante (Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, ON).

Preparación de 16B5 de ratón y Fab 16B5 HH

Se trató IgG 16B5 de ratón con papaína a una razón molar de 1:100 durante 4 horas a temperatura ambiente. Se detuvo la digestión mediante la adición de una razón molar 4:1 del inhibidor de papaína E64. Se separaron fragmentos Fab de fragmentos Fc mediante cromatografía en una columna HiTrap Protein G de 1 ml. Se eluyeron los fragmentos Fab de la columna con glicina 0,1 M, pH 2,7. Se neutralizó inmediatamente el pH recogiendo fracciones de 1 ml en tubos que contenían 100 µl de Tris 2 M, pH 9. Se combinaron fracciones que contenían Fab y se concentraron en un concentrador centrífugo Amicon Ultra 4 con un punto de corte de PM de 30 kDa. Se hicieron pasar las muestras a través de una columna de exclusión de tamaño Superose 12 (10 X 300 mm) en HEPES 20 mM, pH 7,5, NaCl 200 mM para separar las fracciones Fab y F(ab')₂. Las fracciones que contenían Fab se combinaron y concentraron en un concentrador centrífugo Amicon Ultra 4 con un punto de corte de PM de 30 kDa.

Para la preparación de Fab de 16B5 HH, el protocolo fue muy similar al de Fab de ratón, excepto porque el tiempo de digestión fue de 20 horas a temperatura ambiente y los fragmentos Fab y Fc se separaron en una columna HiTrap Protein A en lugar de una columna HiTrap Protein G. Se aumentó el tiempo de digestión basándose en resultados de una prueba a pequeña escala en un esfuerzo por intentar eliminar la presencia de F(ab')₂. El perfil de exclusión de tamaños mostró que una digestión más prolongada reducía, pero no eliminaba completamente, la presencia de fragmentos F(ab')₂. El cambio a proteína A en vez de proteína G se realizó para evitar la exposición de los fragmentos Fab al pH bajo requerido para eluir los fragmentos Fab de la proteína G. Los fragmentos Fab fluyeron a través de la columna de proteína A y los fragmentos Fc se retuvieron por la proteína A. La separación por exclusión de tamaño se realizó en PBS en lugar de tampón HEPES. Se usaron los mismos métodos para preparar fragmentos Fab de 21B12.

Análisis cinético de 16B5 de ratón y HH16B5 y Fab

Se llevó a cabo un análisis cinético a un flujo de 50 µl/min. Se diluyeron anticuerpos de longitud completa (de ratón o humanizados) o Fab en HBST. El intervalo de concentración era de 1,953-31,25 nM para los anticuerpos de cadena completa y 15,625-250 nM para el Fab. Cada concentración se inyectó sobre la clusterina y una superficie control durante 5 min seguido de un lavado por disociación de 5 min. La superficie de clusterina se regeneró entre cada inyección de anticuerpo con 50 µl de HCl 1 de 20 mM.

Análisis cinético de anticuerpos que se unen a clusterina

La Figura 3 resume los resultados obtenidos para la determinación de los parámetros cinéticos para anticuerpos anti-clusterina de longitud completa 16B5 y Fab.

Los parámetros cinéticos del 16B5 humanizado de longitud completa (HH16B5) son muy similar a la cinética del anticuerpo de ratón de longitud completa (16B5), sugiriendo que la humanización no afectaba a la unión del anticuerpo a la clusterina. Sin embargo, los parámetros cinéticos del Fab de 16B5 humanizado (HH16B5 Fab) es ligeramente mejor que la cinética del anticuerpo de ratón Fab (16B5 Fab), sugiriendo de nuevo que la humanización no afectaba a la unión del anticuerpo a la clusterina. La K_D de la interacción entre la clusterina humana inmovilizada y 16B5 de ratón o 16B5 humanizado está en el intervalo de nM bajo. El método desarrollado puede usarse para comparar los parámetros cinéticos durante el proceso de humanización de anticuerpos anti-clusterina.

La Figura 9 resume los resultados obtenidos para la determinación de los parámetros cinéticos para anticuerpos anti-clusterina de longitud completa 21B12 y Fab. Como se describió para el 16B5, la humanización de 21B12 (HH21B12) dio como resultado parámetros de unión que eran similares al anticuerpo 21B12 de ratón parental. La K_D de la interacción entre clusterina humana inmovilizada y 21B12 de ratón o 21B12 humanizado está en el intervalo de nM bajo. El método desarrollado puede usarse para comparar los parámetros cinéticos durante el proceso de humanización de anticuerpos anti-clusterina.

Ejemplo 3. Actividad biológica de h16B5 en ensayos a base de células

Estos estudios se llevaron a cabo para comparar la actividad biológica de h16B5 con la del 16B5 de ratón. Para someter a prueba h16B5, se usaron dos ensayos que habían mostrado previamente que el bloqueo de clusterina con un anticuerpo monoclonal podría reducir la migración y la invasión de líneas celulares de cáncer.

Para someter a prueba la actividad de anticuerpos anti-clusterina frente a la migración de células cancerosas, se usó un ensayo de curación de heridas, o de arañado, convencional. En este ensayo, se sembraron células EMT6, una línea celular de carcinoma de mama de ratón, a alta densidad y se sometieron a dañado mediante la creación de un

arañazo en la capa de células. En el momento 0, es evidente un área denudada amplia que se llena rápidamente tras la incubación de las células a 37°C durante 15 h (véanse los paneles superiores izquierdos en la Figura 4). La incubación de las células en presencia de o bien un anticuerpo anti-clusterina comercial (C-18, Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA) o el 16B5 de ratón purificado del hibridoma original dio como resultado un número reducido de células en el área denudada (véanse los paneles superiores derechos en la Figura 4, marcados con *16B5 comercial* y *de hibridoma*). La incubación de las células EMT6 dañadas con el 16B5 quimérico (véase la Figura 4, panel inferior *MM*), un anticuerpo híbrido que contiene la cadena ligera quimérica con la cadena pesada humanizada (véase la Figura 4 panel inferior *MH*), un anticuerpo híbrido que contiene la cadena pesada quimérica con la cadena ligera humanizada (véase la Figura 4 panel inferior *HM*), o el 16B5 humanizado completo (véase la Figura 4 panel inferior *HH*) también dio como resultado el bloqueo de la migración de las células al área denudada. De hecho, el 16B5 humanizado parecía ser el inhibidor más efectivo. Adicionalmente, la capacidad de los anticuerpos quiméricos y los anticuerpos híbridos ratón-humano para inhibir la migración muestra que la interacción con clusterina era la misma independientemente de qué cadena de inmunoglobulina estaba contenida en el anticuerpo 16B5.

Entonces determinamos si otras líneas celulares tales como las líneas celulares PC3 y DU145 de próstata humana, que secretan diversos niveles de clusterina endógena, podían verse afectadas en su comportamiento invasivo y crecimiento por el h16B5. Cuando se sembraron en Matrigel (Figura 5, panel superior izquierdo), la línea celular de tumor PC3 presentaba una morfología estrellada con salientes que crecían al interior del Matrigel, una característica que se ha correlacionado con un potencial invasivo aumentado (Thompson *et al.*, 1992). El tratamiento con h16B5 (Figura 5, panel superior derecho) redujo significativamente esta morfología estrellada sugiriendo intensamente que la secreción de clusterina contribuye al fenotipo invasivo de las células PC3. Las células DU145 no presentaban las morfología estrellada observada en las células PC3, sino que más bien formaban estructuras similares a esferas en Matrigel (Figura 5, panel inferior izquierdo), que parecían ser más pequeñas y menores en número en presencia de h16B5 (Figura 5, panel inferior derecho). Estos resultados muestran que la capacidad del h16B5 para reducir el potencial invasivo de líneas celulares de cáncer es comparable con el 16B5 de ratón original y muestra que el proceso de humanización no alteraba la capacidad del anticuerpo de interactuar con y bloquear la actividad de clusterina secretada.

Se obtuvieron tumores derivados de 4 líneas celulares pancreáticas humanas diferentes que se fijaron en formalina, se incrustaron en parafina y se cortaron en portaobjetos de vidrio. Se llevó a cabo la inmunohistoquímica con anticuerpo h16B5 para determinar si los tumores derivados de esta indicación de cáncer expresaban clusterina. Los tumores se derivaron de Aspc-1, BxPC-3, PANC-1 y MiaPaCa-2 todos los cuales se derivaron de pacientes con cáncer pancreático (ATCC, Manassas, VA). Se pusieron muestras de tumor pancreático epitelial incrustadas en parafina sobre portaobjetos de vidrio y se fijaron durante 15 min a 50°C. La desparafinización se llevó a cabo tratando 2x con xileno seguido de deshidratación en lavados de 5 min sucesivos en etanol al 100%, 80% y 70%. Se lavaron los portaobjetos 2x en PBS durante 5 min y se trataron con disolución de recuperación de antígeno (citrato-EDTA) para desenmascarar el antígeno. Se eliminaron las especies reactivas con peróxido endógenas incubando los portaobjetos con H₂O₂ en metanol y el bloqueo se realizó incubando los portaobjetos con disolución de bloque libre de suero (Dakocytomation) durante 20 min a temperatura ambiente. El Acm primario (una IgG control o h16B5) se añadió a 5 µg/ml durante 1 h a temperatura ambiente. Se detectó clusterina reactiva a H16B5 incubando con anti-kappa humano conjugado con biotina seguido de anticuerpo terciario de estreptavidina-HRP. La tinción positiva se reveló tratando los portaobjetos con sustrato de DAB-peróxido de hidrógeno durante menos de 5 min y posteriormente se contratiñó con hematoxilina. Tal como se muestra en la figura 11, los cuatro tumores se tiñeron positivamente para la expresión de clusterina (véanse los paneles derechos en la Figura 11). De manera interesante, los tumores que se sabía que eran resistentes a la quimioterapia (PANC-1 y MisPaCa-2) contenían en nivel más alto de clusterina secretada. La línea celular PANC-1 se cultivó y se hizo crecer en Matrigel tal como se describe para las líneas celulares de cáncer de próstata (véase anteriormente). Las células se estimularon con TGF-β e inductor de la transición epitelio-mesénquima y un factor de crecimiento que provoca que las células migren a través de la membrana al interior del Matrigel (véase la Figura 12, panel superior derecho). Cuando las células estimuladas se trataron con h16B5, se inhibió intensamente la migración (Figura 12, panel inferior derecho). Este resultado indica que h16B5 puede bloquear la migración de células de cáncer pancreático y muestra que el anticuerpo tiene el potencial para ser terapéuticamente activo en este estado de cáncer también.

Ejemplo 4. Actividad biológica de h16B5 en modelos animales de cáncer

Estos estudios se realizaron para medir la eficacia *in vivo* de h16B5 en modelos de cáncer humano. Se ha notificado que oligonucleótidos antisentido y ARN interferentes pequeños que seleccionan como diana la clusterina inducen apoptosis y quimiosensibilidad *in vitro* en xenoinjertos de cáncer de próstata [1-4]. El sistema de modelo que se usó comprendía la línea celular de cáncer de próstata humano DU145 que es insensible a los andrógenos y representa uno de los modelos caracterizados más ampliamente para esta enfermedad. Por tanto, se implantaron 2 millones de células subcutáneamente en los flancos de ratones SCID y se permitió que los tumores crecieran hasta aproximadamente 100 mm³. Empezando el día 1, se inyectó h16B5 por vía intraperitoneal (i.p.) a una dosificación de 5 mg/kg y desde el día 4 se inyectó taxotere (TxT) i.p. a una dosificación de 10 mg/kg. Se continuó con las inyecciones de h16B5 dos veces por semana al tiempo que el TxT se administraba semanalmente. Tal como se ilustra en la Figura 6, el crecimiento de los tumores (primarios) se reducía significativamente en los animales que recibieron tratamientos con h16B5 en comparación con el control. Este efecto se produjo tanto en el grupo

monoterapia (comparar *control* con *h16B5*, $P = 0,0104$) y en el grupo de combinación con TxT (comparar *TxT* con *h16B5+TxT*, $P = 0,0395$). Este resultado muestra que el bloqueo de clusterina con el h16B5 provoca la reducción del crecimiento tumoral y aumenta la quimiosensibilidad de los tumores para TxT.

5 Se llevó a cabo un segundo estudio de modelo de cáncer de próstata en un modelo de tumor diferente implantando células de cáncer de próstata PC-3. Las células PC-3 también son insensibles a las hormonas, pero se ha documentado que son ligeramente más invasivas que las células DU145. Como se describió anteriormente, las células se implantaron subcutáneamente en ratones SCID y se iniciaron tratamientos cuando los tumores alcanzaron un volumen de aproximadamente 100 mm^3 (designado día 1). Las inyecciones de h16B5 se administraron i.p. el día 1 a 5 mg/kg y se continuaron dos veces por semana después, mientras que se administró i.p. una única inyección de TxT a 10 mg/kg el día 5. Esta modificación en el programa de TxT se realizó porque se encontró que las células PC-3 eran significativamente más susceptibles a este fármaco quimioterápico en comparación con los tumores DU145.

15 Los resultados de este estudio se ilustran en la Figura 10. Tal como anteriormente, se observó que los tumores en los animales que recibieron h16B5 solo tenían una respuesta casi inmediata al anticuerpo en comparación con los animales sin tratar. Se encontró que la disminución significativa en el tamaño de tumor promedio en el grupo de tratamiento con h16B5 daba como resultado una reducción del 37% en comparación con el grupo control el día 43. También se monitorizó la supervivencia y se observó que el día en el que ya no quedaban animales en el grupo control (día 43), más del 60% de los ratones seguían vivos en el grupo de tratamiento con AB-16B5. Este aumento en la supervivencia global se traducía en un aumento del 47% en los animales que recibieron h16B5.

25 Se observó el efecto citotóxico de TxT frente a células de cáncer de próstata, pero los tumores parecían recuperarse de este tratamiento aproximadamente 18 días tras la inyección. El crecimiento de los tumores en el grupo de TxT incluso sobrepasó el de los tumores en el grupo que recibió el AB-16B5 (véase día 50, Figura 10). Sin embargo, la combinación de h16B5 con TxT ralentizó significativamente el crecimiento de los tumores dando como resultado tumores que era un 41% más pequeños en comparación con el grupo solo de TxT. De nuevo, la presencia de h16B5 prolongó la supervivencia de los animales. Tomados conjuntamente, los resultados de estos estudios *in vivo* indican que el anticuerpo humanizado h16B5 que inhibe la función de clusterina secretada en tumores puede ralentizar significativamente el crecimiento de tumores sólidos.

30 **Ejemplo 5. H16B5 inhibe la internalización de clusterina secretada en células de cáncer.**

35 Los resultados dados a conocer anteriormente indican que la inducción de la transición epitelio-mesénquima (EMT) conduce a la secreción de clusterina por células de cáncer. Adicionalmente, nuestros datos también mostraron que la clusterina secretada por estas células de cáncer es un potente inductor de EMT. Estos hallazgos implican que la clusterina secretada está mediando este efecto o bien indirectamente mediante la interacción con otros factores asociados con tumores en la matriz extracelular o bien directamente mediante la interacción con un receptor en la superficie celular de células de cáncer. Aunque se sabe que la clusterina secretada presente en suero normal se asocia con muchas proteínas diferentes tales como miembros de la cascada del complemento, leptina, diversas apolipoproteínas, la presencia de parejas proteicas para clusterina secretada en células de cáncer o en el microentorno tumoral sigue estando relativamente sin explorar. Algunos ejemplos incluyen un informe publicado de Jo y colegas (Jo *et al.*, 2008) que mostró que la clusterina secretada por tumores se asociaba con IGF-1 en condiciones de estrés inducido por privación de suero. Además, se encontró que la clusterina contenida en líneas celulares de cáncer próstata interactuaba con una proteína denominada COMMD1 (Zoubeidi *et al.*, 2010). Esta interacción dio como resultado una activación aumentada de rutas relacionadas con NF-kappaB, lo que a su vez promueve la supervivencia de células con cáncer de próstata. Estos hallazgos empiezan a dilucidar algunas de las maneras en las que la clusterina secretada puede contribuir a la tumorigénesis, pero el mecanismo molecular para cómo promueve EMT es desconocido.

50 Con el fin de empezar a abordar esta cuestión, se realizaron experimentos basados en células para determinar si la clusterina secretada interactuaba con células de cáncer directamente o a través de otros factores secretados en el medio celular. Con el fin de medir esto, se marcó fluorescentemente la clusterina secretada y se incubó con células de carcinoma de mama de ratón BRI-JM01. Se encontró que tras aproximadamente 24 horas de tratamiento, la señal de fluorescencia estaba contenida dentro de las células. El análisis de estas células a lo largo de puntos de tiempo más cortos reveló que la clusterina secretada marcada fluorescentemente se internalizó por las células (véase la Figura 13). Tal como se muestra, la internalización aumenta con el tiempo, de manera que es consistente con una ruta endocítica mediada por receptores. Además, el patrón punteado y perinuclear de la tinción que resulta tras 24 horas (véanse las flechas blancas en la figura 13) se observa a menudo en proteínas que se internalizan a lo largo de la ruta endosómica. Se observaron resultados similares en células DU145 de cáncer de próstata humanas.

60 Esta internalización de clusterina secretada se examinó adicionalmente sometiendo a prueba si h16B5 podía bloquear esta actividad. Las células se trataron con clusterina secretada -Alexa480 en presencia de h16B5 o una IgG control de isotipo. Tal como se muestra en la figura 14, la internalización de clusterina secretada en células JM01 se bloqueó mediante la adición de h16B5. La tinción perinuclear interna de clusterina secretada todavía se observaba en las células tratadas con la IgG control (véanse las flechas blancas en la Figura 14).

65

Tomados conjuntamente, estos resultados que muestran que la internalización de clusterina secretada puede inhibirse mediante la adición de h16B5 sugieren que este puede ser uno de los mecanismos mediante los que el anticuerpo impide que la clusterina secretada medie EMT en células de cáncer.

5 Los experimentos descritos en el presente documento pueden llevarse a cabo para determinar cómo afectan mutaciones específicas en la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo (por ejemplo, en la(s) región/regiones variable(s), la región constante, la región de entramado o en las CDR) a la actividad biológica del anticuerpo. Por ejemplo, pueden introducirse una o más mutaciones en la región de entramado de la cadena ligera variable o cadena pesada variable de h16B5 (o en el 16B5 murino) y puede evaluarse el crecimiento tumoral tal como se describe en el presente documento.

15 La unión de anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno variantes a clusterina humana o murina puede someterse a prueba mediante varios métodos conocidos en la técnica tal como, por ejemplo, ELISA, inmunotransferencia de tipo Western, resonancia de plasmones superficiales, etc.

Ejemplo 6. Los anticuerpos anti-clusterina pueden unirse a variantes de clusterina.

20 Los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno de la presente invención se unen a la forma de clusterina tanto humana como murina. Estas dos proteínas comparten el 77% de identidad de secuencia de aminoácidos y el 89% de similitud (véase la Figura 15). Comparando la secuencia de aminoácidos de la forma murina y la humana, uno puede entender que el anticuerpo se une probablemente a un epítipo lineal o un conformacional preservado en ambas proteínas. Se espera que los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno puedan unirse a otros variantes que se producen de manera natural así como variantes sintéticos (incluyendo proteínas recombinantes) que tienen al menos el 75% de identidad de aminoácidos (incluyendo el 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 100%) con clusterina humana o murina. Por ejemplo, los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno pueden unirse a un variante de clusterina que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO.:56 (donde + representa una sustitución de aminoácido, tal como, por ejemplo, una sustitución conservativa de aminoácido) o SEQ ID NO.:57.

30 La presente invención muestra que anticuerpos anti-clusterina seleccionan como diana clusterina que se expresa en tumores humanos. Para demostrar la interacción de los anticuerpos anti-clusterina, tal como h16B5, con clusterina de tumor murina, secciones congeladas preparadas a partir de tumores de mama de ratón 4T1 se incubaron con h16B5. Brevemente, las secciones congeladas se fijaron con acetona helada durante 10 minutos y no se bloqueó una unión específica con un reactivo suministrado en un kit disponible comercialmente (Dako Canada, Inc., Burlington, ON). Se incubó H16B5 con la sección de tumor de ratón durante 1 h a una concentración de 50 g/ml. Tras el lavado, se reveló la tinción específica incubando con una IgG anti-humana conjugada con HRP. Se procesó una muestra control de manera idéntica con una IgG control de isotipo humana. Tal como se muestra en la Figura 16, h16B5 detectó clusterina murina en los tumores 4T1 (véase el panel derecho, marcado como *4T1-AB-16B5*) tal como se evidencia mediante la tinción marrón que resulta de la coloración de la peroxidasa del rábano. El anticuerpo control no reveló ningún antígeno (véase el panel izquierdo, marcado como *4T1-ctl*). Este resultado demuestra que los anticuerpos anti-clusterina, tal como se ejemplifica mediante h16B5, interaccionan con clusterina murina que se expresa en tumores de ratón. Además, otros estudios que usan inmunofluorescencia mostraron que h16B5 detectaba clusterina murina que se expresaba en células BRI-JM01, otra línea celular de carcinoma de mama de ratón.

45 La unión de los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno de la presente invención al variante que se produce de manera natural o variantes sintéticos de clusterina también puede someterse a prueba mediante métodos conocidos en la técnica incluyendo, por ejemplo, los métodos mencionados anteriormente.

50 El gen CLU se conserva en el ser humana, chimpancé, perro, vaca, ratón, rata, pollo y pez cebra. Las pruebas de los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno en estos modelos están abarcadas por la presente invención.

Listado de secuencias:

55 SEQ ID NO.:1
16B5 CDRH1: GFNIKDIYMH

60 SEQ ID NO.:2
16B5 CDRH2: RIDPAYGNTKYDPKFQG

SEQ ID NO.:3
16B5 CDRH3: RYDTAMDY

65 SEQ ID NO.:4
16B5 CDRL1: KSSQSLLSRTRKNILA

SEQ ID NO.:5
16B5 CDRL2: WASTRES

5 SEQ ID NO.:6
16B5 CDRL3: KQSYNLWT

SEQ ID NO.:7
Región variable de cadena pesada humanizada 16B5
QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNKDIYMHVWVQQAPGKGLEWMGRIDPAY
GNTKYDPKFQGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCARRYDTAMDYWGQG
TLVTVSS

10 SEQ ID NO.:8
Región variable de cadena ligera humanizada 16B5
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQLLNSRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWA
STRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCKQSYNLWTFGQGTKLEIK

15 SEQ ID NO.:9
Secuencias de inmunoglobulina de cadena pesada completa para h16B5
QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNKDIYMHVWVQQAPGKGLEWMGRIDPAY
GNTKYDPKFQGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCArRYDTAMDYwgqgtlvt
vsSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPPCAPPV
AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

20 SEQ ID NO.:10
Secuencias de inmunoglobulina de cadena ligera completa para h16B5
DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQLLNSRTRKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWA
STRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCKQSYNLWTFGQGTKLEIKVAA
PSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

25 SEQ ID NO.:11 A 20 SE HAN BORRADO.

SEQ ID NO.:21
Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada completa de h16B5

ES 2 734 886 T3

ATGGACTGGACCTGGCGGATCCTGTTCCCTGGTGGCCGCTGCTACCGGCACCCACG
CCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCTGGCGCCACCG
TCAAGATCAGCTGCAAGGTGTCCGGCTTCAACATCAAGGACATCTACATGCACTG
GGTGCAGCAGGCTCCAGGCAAGGGACTGGAGTGGATGGGCGGATCGACCCTGC
CTACGGCAACACCAAGTACGACCCTAAGTTCAGGGCCGGGTGACCATCACCGC
CGACACCTCCACCGACACCGCTACATGGAAGTGTCTCCCTGCGGTCCGAGGAC
ACCGCCGTGTACTACTGCGCCCCGAGATACGACACCGCCATGGATTACTGGGGCC
AGGGCACCCCTGGTGACCGTGTCTCCGCTTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCC
CCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTG
GTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCTCTGA
CCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTC
AGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAACTTCGGCACCCAGACCTACACCTGCA
ACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGACAGTTGAGCGCAAAT
GTTGTGTCGAGTGCCACCGTGCCAGCACCACTGTGGCAGGACCGTCAGTCTT
CCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTC
ACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGG
TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCACGGGAGGAGCAG
TTCAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTTGTGCACCAGGACTGGC
TGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCAGCCCCCA
TCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACA
CCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCT
GGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA
GCCGGAGAACAACACTACAAGACCACACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTC
TTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTC
TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC
TCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA

5 SEQ ID NO.:22 - borrada

SEQ ID NO.:23

Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera completa de h16B5

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCCT
 ACGGCGACATCGTGATGACCCAGTCCCCCGACTCCCTGGCCGTGTCCCTGGGCGA
 GAGAGCCACCATCAACTGCAAGTCTCCAGTCCCTGCTGAACTCCCGGACCCGG
 AAGAACTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCCAGCCTCCTAAGCTGCTGA
 TCTACTGGGCCTCCACCCGGGAGTCCGGCGTGCCTGACCGGTTCTCCGGCTCCGG
 CAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCC
 GTGTACTACTGCAAGCAGTCTTACAACCTGTGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGC
 TGGAGATCAAGCGGACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGAT
 GAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCC
 CAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTC
 CCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAG
 CACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGA
 AGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA
 GTGTTAG

5 SEQ ID NO.:24 - borrada

SEQ ID NO.:25 (VL de 16B5 murina)
 DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLLSRTRKKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYW
 ASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCKQSYNLWTFGGGTKLEFK

10 SEQ ID NO.:26 (h16B5 VL consenso1)
 DIVMXQSPXSLAVSXGEXXTXXCKSSQSLLSRTRKKNYLAWYQQKPGQXPKLLIY
 WASTRESGVPDRFXGSGSGTDFTLTISXQAEDXAVYYCKQSYNLWTFGXGTKLEX

K;

X es una sustitución de aminoácido en comparación con un aminoácido correspondiente en el polipéptido expuesto en SEQ ID NO.:25.

15 SEQ ID NO.:27 (h16B5 VL consenso2)
 DIVMX_{a1}QSPX_{a2}SLAVSX_{a3}GEX_{a4}X_{a5}TX_{a6}X_{a7}CKSSQSLLSRTRKKNYLAWYQQKPGQX
{a8}PKLLIYWASTRESGVPDRFX{a9}GSGSGTDFTLTISX_{a10}QAEDX_{a11}AVYYCKQSYNL-
 WTFGX_{a12}GTKLEX_{a13}K

X_{a1} es un aminoácido hidrófilo neutro tal como, por ejemplo, T o S;

20 X_{a2} es D o S;

X_{a3} es un aminoácido hidrófobo tal como, por ejemplo, L o A;

25 X_{a4} es un aminoácido básico tal como, por ejemplo, R o K;

X_{a5} es un aminoácido hidrófobo tal como, por ejemplo, A o V;

X_{a6} es un aminoácido hidrófobo tal como, por ejemplo, I o M;

X_{a7} es N o S;

X_{a8} es P o S;

5 X_{a9} es un aminoácido hidrófilo neutro tal como, por ejemplo, S o T;

X_{a10} es un aminoácido hidrófobo tal como, por ejemplo, L o V;

10 X_{a11} es un aminoácido hidrófobo tal como, por ejemplo, V o L;

X_{a12} es Q o G y;

X_{a13} es I o F.

15 SEQ ID NO.:28 (h16B5 VL consenso3)
 DIVMX_{a1}QSPX_{a2}SLAVSX_{a3}GEX_{a4}X_{a5}TX_{a6}X_{a7}CKSSQSLNLSRTRKKNYLAWYQQKPGQX
{a8}PKLLIYWASTRESGVPDRFX{a9}GSGSGTDFTLTISSX_{a10}QAEDX_{a11}AVYYCKQSYNL-
 WTFGX_{a12}GTKLEX_{a13}K

20 X_{a1} es T o S; X_{a2} es D o S; X_{a3} es L o A; X_{a4} es R o K; X_{a5} es A o V; X_{a6} es I o M; X_{a7} es N o S; X_{a8} es P o S; X_{a9} es S o T; X_{a10} es L o V; X_{a11} es V o L; X_{a12} es Q o G y; X_{a13} es I o F.

SEQ ID NO.:29 (VH de 16B5 murina)
 EVQLQQSGAELVKPGASVRLSCTTSGFNIKDIYMHVVKQRPEQGLEWIGRIDPAYG
 NTKYDPKFKGKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDVAVYYCARRYDTAMDYWGQGT
 SVTVSS

25 SEQ ID NO.:30 (h16B5 VH consenso1)
 XVQLXQSGAEXXKPGAXVXXSCXXSGFNIKDIYMHVWXQXPXXGLEWXGRIDPA
 YGNTKYDPKFKGXXTITADTSXXTAYXXLSSLXSEDVAVYYCARRYDTAMDYWG
 QGTXTVSS;

30 X es una sustitución de aminoácido en comparación con un aminoácido correspondiente en el polipéptido expuesto en SEQ ID NO.:29.

SEQ ID NO.:31 (h16B5 VH consenso2)
 X_{b1}VQLX_{b2}QSGAEX_{b3}X_{b4}KPGAX_{b5}VX_{b6}X_{b7}SCX_{b8}X_{b9}SGFNIKDIYMHVWX_{b10}QX_{b11}PX_{b12}
 X_{b13}GLEWX_{b14}GRIDPAYGNTKYDPKFKGX_{b15}X_{b16}TITADTSX_{b17}X_{b18}TAYX_{b19}X_{b20}LSSL
 X_{b21}SEDVAVYYCARRYDTAMDYWGQGTX_{b22}VTVSS;

35 X_{b1} es Q o E;

X_{b2} es V o Q;

X_{b3} es un aminoácido hidrófobo tal como, por ejemplo, V o L;

40 X_{b4} es K o V;

X_{b5} es un aminoácido hidrófilo neutro tal como, por ejemplo, T o S;

X_{b6} es un aminoácido básico tal como, por ejemplo, K o R;

45 X_{b7} es un aminoácido hidrófobo tal como, por ejemplo, I o L;

X_{b8} es K o T;

50 X_{b9} es V o T;

X_{b10} es un aminoácido básico tal como, por ejemplo, Q o K;

X_{b11} es A o R;

X_{b12} es G o E;

5 X_{b13} es un aminoácido básico tal como, por ejemplo, K o Q;

X_{b14} es un aminoácido hidrófobo tal como, por ejemplo, M o I;

X_{b15} es un aminoácido básico tal como, por ejemplo, R o K;

10 X_{b16} es un aminoácido hidrófobo tal como, por ejemplo, V o A;

X_{b17} es un aminoácido hidrófilo neutro tal como, por ejemplo, T o S;

15 X_{b18} es por ejemplo, D o N;

X_{b19} es un aminoácido hidrófobo tal como, por ejemplo, M o L;

X_{b20} es E o Q;

20 X_{b21} es R o T y;

X_{b22} es L o S.

25 SEQ ID NO.:32 (h16B5 VH consenso3)

X_{b1}VQLX_{b2}QSGAEX_{b3}X_{b4}KPGAX_{b5}VX_{b6}X_{b7}SCX_{b8}X_{b9}SGFNIKDIYMHVWX_{b10}QX_{b11}PX_{b12}

X_{b13}GLEWX_{b14}GRIDPAYGNTKYDPKFQGX_{b15}X_{b16}TITADTSX_{b17}X_{b18}TAYX_{b19}X_{b20}LSSL

X_{b21}SEDTAVYYCARRYDTAMDYWGQGTGX_{b22}VTVSS;

30 X_{b1} es Q o E; X_{b2} es V o Q; X_{b3} es V o L; X_{b4} es K o V; X_{b5} es T o S; X_{b6} es K o R; X_{b7} es I o L; X_{b8} es K o T; X_{b9} es V o T; X_{b10} es Q o K; X_{b11} es A o R; X_{b12} es G o E; X_{b13} es K o Q; X_{b14} es M o I; X_{b15} es R o K; X_{b16} es V o A; X_{b17} es T o S; X_{b18} es D o N; X_{b19} es M o L; X_{b20} es E o Q; X_{b21} es R o T y; X_{b22} es L o S.

SEQ ID NO.:33 a 43 se han borrado

SEQ ID NO.:44

35 16B5 CDRH1: GFNIKDIY

SEQ ID NO.:45

16B5 CDRH2: IDPAYGNT

40 SEQ ID NO.:46

16B5 CDRH3: X₁X₂RYDTAMDY

X₁ es A;

45 X₂ es R;

o X₁ y X₂ están fuera de CDRH3

SEQ ID NO.:47

50 16B5 CDRL1: QLLNSRTRKNY

SEQ ID NO.:48

16B5 CDRL2: WAS

55 SEQ ID NO.:49

16B5 CDRL3: KQSYNLWT

SEQ ID NO.:50

21B12 CDRH1: GYTFTNYG

60 SEQ ID NO.:51

21B12 CDRH2: INTYTGEP

SEQ ID NO.:52
21B12 CDRH3: X₃X₄DGFLYFFDY

5 X₃ es A;

X₄ es R;

o X₃ y X₄ están fuera de CDRH3

10

SEQ ID NO.:53
21B12 CDRL1: QSLLYSSNQKNY

15 SEQ ID NO.:54
21B12 CDRL2: WAS

SEQ ID NO.:55
21B12 CDRL3: QQYYIYPRT

20 **Referencias**

1. Gleave, M.E., *et al.*, Use of antisense oligonucleotides targeting the antiapoptotic gene, clusterin/testosterone-repressed prostate message 2, to enhance androgen sensitivity and chemosensitivity in prostate cancer. *Urology*, 2001. 58(2 Suppl 1): p. 39-49.
- 25 2. Trougakos, I.P., *et al.*, Silencing expression of the clusterin/apolipoprotein j gene in human cancer cells using small interfering RNA induces spontaneous apoptosis, reduced growth ability, and cell sensitization to genotoxic and oxidative stress. *Cancer Res*, 2004. 64(5): p. 1834-42.
- 30 3. Gleave, M. y H. Miyake, Use of antisense oligonucleotides targeting the cytoprotective gene, clusterin, to enhance androgen- and chemo-sensitivity in prostate cancer. *World J Urol*, 2005. 23(1): p. 38-46.
- 35 4. Springate, C.M., *et al.*, Efficacy of an intratumoral controlled release formulation of clusterin antisense oligonucleotide complexed with chitosan containing paclitaxel or docetaxel in prostate cancer xenograft models. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2005. 56(3): p. 239-47.
5. Jo, H., Jia, Y., *et al.*, Cancer cell-derived clusterin modulates the phosphatidylinositol-3'-kinase-Akt pathway through attenuation of insulin-like growth factor 1 during serum deprivation. *Mol. Cell. Biol.* 2008. 28:4285-4299.
- 40 6. Zoubeydi, A., ettinger, S. *et al.*, Clusterin facilitates COMMD1 and I-kappaB degradation to enhance NF-kappaB activity in prostate cancer cells. *Mol. Cancer Res.* 2010, 8:119-130.

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un anticuerpo humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo que puede unirse específicamente a clusterina, comprendiendo el anticuerpo humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo
- una región variable de cadena ligera tal como se expone en SEQ ID NO.:8 y una región variable de cadena pesada tal como se expone en SEQ ID NO.:7.
- 10 2.- El anticuerpo humanizado según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo comprende una cadena ligera tal como se expone en SEQ ID NO.: 10 y una cadena pesada tal como se expone en SEQ ID NO.: 9.
- 3.- Un ácido nucleico aislado seleccionado del grupo que consiste en:
- 15 a. un ácido nucleico aislado que codifica para la región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1 y;
- b. un ácido nucleico aislado que codifica para la cadena ligera y la cadena pesada del anticuerpo humanizado según la reivindicación 2.
- 20 4.- Un vector que comprende el ácido nucleico aislado según la reivindicación 3, en el que la cadena ligera y la cadena pesada de dichos anticuerpos están cada una en vectores independientes o combinadas como región variable de cadena ligera y pesada en el mismo vector.
- 25 5.- Una célula aislada que comprende el ácido nucleico aislado según la reivindicación 3, uno o más de los vectores según la reivindicación 4 o que expresa el anticuerpo humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1 o el anticuerpo humanizado según la reivindicación 2.
- 30 6.- Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1 o el anticuerpo humanizado según la reivindicación 2, y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 35 7.- La composición farmacéutica según la reivindicación 6, para su uso en un tratamiento combinado de cáncer que comprende células tumorales que expresan clusterina, caracterizada porque la administración de la composición farmacéutica se combina simultáneamente o en diferentes intervalos de tiempo con la administración de un agente quimioterápico.
- 40 8.- La composición farmacéutica según la reivindicación 7, en la que el agente quimioterápico comprende un taxano.
- 9.- El anticuerpo humanizado o fragmento de unión a antígeno según la reivindicación 1 o 2 para su uso en medicina.
- 45 10.- El anticuerpo humanizado o fragmento de unión a antígeno según la reivindicación 1 o 2 para su uso en el tratamiento de cáncer que comprende células tumorales que expresan clusterina.
- 50 11.- Un kit que comprende:
- un vial o viales que comprenden el anticuerpo humanizado o fragmento de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, o el ácido nucleico aislado según la reivindicación 3 o el vector según la reivindicación 4.

FIGURA 1

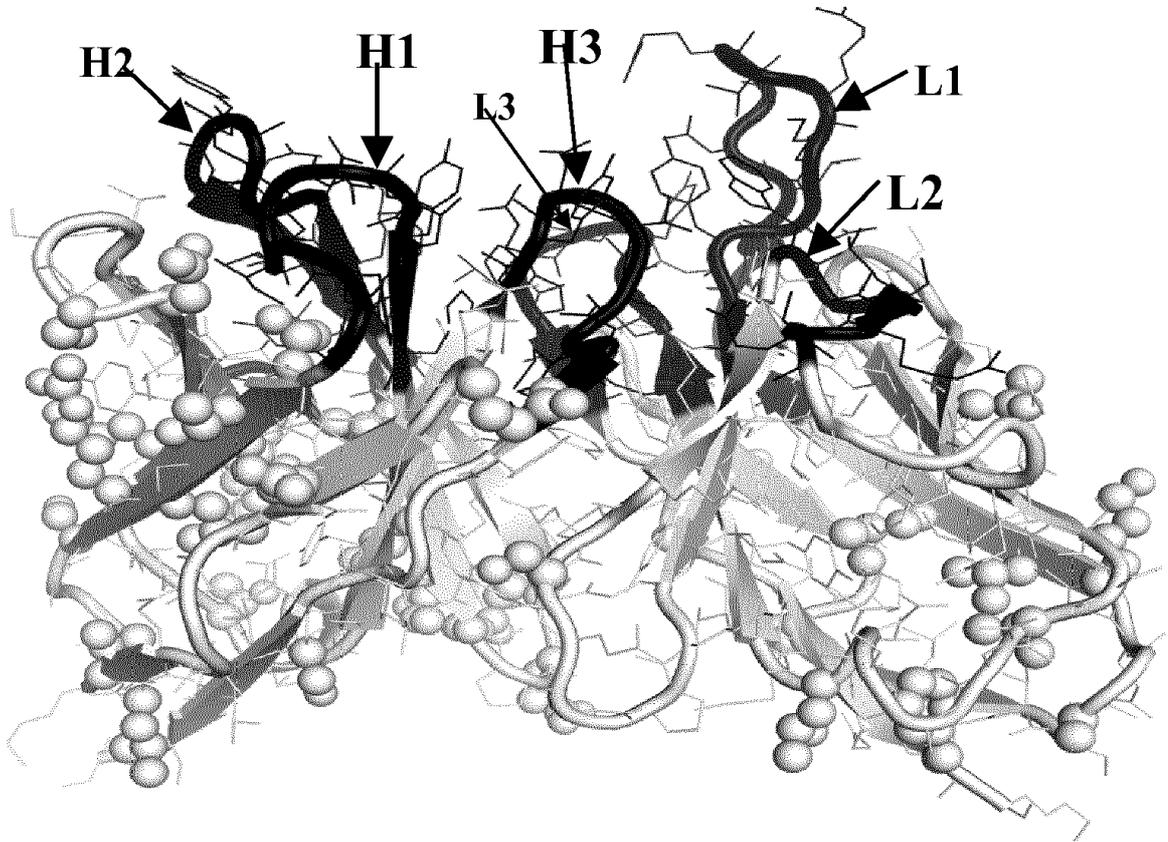


FIGURA 2

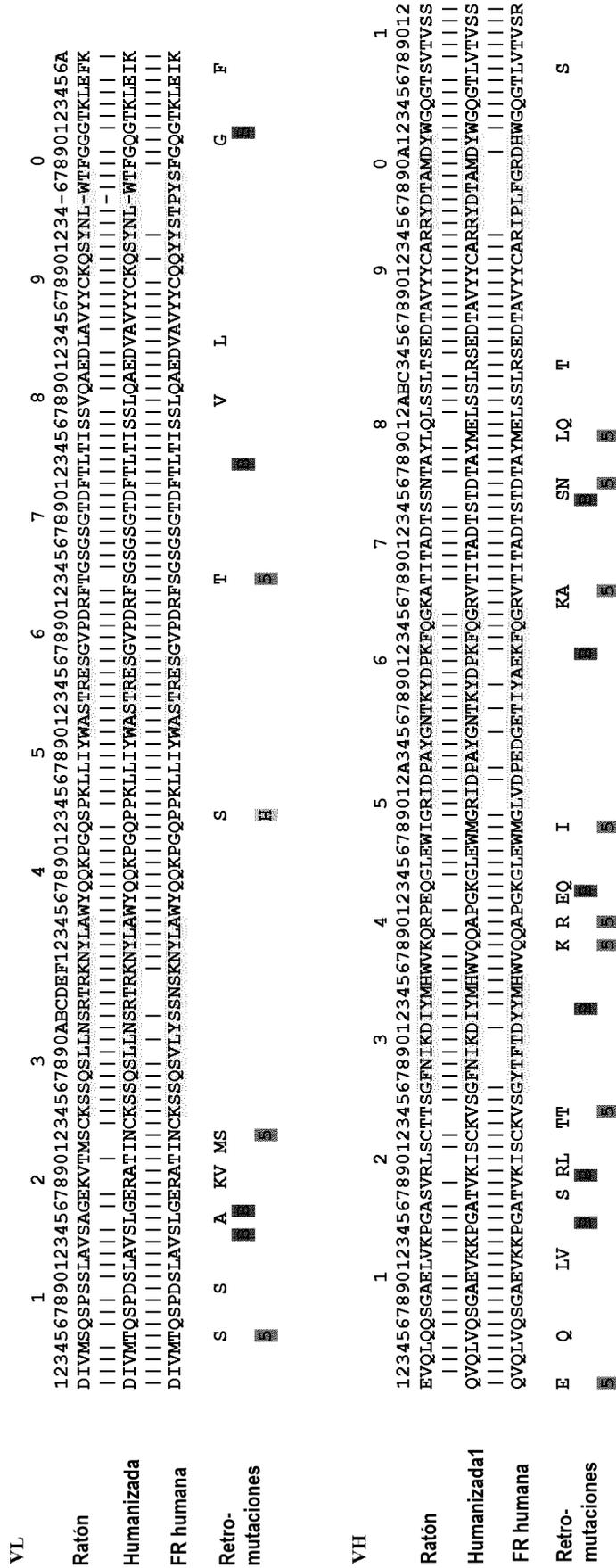


FIGURA 3

	K_a (1/Ms)		K_d (1/s)		K_D (M)	
	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE
16B5 Fab	7,41e+04	2,03e+04	0,0030	0,0006	4,16e-08	7,87e-09
16B5	3,29e+05	1,16e+05	0,0017	0,0005	6,64e-09	4,66e-09
HH16B5 Fab	1,59e+05	1,89e+04	0,0027	0,0004	1,72e-08	2,97e-09
HH16B5	3,45e+05	4,89e+04	0,0015	0,0005	4,49e-09	8,65e-10

FIGURA 4

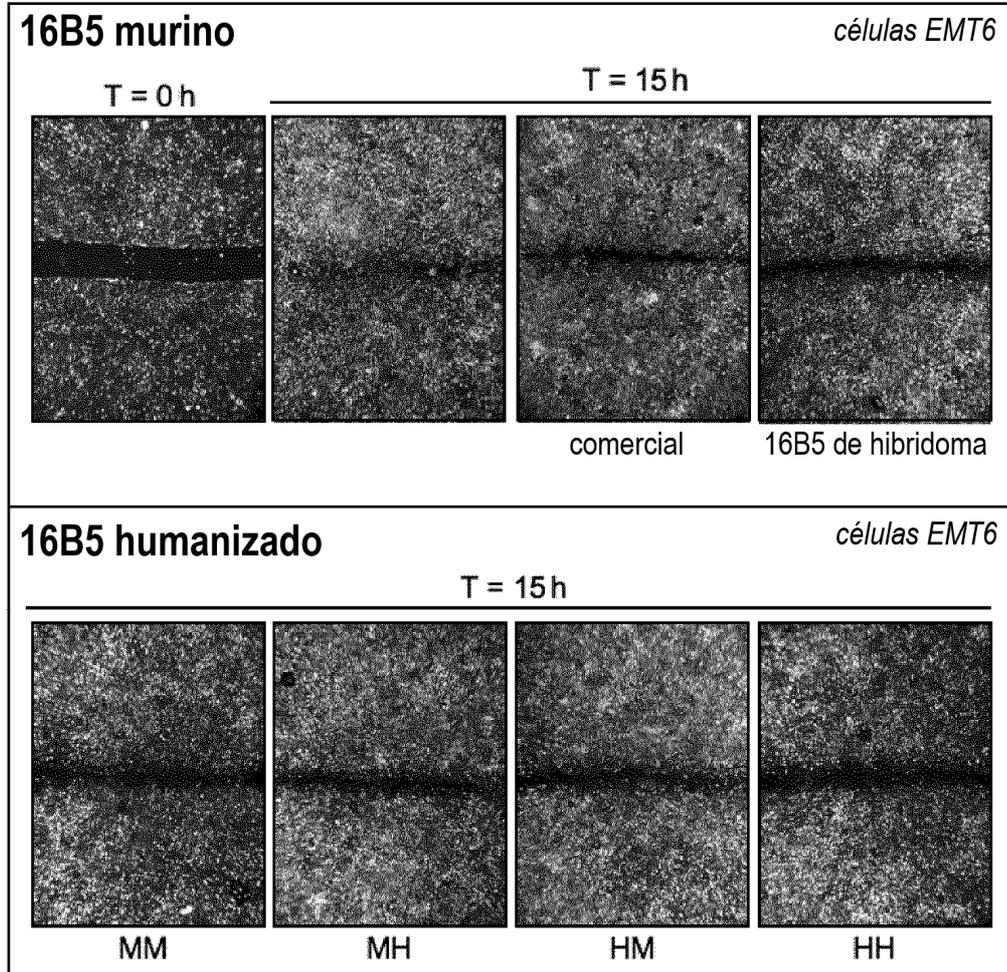


FIGURA 5

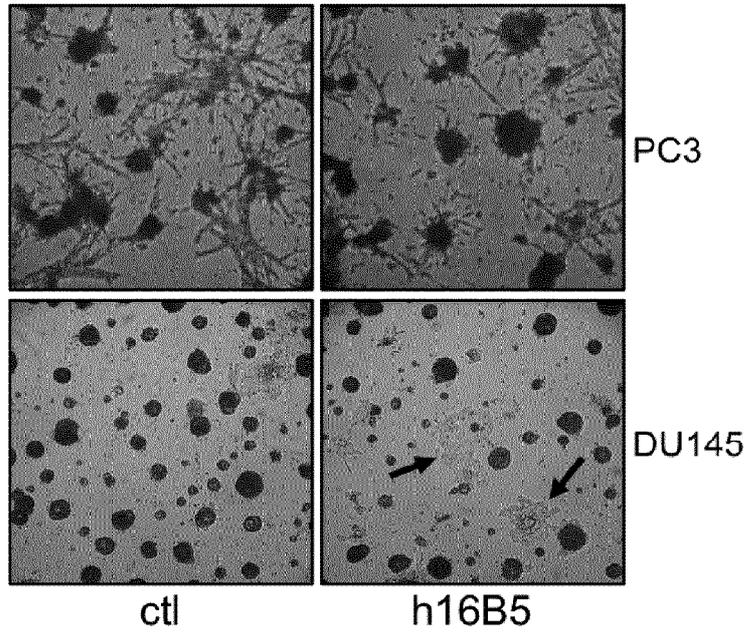


FIGURA 6

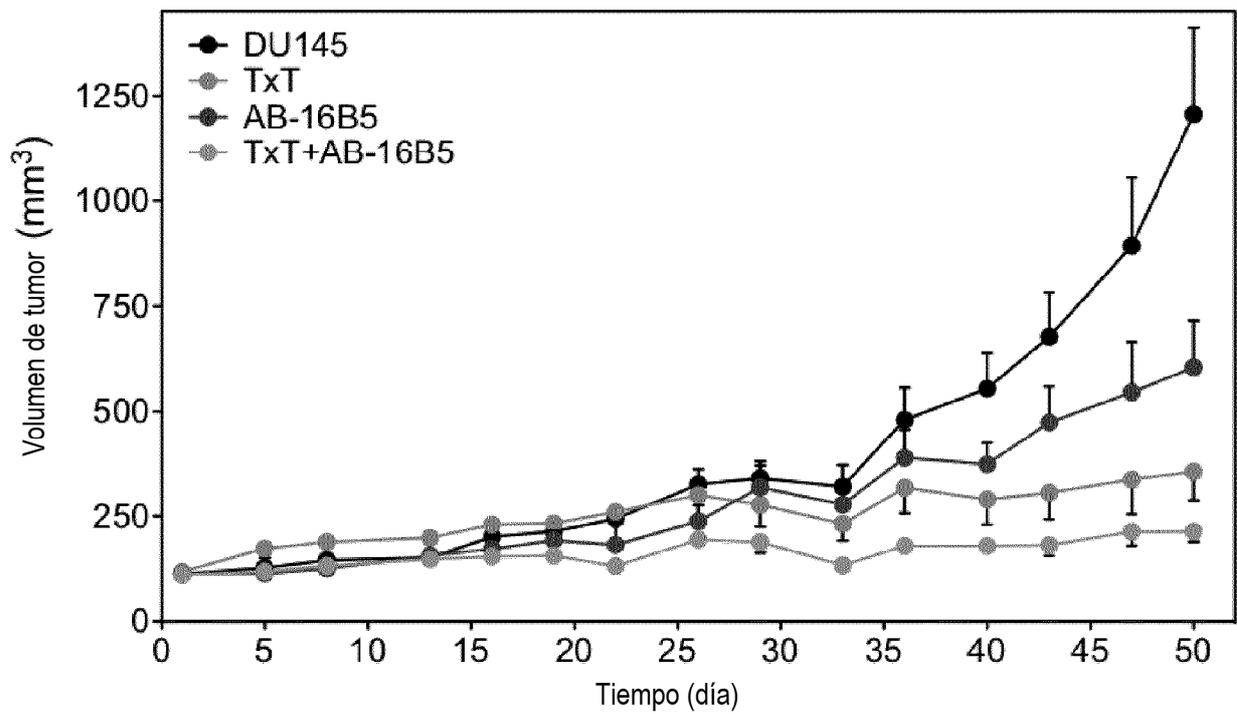


FIGURA 10

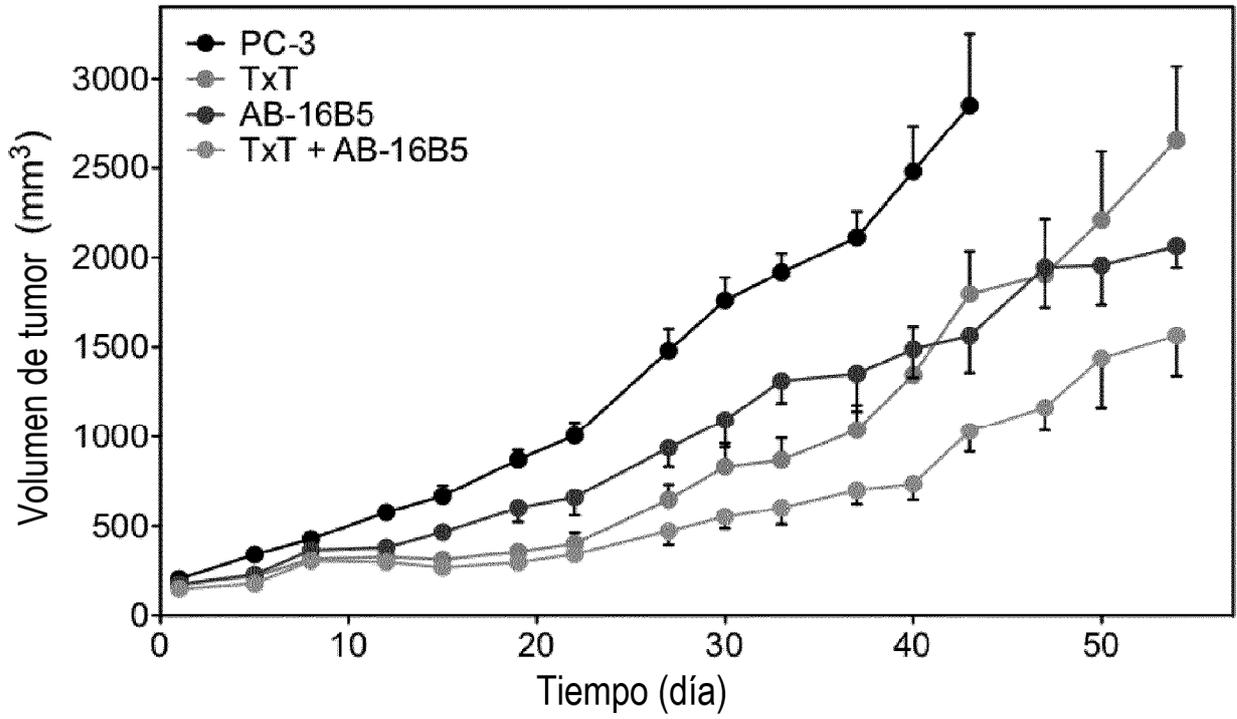


FIGURA 11

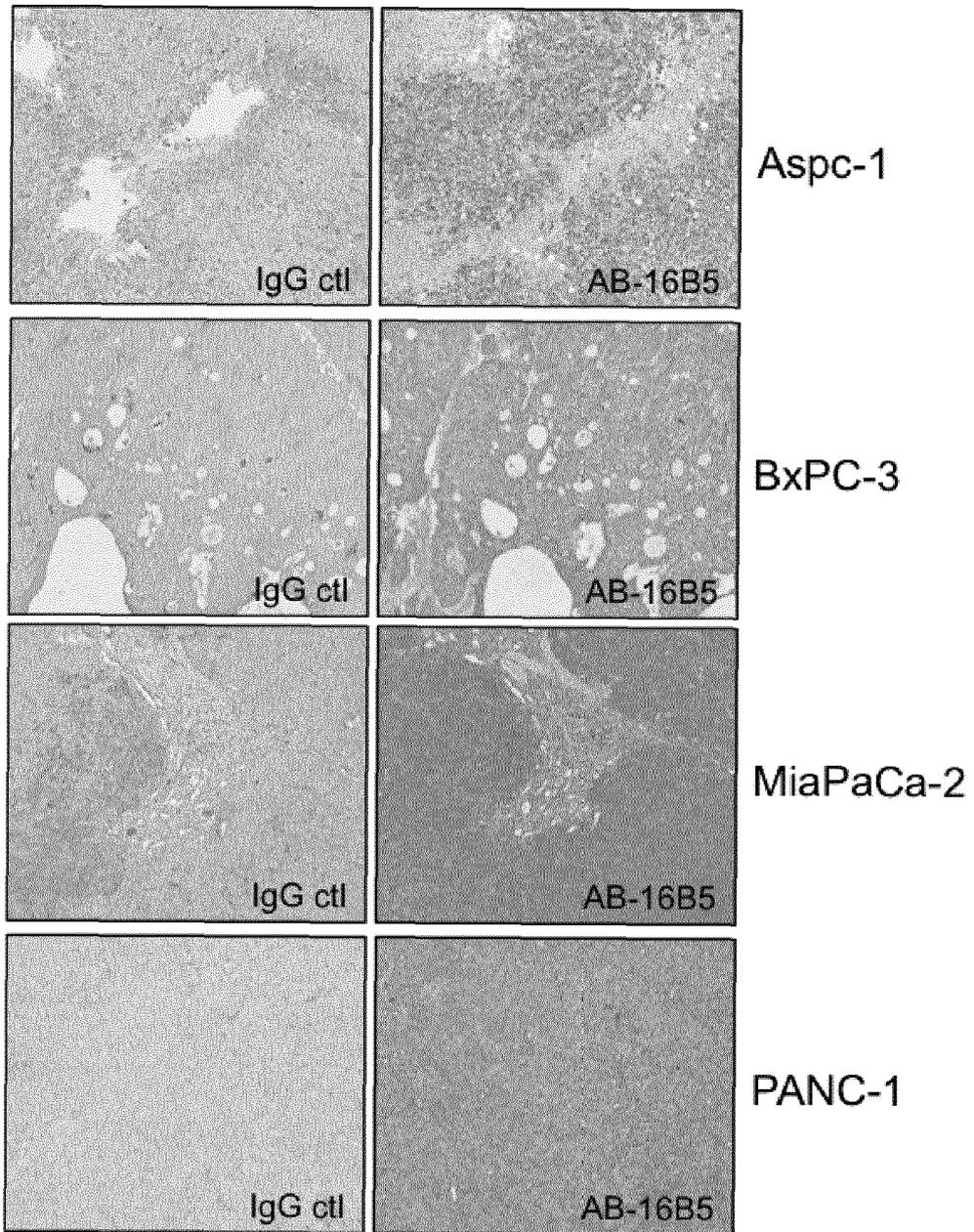


FIGURA 12

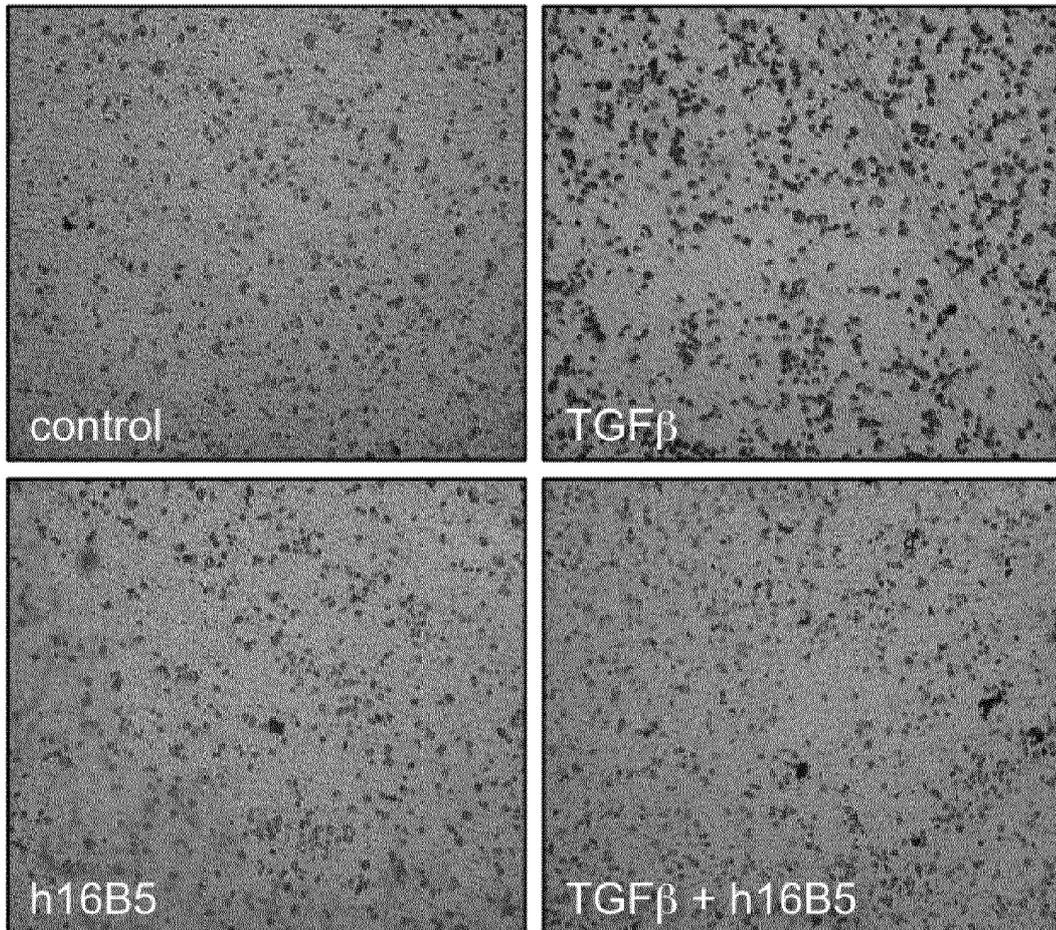


FIGURA 13

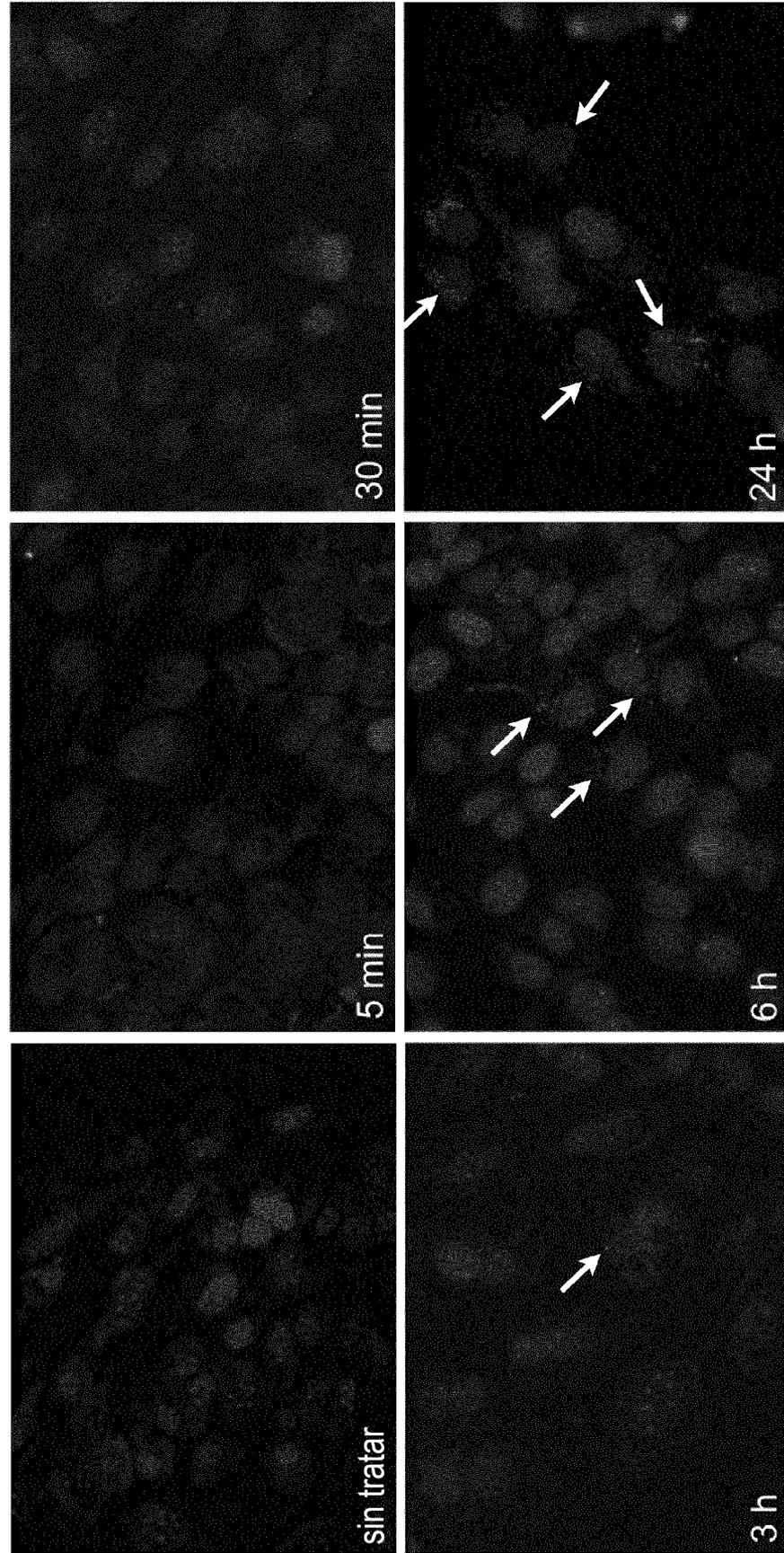


FIGURA 14

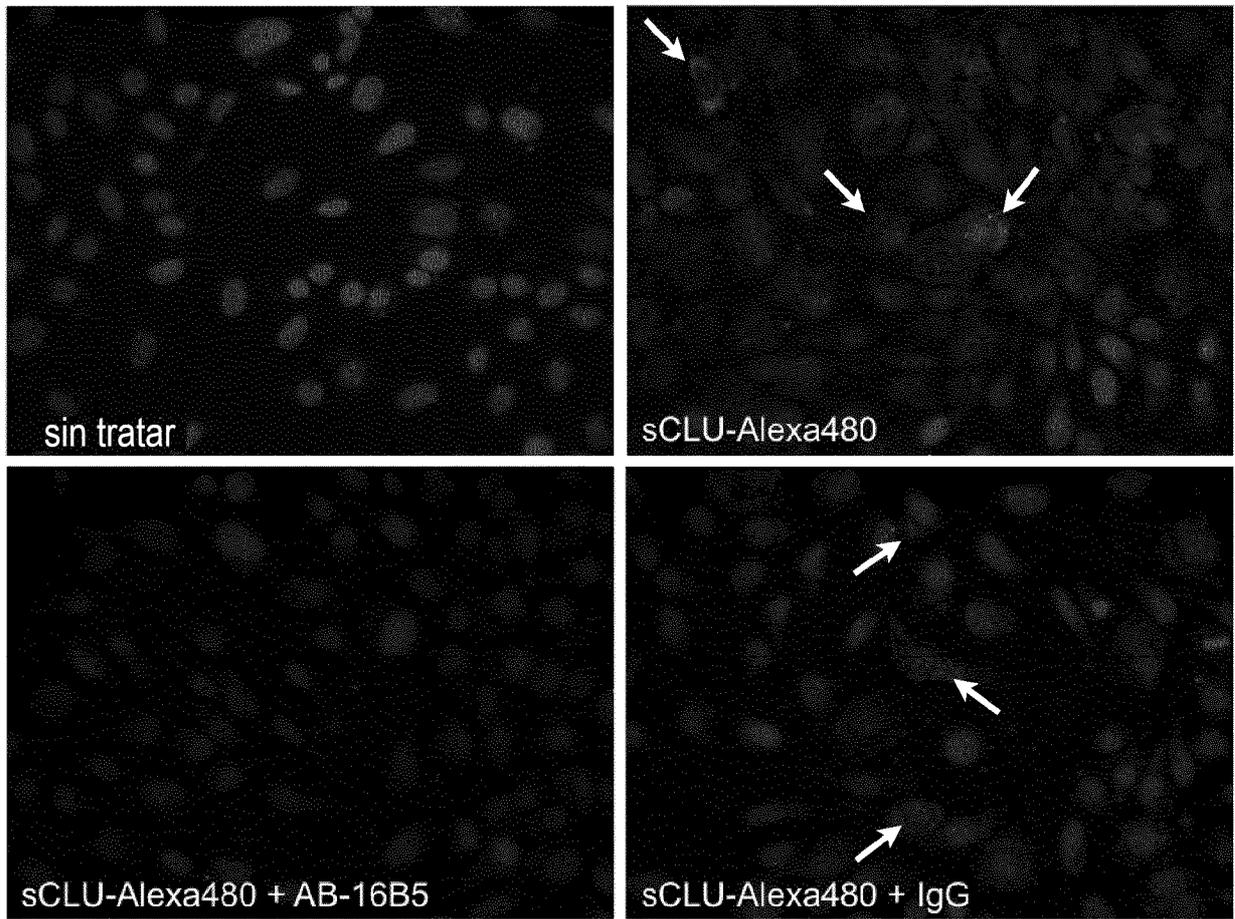


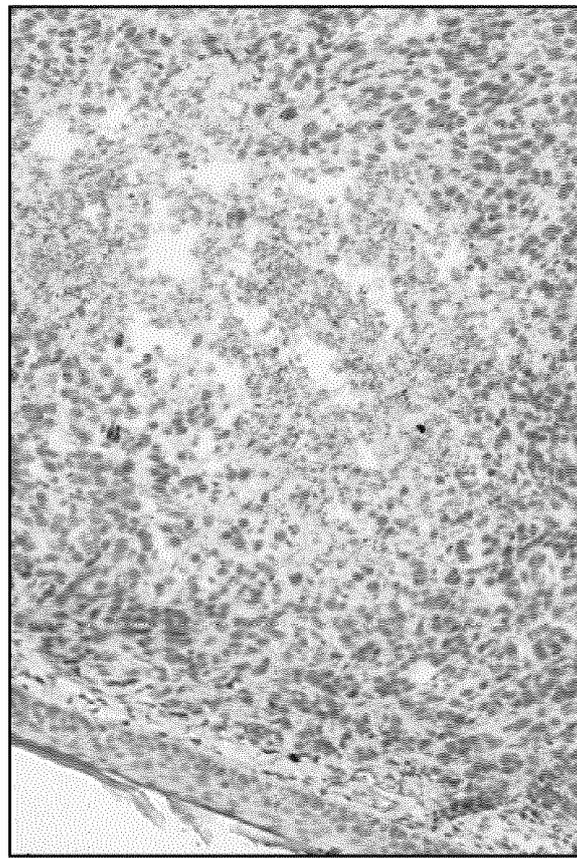
FIGURA 15

Query es clusterina humana (NP_001822)
 Sbjct es clusterina murina (NP_038520)

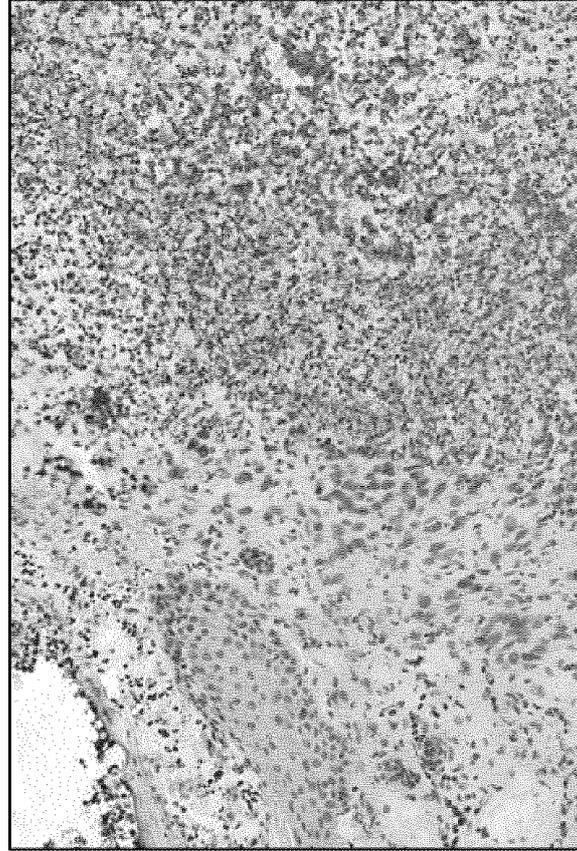
Identities = 334/435 (77%), Positivos = 384/435 (89%), Huecos = 0/435 (0%)

Query 67	WESGQVLGDQTVSDNELQEMSNQGSKYVNKEIQNAVNGVKQIKTLIEKTNEERKTLLSNL	126
SEQ NO.56	W++G VLG+Q VSDNELQE+S QGS+Y+NKEIQNAV GVK IKTTLIEKTN ERK+LL++L	
SEQ NO.57	W G VLG Q VSDNELQE S QGS Y NKEIQNAV GVK IKTTLIEKTN ERK LL L	
Sbjct 14	WDNGMVLGEQEVSDNELQELSTQGSRYINKEIQNAVQGVKHIKTTLIEKTNAERKSLLSL	73
Query 127	EEAKKKKEDALNETRESETKLKLPGVCNETMMALWEECKPCLKQTCMKFYARVCRSGSG	186
SEQ NO.56	EEAKKKKEDAL +TR+SE KLK P VCNETMMALWEECKPCLK TCMKFYARVCRSGSG	
SEQ NO.57	EEAKKKKEDAL TR SE KLK P VCNETMMALWEECKPCLK TCMKFYARVCRSGSG	
Sbjct 74	EEAKKKKEDALETRDSEMKLKAFPEVCNETMMALWEECKPCLKHTCMKFYARVCRSGSG	133
Query 187	LVGRQLEEFNLQSSPFYFWMNGDRIDSLENDRQQOTHMLDVMQDHFSSRASSIIDELFQDR	246
SEQ NO.56	LVG+QLEEFNLQSSPFYFWMNGDRIDSLE+DRQQ+ +LD MQD F+RAS IID LFQDR	
SEQ NO.57	LVG QLEEFNLQSSPFYFWMNGDRIDSLE DRQQ LD MQD F RAS IID LFQDR	
Sbjct 134	LVGQQLEEFNLQSSPFYFWMNGDRIDSLES DRQQSQVLDAMQDSFARASGIIDTLFQDR	193
Query 247	FFTREPQDITYHYLPFSLPHRRPHFFPKSRIVRSLMPFSPYEPLNFHAMFQPFLEMIHEA	306
SEQ NO.56	FF RE D +++ P PH+RPHF +PKSR+VRSLM S Y P +FH MFQPF EMIH+A	
SEQ NO.57	FF RE D P PH RPHF PKSR VRSLM S Y P FH MFQPF EMIH A	
Sbjct 194	FFARELHDPHYFSPIGFPHKRPHFLYPKSRIVRSLMSPSHYGPPSFHNMFPFFEMIHQA	253
Query 307	QQAMDIFHSPAFQHPPTEFIREGDDDRTVCREIRHNSTGCLRMKDQCDKCREILSVDCS	366
SEQ NO.56	QQAMD+ HSPAFQ P +F+REG+DDRTVC+EIR NSTGCL+MK QC+KC+EILSVDCS	
SEQ NO.57	QQAMD HSPAFQ P F REG DDRTVC EIR NSTGCL MK QC KC EILSVDCS	
Sbjct 254	QQAMDVQLHSPAFQFPDVFDFLREGEDDRTVCKEIRRNSTGCLKMKGQCEKQEILSVDCS	313
Query 367	TNNPSQAKLRRELDESLOVAERLTRKYNELLKSYQWKMLNTSSLLEQLNEQFNWVSRLAN	426
SEQ NO.56	TNNP+QA LR+EL++SLOVAERLT +Y ELL+S+Q KMLNTSSLLEQLN+QFNWVS+LAN	
SEQ NO.57	TNNP QA LR EL SLOVAERLT Y ELL S Q KMLNTSSLLEQLN QFNWVS LAN	
Sbjct 314	TNNPAQANLRQELNDSLOVAERLTEQYKELLQSFQSKMLNTSSLLEQLNDQFNWVSQLAN	373
Query 427	LTQGEDQYYLRVTTVASHTSDSDVPSGVTEVVVKLFSDSDPITVTVPEVSRKNPKFMETV	486
SEQ NO.56	LTQGED+YYLRV+TV +H+SDS+VPS VTEVVVKLFSDSDPITV +P EVS+ NPKFM+TV	
SEQ NO.57	LTQGED YYLRV TV H SDS VPS VTEVVVKLFSDSDPITV P EVS NPKFM TV	
Sbjct 374	LTQGEDKYYLRVSTVTTTHSSDSEVPSRVTEVVVKLFSDSDPITVVLPEEVSKDNPKFMDTV	433
Query 487	AEKALQEYRKKHREE 501	
SEQ NO.56	AEKALQEYR+K R E	
SEQ NO.57	AEKALQEYR K R E	
Sbjct 434	AEKALQEYRRKSRAE 448	

FIGURA 16



4T1 - ctrl



4T1 - AB-16B5

FIGURA 14

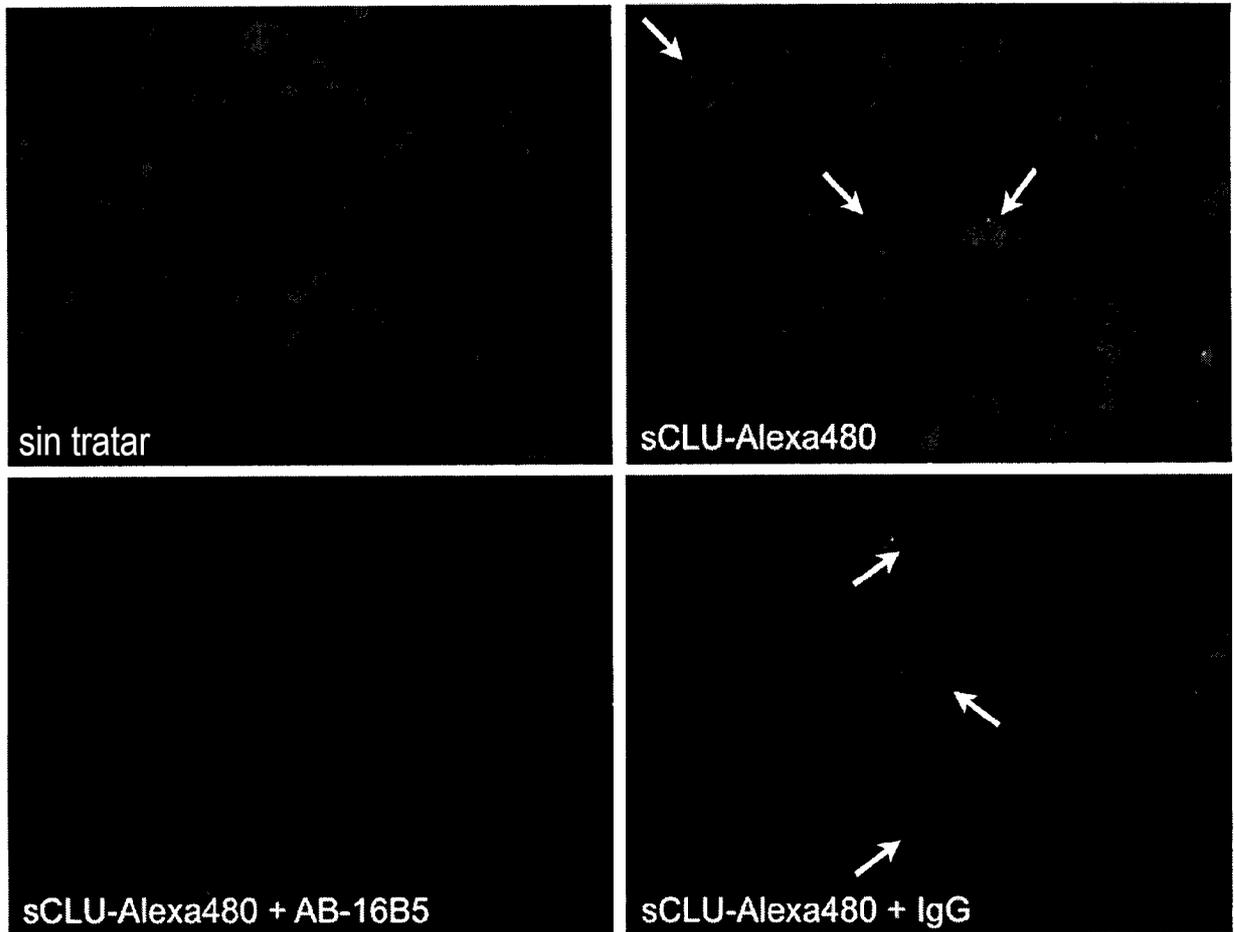


FIGURA 15

Query es clusterina humana (NP_001822)
 Sbjct es clusterina murina (NP_038520)

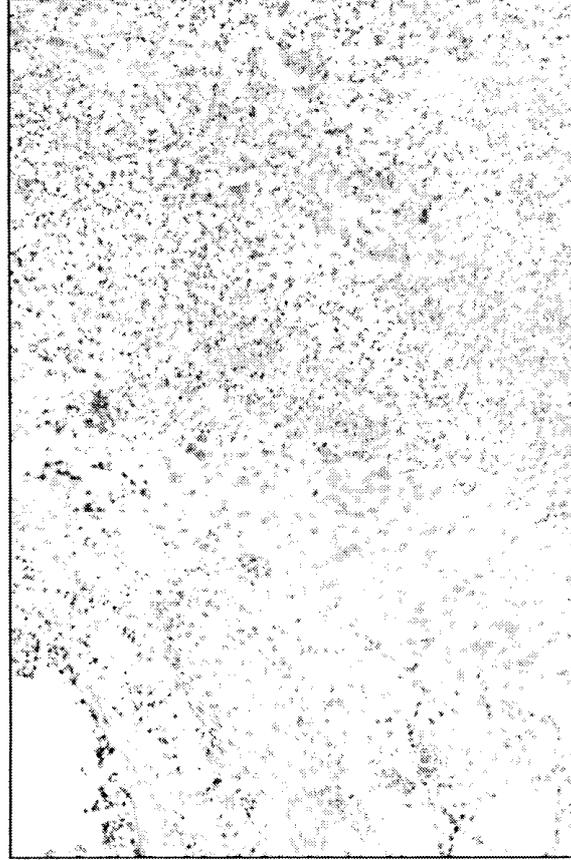
Identidades = 334/435 (77%), Positivos = 384/435 (89%), Huecos = 0/435 (0%)

Query	67	WESGQVLGDQTVSDNELQEMSNQGSKYVNKEIQNAVNGVKQIKTLIEKTNEERKTLLSNL	126
SEQ NO.	56	W++G VLG+Q VSDNELQE+S QGS+Y+NKEIQNAV GVK IKTTLIEKTN ERK+LL++L	
SEQ NO.	57	W G VLG Q VSDNELQE S QGS Y NKEIQNAV GVK IKTTLIEKTN ERK LL L	
Sbjct	14	WDNGMVLGEQEVSDNELQELSTQGSRYINKEIQNAVQGVKHIKTTLIEKTNAERKSLLSL	73
Query	127	EEAKKKKEDALNETRESETKLKLPGVCNETMMALWEECKPCLKQTCMKFYARVCRSGSG	186
SEQ NO.	56	EEAKKKKEDAL +TR+SE KLK P VCNETMMALWEECKPCLK TCMKFYARVCRSGSG	
SEQ NO.	57	EEAKKKKEDAL TR SE KLK P VCNETMMALWEECKPCLK TCMKFYARVCRSGSG	
Sbjct	74	EEAKKKKEDALEDRDSEMKLKAFPEVCNETMMALWEECKPCLKHTCMKFYARVCRSGSG	133
Query	187	LVGRQLEEFNLQSSPFYFWMNGDRIDSLENDRQQTHMLDVMQDHFSSRASSIIDELFQDR	246
SEQ NO.	56	LVG+QLEEFNLQSSPFYFWMNGDRIDSLE+DRQQ+ +LD MQD F+RAS IID LFQDR	
SEQ NO.	57	LVG QLEEFNLQSSPFYFWMNGDRIDSLE DRQQ LD MQD F RAS IID LFQDR	
Sbjct	134	LVGQQLEEFNLQSSPFYFWMNGDRIDSLES DRQQSQVLDAMQDSFARASGIIDTLFQDR	193
Query	247	FFTREPQDITYHYLPFSLPHRRPHFFFPKSRIVRSLMPFSPYEPLNFHAMFQPFLEMIHEA	306
SEQ NO.	56	FF RE D +++ P PH+RPHF +PKSR+VRSLM S Y P +FH MFQPF EMIH+A	
SEQ NO.	57	FF RE D P PH RPHF PKSR VRSLM S Y P FH MFQPF EMIH A	
Sbjct	194	FFARELHDPHYFSPIGFPHKRPFLYPKSRLVRSLMSPSHYGPPSFHNMFPFFEMIHQA	253
Query	307	QQAMDIFHFSPAFQHPPTFEFIREGDDDRTVCREIRHNSTGCLRMKDQCCKREILSVDCS	366
SEQ NO.	56	QQAMD+ HSPAFQ P +F+REG+DDRTVC+EIR NSTGCL+MK QC+KC+EILSVDCS	
SEQ NO.	57	QQAMD HSPAFQ P F REG DDRTVC EIR NSTGCL MK QC KC EILSVDCS	
Sbjct	254	QQAMDVQLHSPAFQFPDVFDFLREGEDDRTVCKEIRRNSTGCLKMKGQCEKCEILSVDCS	313
Query	367	TNNPSQAKLRRELDESLOVAERLTRKYNELLKSYQWKMLNTSSLLEQLNEQFNWVSRLAN	426
SEQ NO.	56	TNNP+QA LR+EL++SLQVAERLT +Y ELL+S+Q KMLNTSSLLEQLN+QFNWVS+LAN	
SEQ NO.	57	TNNP QA LR EL SLQVAERLT Y ELL S Q KMLNTSSLLEQLN QFNWVS LAN	
Sbjct	314	TNNPAQANLRQELNDSLQVAERLTEQYKELLQSFQSKMLNTSSLLEQLNDQFNWVSQLAN	373
Query	427	LTQGEDQYYLRVTTVASHTSDSDVPSGVTEVVVVKLFDSDPITVTVVPEVSRKNPKFMETV	486
SEQ NO.	56	LTQGED+YYLRV+TV +H+SDS+VPS VTEVVVVKLFDSDPITV +P EVS+ NPKFM+TV	
SEQ NO.	57	LTQGED YYLRV TV H SDS VPS VTEVVVVKLFDSDPITV P EVS NPKFM TV	
Sbjct	374	LTQGEDKYYLRVSTVTTTHSSDSEVPSRVTEVVVVKLFDSDPITVVLPEEVSKDNPKFMDTV	433
Query	487	AEKALQEYRKKHREE	501
SEQ NO.	56	AEKALQEYR+K R E	
SEQ NO.	57	AEKALQEYR K R E	
Sbjct	434	AEKALQEYRRKSRAE	448

FIGURA 16



4T1 - ctrl



4T1 - AB-16B5