

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 737 626**

51 Int. Cl.:

C07K 16/40 (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2014 PCT/SE2014/051535**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015 WO15094106**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2014 E 14871151 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.04.2019 EP 3083698**

54 Título: **Anticuerpos anti-TK1 monoclonales**

30 Prioridad:
19.12.2013 SE 1351531

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.01.2020

73 Titular/es:
**AROCCELL AB (100.0%)
Virdings Allé 32 B
754 50 Uppsala, SE**

72 Inventor/es:
ERIKSSON, STAFFAN

74 Agente/Representante:
PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

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

ES 2 737 626 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-TK1 monoclonales

5 CAMPO TÉCNICO

Las presentes realizaciones se refieren en general a anticuerpos anti-TK1 monoclonales, a un kit y a procedimientos que implican el uso de dichos anticuerpos anti-TK1 monoclonales.

10 ANTECEDENTES

La timidina quinasa 1, TK1, (ATP: timidina 5'-fosfotransferasa, EC 2.7.1.21) es una enzima involucrada en la síntesis de precursores de ADN. Una forma de TK1 está presente en niveles altos también en sueros de humanos y animales con tumores malignos. Por lo tanto, las mediciones de la actividad de TK1 en suero se han utilizado para el monitoreo y para fines de pronóstico en varias enfermedades malignas diferentes, pero principalmente en casos de leucemia y linfoma.

Además, TK1 es el único marcador de proliferación que se puede determinar en la sangre y es probable que proporcione un gran beneficio clínico si está disponible como prueba de laboratorio de rutina [1-8].

La actividad sérica de TK1 se ha medido utilizando un sustrato radioactivo ¹²⁵I-dUrd (el PROLIFIGEN® TK-REA, DiaSorin Inc.) durante varias décadas, pero este ensayo radioenzimático ha tenido un uso limitado y solo en caso de neoplasias hematológicas malignas [1, 2, 6]. En los últimos años ha estado disponible un ensayo de actividad TK1 no radiométrico (ensayo TK LIAISON®, DiaSorin Inc.). Este es un ensayo sensible y robusto y ha proporcionado información clínicamente valiosa en humanos y perros con neoplasias hematológicas, en particular para monitorear la terapia y predecir la recaída [8, 9].

Durante los últimos 15 años, los anticuerpos contra TK1 humanos han estado disponibles y han permitido la determinación de los niveles de proteína TK1, en contraste con la actividad de TK1, en diferentes tumores hematológicos y sólidos, como los carcinomas de mama [5, 10, 11] y varias otras formas de tumores sólidos y hematológicos [11, 12].

Las determinaciones de la proteína TK1 se basan principalmente en un procedimiento dot blot a base de anticuerpos anti-TK1 producidos contra la parte C-terminal de TK1 [3, 5, 10-13]. La razón principal de elegir esta estrategia para la producción de anticuerpos es que la región C-terminal está involucrada en la regulación del ciclo celular de TK1 [14-16]. Contiene una secuencia de reconocimiento para iniciar la degradación de TK1 durante la mitosis y se ha asumido que se trata de una región expuesta en la que podría ser posible generar anticuerpos [3, 8, 13, 20, 23-25]. Aunque el ensayo dot blot se ha utilizado con éxito en varios estudios [5, 10-13], la principal limitación es que no es un procedimiento de rutina en la práctica de laboratorio clínico. Ahora hay más de seis preparaciones diferentes de anticuerpos anti-TK1 disponibles comercialmente y se ha demostrado que varias reaccionan con TK1 recombinante y celular (www.acris-antibodies.com). Sin embargo, en la actualidad no existe un ensayo basado en anticuerpos para la TK1 sérica en la práctica clínica de rutina.

La razón principal de la dificultad para establecer un ensayo sensible y robusto para la TK1 sérica está probablemente relacionada con las formas complejas y variables de la TK1 presente en la sangre. Recientemente, se han realizado varios estudios, tanto con enzimas TK1 humanas como con perros, que caracterizan las formas recombinantes, celulares y séricas de la TK1 [17]. Se descubrió que la TK1 está presente en múltiples complejos oligoméricos y, lo que es más importante, solo una subfracción de estos complejos era enzimáticamente activa. Este es particularmente el caso de la TK1 sérica en pacientes con enfermedades de tumores sólidos. La oligomerización parece estar relacionada con la formación de enlaces reticulares de disulfuro que se producen en la sangre, pero lo más probable es que también cuando las células tumorales se desintegran y la TK1 se transporta al torrente sanguíneo. El tratamiento con agentes reductores lleva a una reorganización de los complejos séricos de TK1 [2, 17], pero hasta ahora no se han abordado las consecuencias de estos hechos para el diseño de ensayos inmunes. El hecho de que una parte importante de la proteína TK1 en la sangre sea enzimáticamente inactiva puede explicar que las mediciones de la actividad de la enzima TK1 no son muy efectivas en el caso de enfermedades de tumores sólidos [18]. Por lo tanto, hay una gran necesidad de establecer procedimientos de diagnóstico *in vitro* de rutina que pueden medir la TK1 sérica con suficiente sensibilidad para su uso clínico.

RESUMEN

Es un objetivo proporcionar un anticuerpo monoclonal o fragmento capaz de unirse a una forma sérica de TK1 humana.

Este y otros objetivos se cumplen mediante realizaciones como se describe en el presente documento.

Un aspecto de las realizaciones se refiere a un anticuerpo monoclonal o un fragmento de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a una forma sérica de la timidina quinasa humana 1 (TK1). El anticuerpo o fragmento monoclonal

tiene especificidad para un epítipo seleccionado de un grupo que consiste en:

GEAVAARKLF (SEQ ID NO: 2) de TK1 humana;

5 al menos uno o NCPVPGKPGGE (SEQ ID NO: 4), PVPKGKPGGEAV (SEQ ID NO: 5) y NCPVPGKPGGEAV (SEQ ID NO: 3) de TK1 humana; y

un epítipo dependiente de la conformación de TK1 humana.

10 Otro aspecto de las realizaciones se refiere a un procedimiento para determinar un nivel de material de TK1 celular y/o sérica en una muestra corporal. El procedimiento comprende poner en contacto la muestra corporal con un anticuerpo monoclonal o fragmento según lo anterior. El procedimiento también comprende detectar una cantidad de anticuerpo o fragmento monoclonal unido.

15 Un aspecto adicional de las realizaciones se refiere a un kit para determinar un nivel de material de TK1 celular y/o sérica en una muestra corporal. El kit comprende un primer anticuerpo monoclonal según lo anterior inmovilizado en un soporte sólido o destinado a inmovilizarse en el soporte sólido. El kit también comprende un segundo anticuerpo monoclonal según lo anterior. En este aspecto, el primer anticuerpo monoclonal tiene especificidad para un primer epítipo seleccionado de un grupo que consiste en:

20 GEAVAARKLF (SEQ ID NO: 2) de TK1 humana,

al menos uno de NCPVPGKPGGE (SEQ ID NO: 4), PVPKGKPGGEAV (SEQ ID NO: 5) y NCPVPGKPGGEAV (SEQ ID NO: 3) de TK1 humana, y

25 un epítipo dependiente de la conformación de TK1 humana. El segundo anticuerpo monoclonal tiene especificidad para un segundo epítipo diferente seleccionado de este grupo.

30 Otro aspecto más de las realizaciones se refiere a un procedimiento para estimar la probabilidad de recurrencia de un tumor en un sujeto. El procedimiento comprende determinar un nivel de material de TK1 sérica en una muestra corporal del sujeto utilizando un procedimiento o un kit según lo anterior. El procedimiento también comprende comparar el nivel de material de TK1 sérica en la muestra corporal con un nivel de material TK1 sérico representativo de una población de sujetos sanos o con un nivel de material TK1 sérico previamente determinado en el sujeto.

35 Un aspecto adicional de las realizaciones se refiere a un procedimiento para determinar la proliferación celular en un sujeto. El procedimiento comprende determinar un nivel de material de TK1 sérica en una muestra corporal del sujeto utilizando un procedimiento o un kit según lo anterior. El procedimiento también comprende determinar la proliferación celular basada en el nivel de material de TK1 sérica en la muestra corporal.

40 Otro aspecto más de las realizaciones se refiere a un procedimiento para determinar una respuesta del proceso de proliferación en un sujeto que padece una enfermedad maligna. El procedimiento comprende determinar un nivel de material de TK1 sérica en una muestra corporal del sujeto utilizando un procedimiento o un kit según lo anterior. El procedimiento también comprende determinar la respuesta del proceso de proliferación basada en el nivel de material de TK1 sérica en la muestra corporal.

45 Un aspecto adicional de las realizaciones se refiere a un procedimiento para determinar un nivel de infección o la proliferación celular tumoral en un sujeto. El procedimiento comprende determinar un nivel de material de TK1 sérica en una muestra corporal del sujeto utilizando un procedimiento o un kit según lo anterior. El procedimiento también comprende determinar el nivel de inflamación, infección o proliferación celular tumoral basado en el nivel de material de TK1 sérica en la muestra corporal.

Otro aspecto más de las realizaciones se refiere a un péptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos GEAVAARKLF (SEQ ID NO: 2), NCPVPGKPGGE (SEQ ID NO: 4), PVPKGKPGGEAV (SEQ ID NO: 5) o NCPVPGKPGGEAV (SEQ ID NO: 3).

55 Otro aspecto adicional de las realizaciones se refiere a un procedimiento para producir un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a una forma sérica de la TK1 humana. El procedimiento comprende la inmunización de un animal no humano con un primer conjugado peptídico que comprende un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos GQPAGPDNKENCNPVPGKPGGEAVAARKLFPAPQ (SEQ ID NO: 1) acoplado a una primera proteína portadora o un
60 segundo conjugado peptídico que comprende el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos GQPAGPDNKENCNPVPGKPGGEAVAARKLFPAPQ (SEQ ID NO: 1) acoplado a una segunda proteína portadora que es diferente de la primera proteína portadora. El procedimiento también comprende aislar esplenocitos del animal no humano con títulos en sangre para el primer conjugado peptídico o el segundo conjugado peptídico. El procedimiento comprende además la formación de hibridomas mediante la fusión de los esplenocitos con mielomas. El procedimiento
65 comprende adicionalmente el sobrenadante de selección de hidridomas, que resulta de la inmunización con el primer conjugado peptídico, para títulos para el segundo conjugado peptídico y el sobrenadante de selección de hidridomas,

resultante de la inmunización con el segundo conjugado peptídico, para títulos para el primer conjugado peptídico. El procedimiento comprende además seleccionar un hibridoma que produzca un anticuerpo monoclonal capaz de unirse al primer conjugado peptídico, al segundo conjugado peptídico y a la rTK1 humana. El procedimiento comprende adicionalmente aislar el anticuerpo monoclonal del sobrenadante del hibridoma seleccionado.

5

Los anticuerpos y fragmentos monoclonales de las realizaciones tienen excelentes propiedades en términos de poder unirse a la forma sérica de la TK1 humana y, por lo tanto, pueden usarse en diversos kits y procedimientos que implican determinar el nivel de la forma sérica de la TK1 humana en una muestra.

10 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las realizaciones, junto con otros objetivos y ventajas de las mismas, pueden comprenderse de la mejor manera al referirse a la siguiente descripción, tomándola junto con los dibujos adjuntos, en los que:

15 La fig. 1 ilustra los resultados de los ensayos dot blot con sobrenadantes a partir de hibromas peptídicos anti-XPA 210 y preparaciones de TK1 recombinante y sueros de pacientes sanos y con cáncer. El síndrome mielodisplásico (MDS, por sus siglas en inglés) es una colección diversa de afecciones médicas hematológicas que involucran la producción ineficaz de la clase mieloide de las células sanguíneas y también se conoce como preleucemia. CA-125 indica en este caso a pacientes sospechosos de padecer cáncer de ovario.

20

La fig. 2 ilustra un modelo estructural para la región C-terminal de la TK1 en un complejo tetramérico basado en similitudes de secuencia y la estructura 3D de *U. ureolyticum/pavreum* (nomenclatura actual) y la TK1 humana [19, 20]. La región etiquetada A representa el aminoácido 195-207. La región etiquetada B representa los aminoácidos 208-216, que probablemente incluyen regiones de doblez. La región etiquetada C, es decir, los aminoácidos 215-222, contiene una hélice alfa C-terminal predicha cerca del final de la proteína. Las regiones A, B y C probablemente estén expuestas hacia la superficie del complejo enzimático y, por lo tanto, podrían ser sitios antigénicos adecuados para la producción de anticuerpos.

25

La fig. 3 es una ilustración esquemática de una realización de diseño de un ensayo ELISA tipo sándwich.

30

La fig. 4 ilustra los valores de actividad de TK para sueros de 10 donantes de sangre sanos y 28 pacientes con cáncer de próstata diagnosticado determinados con el ensayo TK LIAISON® (DiaSorin Inc.).

La fig. 5 ilustra los valores de absorbancia para los sueros de 10 donantes de sangre sanos y 28 pacientes con cáncer de próstata diagnosticado determinado con un ensayo ELISA tipo sándwich basado en los anticuerpos XPA 210-Ar1 y XPA 210-Ar2.

35

Las figs. 6A-6D ilustran la electroforesis en gel de agarosa del ARN total de XPA 210-Ar1 (Fig. 6B), XPA 210-Ar2 (Fig. 6C) y XPA 210-Ar3 (Fig. 6D) que producen células de hibridoma. La fig. 6A ilustra el marcador de ADN Marker III, que también está presente en el carril M de las figs. 6B-6D, donde el carril R indica el ARN total de las células de hibridoma respectivas.

40

Las figs. 7A-7C ilustran la electroforesis en gel de agarosa de productos PCR de XPA 210-Ar1 (Fig. 7A), XPA 210-Ar2 (Fig. 7B) y XPA 210-Ar3 (Fig. 7C) que producen células de hibridoma. Carril M, marcador de ADN Marker III, Carril 1, VH y Carril 2, VL.

45

Las figs. 8A y 8B ilustran los resultados de las mediciones de Attana 2000 de la interacción entre TK1 humana recombinante y XPA 210-Ar1 (Fig. 8A) y XPA 210-Ar2 (Fig. 8B). El ajuste de la curva se realizó utilizando un modelo de unión 1:1 y las constantes calculadas son la tasa de asociación (K_a), la tasa de disociación (K_d), la afinidad (KD), la tasa de difusión de masa (k_t) y la señal máxima ($B_{máx}$).

50

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Las presentes realizaciones se refieren generalmente a anticuerpos o fragmentos de anticuerpo anti-timidina quinasa 1 (anti-TK1) y a procedimientos y kits que implican el uso de dichos anticuerpos anti-TK1 monoclonales o fragmentos de anticuerpo. La presente invención está dirigida a un anticuerpo monoclonal o fragmento de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a una forma sérica de una timidina quinasa humana como se define en las reivindicaciones.

55

60 Los anticuerpos monoclonales anti-TK1 y los fragmentos de las realizaciones son muy útiles como herramientas de diagnóstico y clínicas ya que estos anticuerpos y fragmentos monoclonales anti-TK1 son capaces de unirse a una forma sérica de TK1 humana.

Hay anticuerpos anti-TK1 monoclonales conocidos en la técnica. Aunque estos anticuerpos son capaces de unirse a la TK1 recombinante humana (rTK1) y, en grados variables, a una forma celular de la TK1 humana, a veces denominada TK1 citosólica, no son eficientes en términos de poder unirse a la forma sérica de la TK1 humana en

65

muestras corporales, tal como en muestras de suero o sangre.

La TK1 en seres humanos está presente en varias formas dependiendo de la presencia de ciertas moléculas, por ejemplo, presencia o ausencia de trifosfato de adenosina (ATP); dependiendo de la concentración de la proteína, es decir, concentración alta o baja; dependiendo del tipo de proteína, es decir, TK1 nativa o recombinante; y dependiendo del sitio de la proteína, es decir, en suero o citoplasma.

En general, la TK1 humana citosólica y recombinante se presenta como tetrámeros en presencia de ATP o en concentraciones altas, y como dímeros en ausencia de ATP o en concentraciones bajas. La forma tetramérica de la TK1 citosólica y humana recombinante tiene una alta actividad de TK1, mientras que la forma dimérica tiene una menor actividad de TK1 [26].

La TK1 sérica humana, en claro contraste, puede estar en forma de complejos de alto peso molecular, tales como oligómeros o comprendiendo dichos oligómeros, que tienen actividad de TK1 sérica y formas de dímero y tetrámero que tienen una actividad muy baja o incluso ninguna de TK1 sérica.

Los anticuerpos anti-TK1 disponibles comercialmente (3B3.E11 de Abcam; M02, clon F12 de Abnova; EPR3194 y EPR3193, anticuerpos monoclonales de conejo de Abnova) no reaccionan suficientemente bien con la TK1 sérica. Estos anticuerpos anti-TK1 se generan en base a TK1 recombinante humana. Esto indica, junto con los resultados experimentales que se presentan en el presente documento, que la generación de anticuerpos monoclonales anti-TK1 basados en TK1 recombinante humana es generalmente ineficiente y, por lo general, no producirá anticuerpos anti-TK1 capaces de unirse a la forma sérica de la TK1 con una fuerza de unión suficiente.

Además, los anticuerpos monoclonales anti-TK1 producidos contra la misma porción de la proteína TK1 tendrán una especificidad y propiedades de unión muy diferentes con respecto a la forma sérica de la TK1 como se muestra en el presente documento. Esto significa que un anticuerpo monoclonal anti-TK1 que reconoce un primer epítipo en una porción de la proteína TK1 puede unirse a la forma sérica de la TK1 humana, mientras que otro anticuerpo monoclonal anti-TK1 que reconoce un segundo epítipo diferente en la misma porción de la proteína TK1 no se unirá bien a la forma sérica de la TK1, incluso si ambos anticuerpos monoclonales anti-TK1 se han generado contra la misma porción general de la proteína TK1.

Un intento de explicación de esta variación en las propiedades de unión de diferentes anticuerpos anti-TK1 monoclonales radica probablemente en el hecho de que solo los anticuerpos anti-TK1 monoclonales tengan especificidad por epítopos especiales en TK1 humana que sean eficientes en su capacidad de unirse a la forma sérica de la TK1 humana. Las presentes realizaciones han identificado dichos epítopos especiales que permiten la formación de anticuerpos monoclonales anti-TK1 y fragmentos de anticuerpos con la propiedad deseada de poder unirse a la forma sérica de la TK1 humana.

La naturaleza única de los anticuerpos monoclonales anti-TK1 descritos en el presente documento es, por lo tanto, muy probablemente, al menos en parte, debido a sus propiedades de unión al epítipo.

Por consiguiente, un aspecto de las realizaciones se refiere a un anticuerpo monoclonal o a un fragmento de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a una forma sérica de la TK1 humana. El anticuerpo o fragmento monoclonal tiene especificidad para un epítipo seleccionado de un grupo que consiste en:

- GEAVAARKLF (SEQ ID NO: 2) de TK1 humana;
- al menos uno de NCPVPGKPGE (SEQ ID NO: 4), PVPGKPGEAV (SEQ ID NO: 5) y NCPVPGKPGEAV (SEQ ID NO: 3) de TK1 humana; y
- un epítipo dependiente de la conformación de TK1 humana.

Los datos experimentales tal como se presentan en el presente documento indican que los epítopos del grupo presentado anteriormente son epítopos clave en la TK1 humana con respecto a la producción de un anticuerpo o fragmento monoclonal anti-TK1 capaz de unirse a la forma sérica de la TK1 humana.

El epítipo GEAVAARKLF (SEQ ID NO: 2) corresponde a los aminoácidos número 213 a 222 en TK1 humana. Este epítipo se indica generalmente como 10-mer o péptido 10-mer en el presente documento.

El segundo epítipo del grupo presentado anteriormente a su vez comprende tres secuencias relacionadas presentes en la porción de TK1 humana que se extiende desde el aminoácido número 205 hasta el 216. Estas secuencias relacionadas son NCPVPGKPGE (SEQ ID NO: 4) generalmente indicado como péptido 7 en el presente documento, PVPGKPGEAV (SEQ ID NO: 5) generalmente indicado como péptido 8 en el presente documento, NCPVPGKPGEAV (SEQ ID NO: 3) generalmente indicado como 12-mer o péptido 12-mer en el presente documento.

Estos epítomos (SEQ ID NO: 2-5) están presentes en la región C-terminal de la TK1 humana. Esta región C-terminal de TK1 está involucrada en la regulación del ciclo celular de TK1 y contiene una secuencia de reconocimiento para iniciar la degradación de la TK1 durante la mitosis.

- 5 Estos epítomos también forman parte de una secuencia más larga GQPAGPDNKENCVPVPGKPGGEAVAARKLFAPQ (SEQ ID NO: 1) en la parte C-terminal de la TK1 humana. Esta secuencia más larga se indica generalmente como XPA 210, 31-mer o péptido 31-mer en el presente documento.

El tercer epítomo del grupo presentado anteriormente es un epítomo dependiente de la conformación de TK1 humana.

- 10 Esto significa que un anticuerpo monoclonal anti-TK1 o fragmento que tiene especificidad por el epítomo dependiente de la conformación no muestra una unión distinta a ninguna porción peptídica corta, es decir, de 10 a 12 aminoácidos de longitud, de la TK1 humana. En claro contraste, la unión del anticuerpo o fragmento anti-TK1 monoclonal será en este caso dependiente de la conformación con un epítomo o dominio antigénico que consiste en múltiples regiones, es decir, al menos dos, que no son adyacentes entre sí en la secuencia primaria de la TK1 humana pero están
 15 formadas por una cierta conformación tridimensional (3D) de un dominio antigénico. Por lo tanto, en la estructura 3D de la TK1 humana, estas múltiples regiones estarán presentes adyacentes o cercanas entre sí para constituir juntas o formar el epítomo dependiente de la conformación.

- En una realización preferida, el epítomo dependiente de la conformación es un epítomo dependiente de la conformación presente en la parte C-terminal de la TK1 humana. En una realización preferida adicional, el epítomo dependiente de la conformación es un epítomo dependiente de la conformación presente en la parte C-terminal de la TK1 humana que se extiende desde el aminoácido número 195 hasta el aminoácido número 225, es decir, la parte de la TK1 humana correspondiente a XPA 210.

- 25 Por lo tanto, el plegamiento de la secuencia de aminoácidos primaria de TK1 humana para formar una estructura de proteína 3D trae múltiples regiones al C-terminal y preferentemente en la parte del C-terminal correspondiente a XPA 210 muy juntas para permitir la formación del epítomo dependiente de la conformación incluso si estas regiones no son adyacentes entre sí en la secuencia primaria de TK1 humana.

- 30 En una realización preferida, el anticuerpo monoclonal o fragmento de las realizaciones es capaz de unirse no solo a la forma sérica de la TK1 humana sino también a la TK1 recombinante humana (rTK1)

En una realización preferida, el anticuerpo monoclonal o fragmento de las realizaciones es capaz de unirse no solo a la forma sérica de la TK1 humana sino también a una forma celular de la TK1 humana, es decir la TK1 citosólica.

- 35 En una realización preferida, el anticuerpo monoclonal o fragmento de las realizaciones es capaz de unirse no solo a la forma sérica de la TK1 humana sino también a la rTK1 humana y a la forma celular de la TK1 humana.

- Por lo tanto, los anticuerpos monoclonales y los fragmentos de las realizaciones tienen un uso muy versátil ya que
 40 son capaces de unirse a diferentes formas de TK1, es decir, preferentemente formas séricas y celulares de TK1 humana y rTK1 humana. Se cree que estas propiedades de unión de los anticuerpos y fragmentos monoclonales se deben a la identificación de los epítomos seleccionados, con los que los anticuerpos y fragmentos monoclonales tienen especificidad. Otros anticuerpos monoclonales anti-TK1 que se unen a la parte C-terminal de la TK1 humana pueden ser capaces de unirse a la rTK1 humana y/o a las formas celulares de la TK1 humana, pero no se unen bien a las
 45 formas séricas de la TK1 humana. Esta es una propiedad única de los presentes anticuerpos y fragmentos monoclonales.

El anticuerpo o fragmento monoclonal también es preferentemente capaz de unirse a un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos GQPAGPDNKENCVPVPGKPGGEAVAARKLFAPQ (SEQ ID NO: 1), es decir, XPA 210.

- 50 El anticuerpo monoclonal o fragmento de las realizaciones se puede obtener preferentemente mediante un proceso, tal como se obtiene mediante el proceso, que implica las siguientes etapas.

- Inmunizar un animal no humano con un primer conjugado peptídico que comprende un péptido que tiene la secuencia
 55 de aminoácidos GQPAGPDNKENCVPVPGKPGGEAVAARKLFAPQ (SEQ ID NO: 1) acoplado a una primera proteína portadora, preferentemente albúmina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés) o un segundo conjugado peptídico que comprende el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos GQPAGPDNKENCVPVPGKPGGEAVAARKLFAPQ (SEQ ID NO: 1) acoplado a una segunda proteína portadora que es diferente de la primera proteína portadora, preferentemente cianina de lapa con ojo de cerradura (KLH).

- 60 El animal no humano puede seleccionarse de varios animales utilizados tradicionalmente para la producción de anticuerpos, incluidos, pero no limitados a, ratones, ratas, gallinas, cabras, ovejas, cobayas, hámsters, conejos y caballos. En una realización particular, el animal no humano es un mamífero no humano.

- 65 Los esplenocitos se aíslan del animal no humano con títulos de sangre (título de anticuerpos) para el primer conjugado peptídico o el segundo conjugado peptídico.

En general, se inmunizan múltiples animales no humanos con el primer conjugado peptídico o el segundo conjugado. En tal caso, se identifican aquellos animales no humanos que muestran altos títulos en sangre para el primer conjugado peptídico o el segundo conjugado peptídico. Luego se aíslan esplenocitos de estos animales no humanos
5 identificados.

Un animal no humano que muestra el título de sangre implica que la sangre o el suero del animal no humano comprende anticuerpos que se unen al primer conjugado peptídico o al segundo conjugado peptídico y, más preferentemente, se unen al péptido GQPAGPDNKENCPVPGKPGEAVAARKLFAPQ (SEQ ID NO: 1) del primer y
10 segundo conjugado peptídico.

Los hibridomas se forman luego fusionando los esplenocitos aislados con mielomas según técnicas bien conocidas en la técnica.

15 El sobrenadante de los hidridomas, que resulta de la inmunización con el primer conjugado peptídico, se analiza en busca de títulos para el segundo conjugado peptídico (título de anticuerpos). En consecuencia, el sobrenadante de los hidridomas, que resulta de la inmunización con el segundo conjugado peptídico, se analiza en busca de títulos para el primer conjugado peptídico (título de anticuerpos).

20 Este examen se realiza para evitar los anticuerpos producidos contra las proteínas portadoras, como BSA o KLH, utilizadas en las respectivas inmunizaciones.

A continuación, se seleccionan uno o más hibridomas que producen anticuerpos monoclonales capaces de unirse al primer conjugado peptídico y al segundo conjugado peptídico. En una realización particular, se selecciona al menos
25 un hibridoma que produce anticuerpos monoclonales capaces de unirse al primer conjugado peptídico, al segundo conjugado peptídico y a la rTK1 humana.

A continuación, se aísla un anticuerpo monoclonal de las realizaciones del sobrenadante del hibridoma seleccionado.

30 En una realización, el anticuerpo o fragmento monoclonal tiene regiones determinantes de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés) que tienen secuencias de aminoácidos de un grupo que consiste en:

- DYEMH (SEQ ID NO: 6) o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % y preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6;
35
- AIHPGYGGTAYNQKFKG (SEQ ID NO: 7) o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % y preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7;
- FITKFDY (SEQ ID NO: 8) o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % y preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 8;
40
- KSSQSLLDSDGKTFLN (SEQ ID NO: 9) o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % y preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 9;
- LVSKLDS (SEQ ID NO: 10) o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % y preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 10; y
45
- WQGTHFPWT (SEQ ID NO: 11) o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % y preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 11.
50

En una realización particular de la invención, el anticuerpo o fragmento monoclonal tiene CDR que tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas de un grupo que consiste en la SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11.

55 En una realización particular, el anticuerpo o fragmento monoclonal tiene una CDR1 pesada variable (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % y preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6; una VH CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % y preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7; y una VH CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ
60 ID NO: 8 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % y preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 8. El anticuerpo o fragmento monoclonal tiene, por lo tanto, preferentemente o alternativamente una CDR1 de luz variable (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 9 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % y preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 9; una VL CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 10 o una secuencia de aminoácidos que
65 tiene al menos 90 % y preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 10; y una VL

CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 11 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % y preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 11.

En una realización particular, el anticuerpo o fragmento monoclonal tiene una VH CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6; una VH CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7; una VH CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8; una VL CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 9; una VL CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 10; y una VL CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 11.

10 Un anticuerpo monoclonal según esta realización particular se indica en el presente documento como XPA 210-Ar1.

En otra realización, el anticuerpo o fragmento monoclonal tiene CDR que tienen secuencias de aminoácidos de un grupo que consiste en:

- 15 • DYEMH (SEQ ID NO: 6) o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % y preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6;
- AILPGSGGTAYNQKFKG (SEQ ID NO: 12) o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % y preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 12;
- 20 • LITTFDY (SEQ ID NO: 13) o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % y preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 13;
- KSSQSLDSDGKTYLN (SEQ ID NO: 14) o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % y preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 14;
- 25 • LVSKLDS (SEQ ID NO: 10) o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % y preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 10; y
- 30 • WQGTHFPWT (SEQ ID NO: 11) o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % y preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 11.

En una realización particular, el anticuerpo o fragmento monoclonal tiene CDR que tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas de un grupo que consiste en la SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11.

En una realización particular, el anticuerpo o fragmento monoclonal tiene una VH CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % y preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6; una VH CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 12 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % y preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 12; y una VH CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 13 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % y preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 13. El anticuerpo o fragmento monoclonal tiene, por lo tanto, preferentemente o alternativamente una VL CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 14 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % y preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 14; una VL CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 10 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % y preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 10; y una VL CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 11 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % y preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 11.

En una realización particular, el anticuerpo o fragmento monoclonal tiene una VH CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6; una VH CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 12; una VH CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 13; una VL CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 14; una VL CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 10; y una VL CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 11.

Un anticuerpo monoclonal según esta realización particular se indica en el presente documento como XPA 210-Ar2.

En una realización adicional, el anticuerpo o fragmento monoclonal tiene CDR que tienen secuencias de aminoácidos de un grupo que consiste en:

- SGYSWH (SEQ ID NO: 15) o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % y preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 15;
- 65 • YIHYSGSTTYNPSLKG (SEQ ID NO: 16) o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % y

preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 16;

- WGTGHWYFDV (SEQ ID NO: 17) o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % y preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 17;
- RSSTGAVTTTNYAN (SEQ ID NO: 18) o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % y preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 18;
- GTNNRVP (SEQ ID NO: 19) o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % y preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 19; y
- ALWYSNHVW (SEQ ID NO: 20) o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % y preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 20.

15 En una realización particular, el anticuerpo o fragmento monoclonal tiene CDR que tienen secuencias de aminoácidos seleccionadas de un grupo que consiste en la SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20.

20 En una realización particular, el anticuerpo o fragmento monoclonal tiene una VH CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 15 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % y preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 15; una VH CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 16 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % y preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 16; y una VH CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 17 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % y preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 17. El anticuerpo o fragmento monoclonal tiene, por lo tanto, preferentemente o alternativamente una VL CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 18 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % y preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 18; una VL CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 19 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % y preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 19; y una VL CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % y preferentemente al menos 95 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 20.

35 En una realización particular, el anticuerpo o fragmento monoclonal tiene una VH CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 15; una VH CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 16; una VH CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 17; una VL CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 18; una VL CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 19; y una VL CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20.

40 Un anticuerpo monoclonal según esta realización particular se indica en el presente documento como XPA 210-Ar3.

45 El fragmento del anticuerpo monoclonal de las realizaciones puede ser cualquier fragmento de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a la forma sérica de la TK1 humana y puede seleccionarse de un grupo que consiste en un anticuerpo de cadena simple, un fragmento Fv, un fragmento scFv, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un fragmento Fab', un fragmento Fd, un anticuerpo de dominio único (sdAb), un fragmento scFv-Fc, un fragmento di-scFv y una región CDR.

El anticuerpo o fragmento monoclonal de las realizaciones es preferentemente un anticuerpo o fragmento monoclonal aislado, tal como el aislado del sobrenadante del hibridoma descrito anteriormente.

50 El anticuerpo monoclonal puede ser un anticuerpo monoclonal humanizado o un anticuerpo monoclonal quimérico capaz de unirse a la forma sérica de la TK1 humana.

55 La especificidad de un anticuerpo monoclonal se puede determinar en función de la afinidad y/o la avidéz. La afinidad, representada por la constante de equilibrio para la disociación de un antígeno con un anticuerpo monoclonal (K_d), mide la fuerza de unión entre un determinante antigénico y un sitio de unión al antígeno en el anticuerpo monoclonal. Cuanto menor sea el valor de K_d , mayor será la fuerza de unión entre un determinante antigénico y el anticuerpo monoclonal. Alternativamente, la afinidad también se puede expresar como la constante de afinidad (K_a), que es $1/K_d$. Como resultará evidente para el experto en la materia, la afinidad se puede determinar de una manera conocida per se, dependiendo del antígeno de interés específico.

60 La avidéz es la medida de la fuerza de unión entre un anticuerpo monoclonal y el antígeno pertinente. La avidéz está relacionada tanto con la afinidad entre un determinante antigénico y su sitio de unión al antígeno en el anticuerpo monoclonal como con el número de sitios de unión pertinentes presentes en el anticuerpo monoclonal.

65 Normalmente, los anticuerpos monoclonales se unirán a su antígeno con una constante de disociación (K_d) de 10^{-5} a

epítipo diferente seleccionado del grupo.

Por lo tanto, los dos anticuerpos monoclonales del kit son capaces de unirse a la forma sérica de la TK1 humana y preferentemente también a la forma celular de la TK1 humana. Sin embargo, los dos anticuerpos monoclonales del kit 5 tienen especificidad para diferentes epítipos seleccionados del grupo presentado anteriormente.

En una realización, el primer anticuerpo monoclonal tiene especificidad para el primer epítipo seleccionado de uno de GEAVAARKLF (SEQ ID NO: 2) de TK1 humana y el epítipo dependiente de la conformación de TK1 humana y el 10 segundo anticuerpo monoclonal tiene especificidad para el segundo epítipo seleccionado del otro de GEAVAARKLF (SEQ ID NO: 2) de TK1 humana y el epítipo dependiente de la conformación de TK1 humana.

En otra realización, el primer anticuerpo monoclonal tiene especificidad para el primer epítipo seleccionado de uno de GEAVAARKLF (SEQ ID NO: 2) de TK1 humana, y al menos uno de NCPVPGKPGGE (SEQ ID NO: 4), 15 PVPGKPGGEAV (SEQ ID NO: 5) y NCPVPGKPGGEAV (SEQ ID NO: 3) de TK1 humana y el segundo anticuerpo monoclonal tiene especificidad para el segundo epítipo seleccionado del otro de GEAVAARKLF (SEQ ID NO: 2) de TK1 humana, y al menos uno de NCPVPGKPGGE (SEQ ID NO: 4), PVPGKPGGEAV (SEQ ID NO: 5) y NCPVPGKPGGEAV (SEQ ID NO: 3) de TK1 humana.

En una realización adicional, el primer anticuerpo monoclonal tiene especificidad para el primer epítipo seleccionado 20 de al menos uno de NCPVPGKPGGE (SEQ ID NO: 4), PVPGKPGGEAV (SEQ ID NO: 5) y NCPVPGKPGGEAV (SEQ ID NO: 3) de TK1 humana y el epítipo dependiente de la conformación de TK1 humana y el segundo anticuerpo monoclonal tiene especificidad para el segundo epítipo seleccionado del otro de al menos uno de NCPVPGKPGGE (SEQ ID NO: 4), PVPGKPGGEAV (SEQ ID NO: 5) y NCPVPGKPGGEAV (SEQ ID NO: 3) de TK1 humana y el epítipo 25 dependiente de la conformación de TK1 humana.

En una primera realización particular, el primer anticuerpo monoclonal es XPA 210-Ar1 y el segundo anticuerpo monoclonal es XPA 210-Ar2. En una segunda realización particular, el primer anticuerpo monoclonal es XPA 210-Ar2 y el segundo anticuerpo monoclonal es XPA 210-Ar1. En una tercera realización particular, el primer anticuerpo monoclonal es XPA 210-Ar1 y el segundo anticuerpo monoclonal es XPA 210-Ar3. En una cuarta realización particular, 30 el primer anticuerpo monoclonal es XPA 210-Ar3 y el segundo anticuerpo monoclonal es XPA 210-Ar1. En una quinta realización particular, el primer anticuerpo monoclonal es XPA 210-Ar2 y el segundo anticuerpo monoclonal es XPA 210-Ar3. En una sexta realización particular, el primer anticuerpo monoclonal es XPA 210-Ar3 y el segundo anticuerpo monoclonal es XPA 210-Ar2.

35 En una realización particular, el kit es un kit de ensayo tipo sándwich. Esto significa que el kit utiliza anticuerpos monoclonales que se unen a diferentes epítipos de material de TK1 celular y/o sérica, de modo que tanto el primer como el segundo anticuerpo monoclonal pueden unirse simultáneamente a la misma molécula o complejo de TK1 celular y/o sérica.

40 En una realización particular, el kit es un kit de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y preferentemente un ELISA de tipo sándwich.

Se puede utilizar un ELISA tipo sándwich para detectar material de TK1 celular y/o sérica en una muestra corporal preparando una superficie del soporte sólido al que se une el primer anticuerpo monoclonal como el llamado anticuerpo 45 de captura. En una realización preferida, una cantidad conocida del primer anticuerpo monoclonal se une a la superficie del soporte sólido. Cualquier sitio de unión no específico en la superficie está opcionalmente pero preferentemente bloqueado. La muestra corporal se aplica luego a la superficie de modo que cualquier material de TK1 celular y/o sérica presente en la misma sea capturado por los primeros anticuerpos monoclonales inmovilizados. El material sin unir se elimina preferentemente mediante una o múltiples etapas de lavado. Luego se agrega el segundo 50 anticuerpo monoclonal y se deja que se una a cualquier material de TK1 celular y/o sérica capturado por el primer anticuerpo monoclonal.

La cantidad de segundo anticuerpo monoclonal unido se determina luego en procedimientos de detección directa o indirecta. Por ejemplo, una etiqueta o enzima puede unirse directamente al segundo anticuerpo monoclonal o 55 indirectamente a través de un enlace, como una biotina-estreptavidina o un enlace de biotina-avidina. De manera alternativa, es posible utilizar un anticuerpo secundario que está etiquetado o conectado a una enzima y se une específicamente al segundo anticuerpo monoclonal.

Por lo tanto, en una realización, el segundo anticuerpo monoclonal tiene una biotina unida de manera covalente. De 60 manera alternativa, el segundo anticuerpo monoclonal tiene una estreptavidina o avidina unidas covalentemente.

El kit también comprende preferentemente una estreptavidina etiquetada con peroxidasa de rábano picante (HRP) o una avidina etiquetada con HRP. De manera alternativa, el kit también comprende una biotina etiquetada con HRP. El kit también comprende un sustrato de HRP, como un sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), un sustrato 3,3'- 65 diaminobenzidina (DAB) o un sustrato 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfónico (ABTS). En tal caso, el nivel de material de TK1 celular y/o sérica en la muestra corporal puede determinarse mediante procedimientos

espectrofotométricos que detectan la conversión del sustrato cromogénico por HRP en un producto coloreado que es detectable.

5 En una realización, el kit también comprende una placa de microtitulación (MCP) como el soporte sólido al que se inmoviliza el primer anticuerpo monoclonal o se pretende que esté inmovilizado. La fig. 3 es una vista general esquemática del concepto de un ELISA de tipo sándwich utilizando el primer y el segundo anticuerpo monoclonal según una realización.

10 El kit no necesariamente tiene que ser un kit ELISA. En otra realización, el kit utiliza cromatografía de afinidad en la que el primer anticuerpo monoclonal está unido a la fase estacionaria, tal como a una matriz de gel o perlas en una columna. Por ejemplo, la matriz de gel o las perlas podrían estar hechas de agarosa, como SEPHAROSE®.

15 En tal caso, el material de TK1 celular y/o sérica presente en una muestra corporal será atrapado en la columna a través de la unión con los primeros anticuerpos monoclonales inmovilizados. Después del lavado, el material de TK1 celular y/o sérica unido puede ser eludido y detectado utilizando el segundo anticuerpo monoclonal. Por ejemplo, la cantidad de material de TK1 celular y/o sérica eludido se puede determinar mediante inmunotransferencia y con el segundo anticuerpo monoclonal para la detección de TK1 mediante procedimientos de detección directa o indirecta.

20 El soporte sólido podría ser alternativamente perlas magnéticas, como DYNABEADS®.

El kit de las presentes realizaciones se puede utilizar en el procedimiento descrito anteriormente para determinar el nivel de material de TK1 celular y/o sérica en una muestra corporal.

25 Un aspecto adicional de las realizaciones se refiere a un procedimiento para estimar la probabilidad de recurrencia de un tumor en un sujeto. El procedimiento comprende determinar un nivel de material de TK1 sérica en una muestra corporal del sujeto utilizando un procedimiento o un kit según las realizaciones. El nivel de material de TK1 sérica en la muestra corporal se compara luego con un nivel de material de TK1 sérica representativo de una población de sujetos sanos o con un nivel de material de TK1 sérica previamente determinado en el sujeto.

30 Un nivel determinado que es más alto que un nivel asociado con una población de personas sanas indica una mayor probabilidad de recurrencia de un tumor en el sujeto. De manera similar, un nivel determinado que es más alto que un nivel asociado con el sujeto después de la terapia previa indica una mayor probabilidad de recurrencia de un tumor en el sujeto. Para obtener más información sobre la estimación de la probabilidad de recurrencia del tumor en función de un nivel determinado de material de TK1, consúltese [24, 25].

35 Otro aspecto más de las realizaciones se refiere a un procedimiento para determinar la proliferación celular en un sujeto. El procedimiento comprende determinar un nivel de material de TK1 sérica en una muestra corporal del sujeto utilizando un procedimiento o un kit según las realizaciones. El procedimiento también comprende determinar la proliferación celular basada en el nivel de material de TK1 sérica en la muestra corporal.

40 En una realización particular, se determina un nivel de proliferación celular normal o tumoral y se compara con el nivel determinado de material de TK1 sérica para determinar si el sujeto tiene una proliferación celular normal o inicial o una proliferación celular elevada.

45 El presente procedimiento se puede utilizar como una herramienta para monitorear varias terapias aplicadas a los sujetos. Por ejemplo, el procedimiento se puede utilizar para controlar la terapia antiproliferación o antitumoral en el sujeto. En tal caso, el procedimiento puede utilizarse para verificar si una terapia antiproliferación o antitumoral seleccionada tiene el efecto deseado en la reducción de la proliferación celular en el sujeto. Si la terapia no tiene el efecto deseado, es decir, no se detecta una disminución significativa en la proliferación celular, entonces se puede
50 aplicar otra terapia antiproliferación o antitumoral al sujeto.

Un aspecto adicional de las realizaciones se refiere a un procedimiento para determinar una respuesta del proceso de proliferación en un sujeto que padece una enfermedad maligna. El procedimiento comprende determinar un nivel de material de TK1 sérica en una muestra corporal del sujeto utilizando un procedimiento o un kit según las realizaciones.
55 El procedimiento también comprende determinar la respuesta del proceso de proliferación basada en el nivel de material de TK1 sérica en la muestra corporal. Un ejemplo de dicha respuesta al proceso de proliferación podría ser una reacción inmune o una respuesta de reacción inmune. En una realización, también puede utilizarse en la determinación al menos otro biomarcador para la respuesta del proceso de proliferación.

60 Otro aspecto más de las realizaciones se refiere a un procedimiento para determinar un nivel de inflamación, infección o de proliferación celular tumoral en un sujeto. El procedimiento comprende determinar un nivel de material de TK1 sérica en una muestra corporal del sujeto utilizando un procedimiento o un kit según las realizaciones. El procedimiento también comprende determinar el nivel de inflamación, infección o proliferación celular tumoral basado en el nivel de material de TK1 sérica en la muestra corporal. En una realización, también puede utilizarse en la determinación al
65 menos otro biomarcador para la inflamación, infección o proliferación celular tumoral.

La proliferación de células tumorales, tales como el tumor de mama, el tumor de pulmón y el tumor de vejiga, puede determinarse y controlarse particularmente según el presente procedimiento.

En las realizaciones descritas anteriormente de procedimientos y kits que utilizan anticuerpos monoclonales según las realizaciones, el sujeto es preferentemente un sujeto humano y la muestra corporal se selecciona preferentemente del grupo descrito previamente de muestras corporales adecuadas.

Aspectos adicionales de las realizaciones se refieren a un péptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos GEAVAARKLF (SEQ ID NO: 2), NCPVPGKPGGE (SEQ ID NO: 4), PVPGKPGGEAV (SEQ ID NO: 5) o NCPVPGKPGGEAV (SEQ ID NO: 3). Dicho péptido aislado es altamente adecuado como un epítipo para la unión de anticuerpos. El péptido aislado se puede utilizar para preparar un anticuerpo o fragmento anti-TK1 monoclonal que es capaz de unirse a la forma sérica de la TK1 humana y, preferentemente, también a la TK1 recombinante humana y a la forma celular de la TK1 humana.

Otro aspecto adicional de las realizaciones se refiere a un procedimiento para producir un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a una forma sérica de la TK1 humana. El procedimiento comprende la inmunización de un animal no humano con un primer conjugado peptídico que comprende un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos GQPAGPDNKENCVPVGKPGGEAVAARKLAFAPQ (SEQ ID NO: 1) acoplado a una primera proteína portadora o un segundo conjugado peptídico que comprende el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos GQPAGPDNKENCVPVGKPGGEAVAARKLAFAPQ (SEQ ID NO: 1) acoplado a una segunda proteína portadora que es diferente de la primera proteína portadora. El procedimiento también comprende aislar esplenocitos del animal no humano con títulos en sangre para el primer conjugado peptídico o el segundo conjugado peptídico. El procedimiento comprende además la formación de hibridomas mediante la fusión de los esplenocitos con mielomas. El procedimiento comprende adicionalmente el sobrenadante de selección de hibridomas, que resulta de la inmunización con el primer conjugado peptídico, para títulos para el segundo conjugado peptídico y el sobrenadante de selección de hibridomas, resultante de la inmunización con el segundo conjugado peptídico, para títulos para el primer conjugado peptídico. El procedimiento comprende además seleccionar un hibridoma que produzca un anticuerpo monoclonal capaz de unirse al primer conjugado peptídico, al segundo conjugado peptídico y a la rTK1 humana. El procedimiento comprende adicionalmente aislar el anticuerpo monoclonal del sobrenadante del hibridoma seleccionado.

En una realización, seleccionar el hibridoma comprende seleccionar un hibridoma que produzca un anticuerpo monoclonal capaz de unirse al primer conjugado peptídico, al segundo conjugado peptídico, a la rTK1 humana y a una TK1 presente en una muestra de suero obtenida de un sujeto humano que padece cáncer.

En una realización, el procedimiento comprende seleccionar un anticuerpo monoclonal aislado capaz de unirse a una TK1 presente en una muestra de suero obtenida de un sujeto humano que padece cáncer.

Por lo tanto, en una realización preferida, el procedimiento implica una selección para obtener anticuerpos monoclonales que son capaces de unirse a la forma sérica de la TK1. Esta selección se puede hacer seleccionando hibridomas o seleccionando entre anticuerpos monoclonales aislados.

EJEMPLOS

Los presentes ejemplos indican el diseño y el aislamiento de varias etapas de tres anticuerpos monoclonales anti-TK1 únicos. Los anticuerpos monoclonales anti-TK1 son capaces de reconocer la TK recombinante, la TK1 celular y la TK1 sérica. Además, se describe el procedimiento de inmunización, selección y evaluación final para obtener los anticuerpos monoclonales anti-TK1 únicos, incluidas sus regiones de unión al epítipo en la secuencia de aminoácidos de la TK1. También se describe el diseño y el rendimiento de un ELISA tipo sándwich basado en dos de estos anticuerpos monoclonales anti-TK1 con muestras de donantes de sangre sanos y de pacientes con diferentes tipos de enfermedades cancerosas.

Ejemplo 1: Preparación de anticuerpos monoclonales de ratón contra la región C-terminal de TK1 humana

La inmunización y selección de anticuerpos monoclonales de ratón contra la región C-terminal de TK1 humana con la siguiente secuencia GQPAGPDNKENCVPVGKPGGEAVAARKLAFAPQ (SEQ ID NO: 1), originada a partir de la secuencia de la proteína TK1 humana [19], se realizó en dos ocasiones.

XPA 210	GQPAGPD---NKENC--PVPGKPGGEAVAA---RKLAFAPQ
HUMANO	KKASGGQPAGPD---NKENC--PVPGKPGGEAVAA---RKLAFAPQQILQCS
RATÓN	KKSSAQTAGSD---NK-NC--LVLGQPGEALVV---RKLAFASQQVQLQYN
RATA	KKSSAQTA--D---NKENY--SVLGQPIEIPAV---RKLAFAPQQILQCN
POLLO	QKRPQQ-LGS---ENKENV--PMGVKQLDMPAS---RKIFAS
PERRO	KASGPPMGLDSRENKENVLVLVPGKPGEGKEATGVRKLAFAPQHVLQCS

Las secuencias presentadas anteriormente muestran una comparación de la región C-terminal de TK1 humana (SEQ ID NO: 21) y la secuencia utilizada para la inmunización con las secuencias TK1 correspondientes en ratón (SEQ ID NO: 22), rata (SEQ ID NO: 23), pollo (SEQ ID NO: 24) y perro (SEQ ID NO: 25).

5 En el primer enfoque, se inmunizaron ratones Balb/c hembra con el péptido acoplado a la albúmina sérica bovina (BSA) mediante enlace reticular con glutaraldehído (2,3 %) mediante procedimientos estándar, utilizando una cantidad igual de péptido y proteína portadora. Los ratones se inmunizaron inicialmente con 200 µg de conjugado (en adyuvantes completos de Freund's) y después de tres inmunizaciones de refuerzo (100 µg en cada adyuvante
10 incompleto de Freund's), se aislaron esplenocitos de ratones con títulos elevados de sangre para el antígeno y se fusionaron con la línea celular de mieloma de ratón SP 2/0. Los hibridomas resultantes se sometieron a múltiples conjuntos de subclonación y los sobrenadantes de los pocillos con células se seleccionaron utilizando un sistema de detección de fosfato alcalino ELISA (Vector Laboratories, CA, EE. UU.) con placas de 96 pocillos recubiertas con el antígeno peptídico (0,05 µg / pocillo, SEQ ID NO: 1). Los sobrenadantes con títulos más altos de pocillos positivos se
15 subclonaron adicionalmente en un total de tres a cinco veces y se ensayaron los sobrenadantes. Finalmente, se identificaron siete clones de hibridoma monoclonal candidatos con títulos altos para el péptido 31-mer y la TK1 recombinante humana. Se establecieron reservas celulares, se expandieron los cultivos y se preparó un gran lote de sobrenadantes, que se liofilizaron y se analizaron en el ensayo dot blot y el ensayo ELISA. Este procedimiento condujo al aislamiento del anticuerpo monoclonal indicado en el presente documento como XPA 210-Ar1.

20 En el segundo enfoque para obtener anticuerpos monoclonales para el péptido C-terminal se utilizaron tres antígenos diferentes: i) péptido XPA 210 (SEQ ID NO: 1) acoplado a BSA como se describió anteriormente, ii) péptido XPA 210 acoplado a cianina de lapa de ojo de cerradura (KLH) con un procedimiento de reticulación similar y iii) rTK1 humana. La producción y las propiedades estructurales de rTK1 se describen en [20]. Los ratones se inmunizaron inicialmente
25 con 100 µg de conjugados peptídicos o rTK1 en adyuvantes completos de Freund's y después de tres inmunizaciones de refuerzo (100 µg en cada adyuvante incompleto de Freund's), se aislaron esplenocitos de ratones con títulos elevados de sangre para el antígeno y se fusionaron con la línea celular de mieloma de ratón SP 2/0. Los sobrenadantes de hibridoma resultantes se seleccionaron mediante el sistema esencialmente como se describe anteriormente con 1 µg / pocillo de antígeno peptídico. Los sobrenadantes de hibridoma resultantes de la inmunización
30 con el conjugado peptídico BSA se evaluaron con el conjugado peptídico KHL en los pocillos y viceversa para las inmunizaciones peptídicas de KHL. Esta selección se diseñó para evitar los anticuerpos producidos contra la proteína portadora utilizada en las inmunizaciones respectivas. Los sobrenadantes con títulos más elevados de pocillos positivos se subclonaron cinco veces. Solo se seleccionaron hibridomas, que fueron positivos tanto para los conjugados peptídicos como para la rTK1 humana. En el caso de inmunizaciones de TK1 recombinante solamente,
35 se utilizó la proteína TK1 en la selección. En cada caso, se identificaron diez clones de hibridoma monoclonal candidatos con títulos altos para los conjugados peptídicos y la rTK1. Se establecieron reservas celulares, se expandieron los cultivos y se preparó un gran lote de sobrenadantes, que se liofilizaron y se analizaron en varios ensayos como se describió anteriormente.

40 Con el fin de identificar un par de anticuerpos monoclonales que serían adecuados para un procedimiento ELISA tipo sándwich, se utilizaron varios procedimientos de detección secundarios como se describe en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 2: Detección inmune de quimioluminiscencia mejorada (ECL) por dot blot

45 Este procedimiento se realizó esencialmente como se describe en [21]. En resumen, se aplicaron directamente de 3 a 5 µl de péptidos (3-300 pg por mancha), rTK1 humana (0,02-0,2 ng por punto) o muestras de suero sobre una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon en solución salina tamponada con Tris (TBS) con leche desnatada al 10 % durante 4 horas y se incubaron a temperatura ambiente (TA, 23 - 25 °C) durante la noche después de la adición de los sobrenadantes u otros anticuerpos anti-TK1 primarios. Después de la incubación con un anticuerpo
50 IgG anti-ratón secundario biotinilado durante 1 hora a temperatura ambiente, la membrana se incubó en tampón de TBS con avidina-HRP-estreptavidina, seguido de la adición de sustrato ECL (GE Healthcare). La intensidad de la quimioluminiscencia de un solo punto en la membrana se detectó en películas (GE Healthcare) expuestas durante 2 a 4 minutos. También se aplicaron varias muestras de suero a las membranas de controles sanos y pacientes con diferentes enfermedades tumorales.

55 Solo los hibridomas que reaccionaron claramente con el antígeno peptídico, rTK1, sueros de pacientes con tumores con niveles de TK1 sérica altos conocidos y mínimamente con sueros de personas sanas, fueron candidatos de alto rango para un mayor desarrollo de ELISA. Un ejemplo de estos resultados se muestra en la fig. 1 para los anticuerpos XPA 210-Ar2 y XPA 210-Ar3.

Ejemplo 3: Ensayos de perlas magnéticas de inmunoafinidad

65 Los ensayos se realizaron en dos etapas. Primero, los anticuerpos anti-XPA 210 seleccionados en función de los resultados del ensayo de dot blot (Ejemplo 2) se hicieron reaccionar con rTK1 humana o una muestra de suero de un paciente que padecía neoplasias malignas hematológicas con altos niveles de TK1 sérica. En la segunda etapa, se agregaron anticuerpos IgG anti-ratón que contenían perlas magnéticas que se unen a los complejos antígeno-

anticuerpo, que posteriormente se podrían eliminar de la solución de reacción cuando la mezcla se sometió a un campo magnético. La proteína TK1 no unida se detectó mediante una determinación de actividad enzimática.

La rTK1 humana a diferentes concentraciones (10 ng, 5 ng) y 30 µl de suero de un paciente con cáncer hematológico se diluyeron con 270 µl de TBS Tween-20 (TBST) + 2 % de BSA y se combinaron con 4 µg de anticuerpos monoclonales anti-TK1 purificados (disueltos en solución salina tamponada con fosfato (PBS) + BSA al 0,1 % + 2 mM de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), pH 7,4) o 50 µl de los sobrenadantes respectivos de los hibridomas seleccionados. Luego, estas muestras se agitaron suavemente durante 2 horas a 4 °C, seguido de la adición de 70 µl de perlas magnéticas (Dyna) anti-ratón de oveja prelavadas en tampón de lavado (PBS + BSA al 0,1 % + 2 mM de EDTA, pH 7,4) y una incubación adicional durante 1 hora. Los tubos de muestra se colocaron luego en el imán durante 2 minutos y se retiraron 20 µl del material no unido y se midió la actividad de TK1. La actividad de TK1 se determinó con un ensayo ³H-Thd modificado como se describe en [22]. La actividad en la fracción no unida se comparó con la de las muestras de control tratadas con perlas, que no reaccionaron con ningún sobrenadante de hibridoma. Los resultados con sobrenadantes de nueve hibridomas seleccionados se muestran en la Tabla 1.

La mayoría de los anticuerpos seleccionados reaccionaron con rTK1 humana, y se unieron como se esperaba a una parte importante de la actividad de TK1, pero en el caso de la interacción con TK1 sérica en la muestra de pacientes hubo un gran rango de actividades de TK1 que permaneció sin unión (del 97 al 31 %). Sobre la base de los últimos resultados, se seleccionaron cinco hibridomas candidatos, se expandieron y se aislaron y purificaron mayores cantidades de IgG. Estos anticuerpos candidatos se probaron luego en los ensayos descritos en el siguiente ejemplo.

Tabla 1: Actividad de TK1 no unida a perlas de anticuerpos

	rTK1 humana (10 ng)	rTK1 humana (5 ng)	Suero de cancer
XPA 210-Ar1	66 %	52 %	31 %
XPA 210-Ar64	26 %	23 %	32 %
Sup-553	35 %	25 %	70 %
Sup-168	82 %	64 %	86 %
Sup-555	35 %	27 %	67 %
Sup-139	47 %	30 %	97 %
Sup-162	39 %	23 %	54 %
Sup-583	31 %	21 %	58 %
Sup-165	53 %	45 %	42 %

Ejemplo 4: Análisis de mapeo de epítopos con candidatos de anticuerpos monoclonales anti-TK1

Con el fin de determinar la región de aminoácidos a la que los anticuerpos monoclonales seleccionados se unen se realizó un análisis de Pepscan con péptidos diana de 10 aminoácidos biotinilados. El procedimiento se basa en la síntesis de un conjunto de 14 péptidos de aminoácidos ten-mer que representan la región de 193 a 226 de la secuencia TK1 como se muestra en relación con el Ejemplo 1. Cada péptido tiene una superposición de ocho aminoácidos y dos brechas de aminoácidos, lo que lleva a un conjunto de 14 péptidos diferentes, véase la Tabla 2. También se incluye el péptido completo de longitud total y todos estos péptidos se inmovilizaron en una placa de microtitulación recubierta con estreptavidina. Después de una etapa de 1 hora en adsorción, las placas se lavaron con PBS, BSA al 1 % y Tween 20 al 0,1 %. Luego se agregaron los diferentes anticuerpos a aproximadamente 5 µg / ml y las placas se incubaron durante 1 hora, seguido de lavado tres veces. Luego se añadió un conjugado HRP y se incubó durante 1 hora. Las placas se lavaron entonces seis veces con el mismo tampón. Finalmente, la absorbancia se determinó con 100 µl de sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) y los resultados de una prueba con una serie de anticuerpos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: valores de absorbancia a 415 nm por pocillo con contenido de anticuerpos

Péptido	XPA 210-Ar1	Sup-553	Sup-165	Sup-2119
ASGQPAGPDN (SEQ ID NO: 26)	0,113	0,067	0,057	0,063
GQPAGPDNKE (SEQ ID NO: 27)	0,108	0,061	0,057	0,057
PAGPDNKENC (SEQ ID NO: 28)	0,120	0,060	0,055	0,057
GPDNKENCVP (SEQ ID NO: 29)	0,112	0,064	0,060	0,057
DNKENCVP (SEQ ID NO: 30)	0,108	0,059	0,059	0,058

ES 2 737 626 T3

Péptido	XPA 210-Ar1	Sup-553	Sup-165	Sup-2119
KENCPVPGKP (SEQ ID NO: 31)	0,109	0,060	0,058	0,057
NCPVPGKPGE (SEQ ID NO: 4)	0,114	0,062	1,988	0,058
PVPGKPGEAV (SEQ ID NO: 5)	0,115	0,063	1,838	0,057
PGKPGEAVAA (SEQ ID NO: 32)	0,112	0,071	0,059	0,058
KPGEAVAARK (SEQ ID NO: 33)	0,116	0,067	0,059	0,058
GEAVAARKLF (SEQ ID NO: 2)	3,507	0,065	0,057	0,058
AVAARKLFAP (SEQ ID NO: 34)	0,125	0,073	0,062	0,60
AARKLFAPQQ (SEQ ID NO: 35)	0,137	0,066	0,060	0,065
ARKLFAPQQI (SEQ ID NO: 36)	0,130	0,063	0,062	0,065
XPA 210 (SEQ ID NO: 1)	3,842	3,780	0,136	0,070
	Sup-2115	Sup-168	Sup-1119	Sup-584
ASGQPAGPDN (SEQ ID NO: 26)	0,058	0,063	0,063	0,066
GQPAGPDNKE (SEQ ID NO: 27)	0,058	0,057	0,061	0,060
PAGPDNKENC (SEQ ID NO: 28)	0,058	0,058	0,062	0,059
GPDNKENCPV (SEQ ID NO: 29)	0,059	0,061	0,062	0,060
DNKENCPVPG (SEQ ID NO: 30)	0,060	0,062	0,061	0,059
KENCPVPGKP (SEQ ID NO: 31)	0,061	0,061	0,063	0,058
NCPVPGKPGE (SEQ ID NO: 4)	0,062	1,235	0,061	0,059
PVPGKPGEAV (SEQ ID NO: 5)	0,062	1,093	0,065	0,060
PGKPGEAVAA (SEQ ID NO: 32)	0,062	0,065	0,064	0,062
KPGEAVAARK (SEQ ID NO: 33)	0,064	0,063	0,066	0,061
GEAVAARKLF (SEQ ID NO: 2)	0,062	0,067	0,064	0,470
AVAARKLFAP (SEQ ID NO: 34)	0,064	0,067	0,067	0,066
AARKLFAPQQ (SEQ ID NO: 35)	0,059	0,066	0,065	0,065
ARKLFAPQQI (SEQ ID NO: 36)	0,062	0,064	0,066	0,097
XPA 210 (SEQ ID NO: 1)	0,075	0,129	2,978	3,756
	Sup-583	Sup-162		
ASGQPAGPDN (SEQ ID NO: 26)	0,060	0,067		
GQPAGPDNKE (SEQ ID NO: 27)	0,061	0,064		
PAGPDNKENC (SEQ ID NO: 28)	0,062	0,063		
GPDNKENCPV (SEQ ID NO: 29)	0,062	0,063		
DNKENCPVPG (SEQ ID NO: 30)	0,062	0,063		
KENCPVPGKP (SEQ ID NO: 31)	0,060	0,063		
NCPVPGKPGE (SEQ ID NO: 4)	0,060	0,064		
PVPGKPGEAV (SEQ ID NO: 5)	0,060	0,067		
PGKPGEAVAA (SEQ ID NO: 32)	0,061	0,067		
KPGEAVAARK (SEQ ID NO: 33)	0,062	0,072		
GEAVAARKLF (SEQ ID NO: 2)	0,276	0,072		
AVAARKLFAP (SEQ ID NO: 34)	0,065	0,077		
AARKLFAPQQ (SEQ ID NO: 35)	0,063	0,066		

Péptido	XPA 210-Ar1	Sup-553	Sup-165	Sup-2119
ARKLFAPQQI (SEQ ID NO: 36)	0,063	0,063		
XPA 210 (SEQ ID NO: 1)	3,606	3,788		

Los resultados en la Tabla 2 permiten la identificación de la secuencia de aminoácidos mínima requerida para la unión de los diversos anticuerpos. Parece claro que hay tres tipos principales de hibridomas productores de anticuerpos seleccionados por el procedimiento anterior cuando se usó el péptido 31-mer (XPA 210) como antígeno.

5

Un tipo, ejemplificado por XPA 210-Ar1, Sup-584 y Sup-583, se une a la región: GEAVAARKLF (SEQ ID NO: 2) y estos aminoácidos se incluirían, por lo tanto, en el dominio antigénico.

Otro dominio, ejemplificado por Sup-165 (XPA 210-Ar3) y Sup-168, se une al péptido 7 (NCPVPGKPGGE (SEQ ID NO: 4)) y el péptido 8 (PVPGKPGGEAV (SEQ ID NO: 5)) que comprende los aminoácidos NCPVPGKPGGEAV (SEQ ID NO: 3) como el dominio antigénico más probable. Aparentemente, estos anticuerpos prefieren los péptidos de 10 aminoácidos ya que la reactividad con el 31-mer XPA 210 es menor que para el primer tipo.

Finalmente, hay un grupo, ejemplificado por Sup-553, Sup-1119 y Sup-162 (XPA 210-Ar2), que no mostró ninguna unión distinta a ninguno de los catorce péptidos 10-mer. Este resultado sugiere seriamente que su unión es dependiente de la conformación, que consiste en varias regiones que no son adyacentes en la secuencia primaria pero están formadas por una cierta conformación 3D del dominio de antígeno.

Además, los anticuerpos en este grupo, así como los otros dos grupos, reaccionaron con el péptido 31-mer de longitud completa (XPA 210), así como con la rTK1 humana.

Por lo tanto, los datos indican claramente que el anticuerpo monoclonal XPA 210-Ar1 reconoce un dominio en la parte C-terminal del 31-mer (XPA 210). Las predicciones de secuencias secundarias sugieren que esta región forma una hélice alfa. Desafortunadamente, no hay datos estructurales directos para esta región del tetrámero TK1, sino que un modelo basado en homologías de secuencia y estructura entre la estructura de TK1 de la bacteria *Ureoplasma ureolyticum/pavrum* [20] y la de la rTK1 humana sugiere una estructura C-terminal como se muestra en la fig. 2. Lo más probable es que la región general XPA 210 sea una región de giro (etiquetada con B en la fig. 2) con una hélice alfa en el C-terminal (etiquetada con C en la fig. 2). Una posible interpretación de los resultados del mapeo de epítomos es que el epítomo similar a XPA 210-Ar1 está relacionado con la hélice alfa C-terminal, el epítomo XPA 210-Ar3 con el dominio de flexión, muy cerca de la secuencia KEN que sirve como la secuencia de señal de ubiquitinación para la degradación del ciclo celular de TK1 [15]. Finalmente, el epítomo XPA 210-Ar2 depende de la conformación y puede estar formado por diferentes regiones de la estructura 3D completa de la región 31-mer. Por lo tanto, es probable que los anticuerpos monoclonales con diferentes propiedades de unión puedan formar pares de ensayos inmunes tipo sándwich adecuados.

35

Ejemplo 5: Ensayo ELISA tipo sándwich

El esquema de un ensayo ELISA tipo sándwich se muestra en la fig. 3 con un primer anticuerpo monoclonal anti-TK1 unido a los pocillos de una placa de microtitulación (MTP), que actúa como un «receptor» que interactúa con la muestra. Un segundo anticuerpo monoclonal anti-TK1 se agrega en una segunda etapa y se une a la TK1 presente en la muestra y se une al primer anticuerpo monoclonal anti-TK1 inmovilizado en el pocillo. El segundo anticuerpo monoclonal anti-TK1 se modifica por biotilación, lo que significa que puede interactuar muy eficientemente con un complejo informante, en términos de estreptavidina etiquetada con HRP, produciendo una reacción de color, que se puede medir fácilmente. A continuación, se presenta un resumen del procedimiento estándar en el ensayo ELISA tipo sándwich:

45

1. Pipetear volúmenes iguales (70 µl) de muestra y tampón de dilución de muestra en un vial y vórtice;

2. Incubar durante 30 minutos a 23-25 °C;

50

3. Añadir 100 µl / pocillo de la mezcla de la muestra y el tampón de dilución de la muestra;

4. Incubar durante 2 horas con agitación a 650 rpm a 25 °C;

55 5. Lavar cuatro veces con 350 µl de PBS Tween-20 (PBST);

6. Añadir 100 µl / pocillo de anticuerpo anti-TK1 etiquetado con biotina en el tampón reactivo;

7. Incubar durante 1 hora con agitación a 650 rpm a 25 °C;

60

8. Lavar cuatro veces con 350 µl de PBST;

9. Añadir 100 µl / pocillo de estreptavidina poli-HRP;

10. Incubar durante 30 horas con agitación a 650 rpm a 25 °C;

5

11. Lavar cuatro veces con 350 µl de PBST;

12. Añadir 100 µl / pocillo de sustrato de TMB;

10 13. Incubar durante 15 minutos;

14. Añadir 100 µl / pocillo de solución de parada; y

15. Leer la absorbancia a 450 nm.

15

En una configuración de prueba inicial, el anticuerpo monoclonal XPA 210-Ar1 se seleccionó como «receptor» con un anticuerpo policlonal anti-XPA 210 producido en pollos como detector [13, 23]. Esta configuración se utilizó para verificar que el ELISA tipo sándwich podría diseñarse como se muestra en la fig. 3. Posteriormente, el anticuerpo policlonal anti-XPA 210 se reemplazó por un segundo anticuerpo monoclonal anti-TK1 seleccionado como se describe en el presente documento.

20

En un primer ensayo para seleccionar un segundo anticuerpo monoclonal, los nuevos anticuerpos candidatos purificados del Ejemplo 4 se adsorbieron en los pocillos de MTP como receptor y se utilizó el detector XPA 210-Ar1 como detector. Los resultados mostraron que solo hubo dos sobrenadantes de los anticuerpos candidatos que dieron resultados positivos con el suero de pacientes con cáncer: Sup-162 (XPA 210-Ar2) y Sup-165 (XPA 210-Ar3), mientras que los cinco anticuerpos candidatos reaccionaron con el conjugado péptido 31-mer (XPA 210), así como con la rTK1 humana. La mayor reactividad se observó con XPA 210-Ar2 y se produjo una gran preparación de este anticuerpo, se biotiniló y se usó como anticuerpo detector. Se utilizó XPA 210-Ar1 como el anticuerpo receptor en el ELISA de XPA 210 (Fig. 3). Los resultados finales con este ensayo y varias muestras clínicas se muestran en el Ejemplo 6.

25

30

Ejemplo 6: Sensibilidad y especificidad del ensayo ELISA tipo sándwich.

En el presente documento se presentan los resultados obtenidos con un prototipo ELISA realizado como se describe en el Ejemplo 5 con los anticuerpos monoclonales XPA 210-Ar1 y XPA-Ar2. Las muestras analizadas fueron 28 sueros de pacientes con cáncer de próstata con diferentes fases de la enfermedad (adquiridos de Biothème Inc). Como procedimiento de referencia, se utilizó el ensayo de actividad TK LIAISON® y los resultados se presentan en la fig. 4. En la fig. 5 se muestran los resultados con el ensayo ELISA y en este caso se presentan los valores de absorbancia directa.

35

El valor de corte para los dos ensayos se estimó midiendo la actividad de TK1 y los niveles de proteína en sueros de 10 donantes de sangre sanos con el ensayo TK LIAISON® y el ensayo ELISA. La sensibilidad del ensayo TK LIAISON® a una especificidad del 90 % se calculó como 0,29. Esto significa que con un corte que permite un falso en diez (según los valores de los donantes de sangre), el ensayo TK LIAISON® puede identificar el 29 % de los verdaderos positivos (según los valores de los sueros de pacientes con cáncer). En el caso del ensayo ELISA, la sensibilidad fue de 0,75. Por lo tanto, hay una capacidad significativamente mayor del ensayo ELISA para identificar pacientes que padecen de tumor sólido en comparación con un ensayo de actividad TK1 que mide la actividad de la enzima.

40

45

Hubo una correlación significativa ($r = 0,85$) entre los valores obtenidos con los dos ensayos cuando se probaron en paralelo un grupo combinado de 28 sueros de pacientes con cáncer de próstata y 28 sueros de pacientes con cáncer de mama. La existencia de una alta proporción de TK1 sérica inactiva en la sangre de pacientes con tumores sólidos [17, 18] es probablemente una explicación de los resultados descritos anteriormente.

50

Ejemplo 7: Secuenciación de regiones CDR de anticuerpos monoclonales anti-TK1

55

El ARN total se extrajo de células de hibridoma congeladas y el ADNc se sintetizó a partir del ARN. Luego se realizó una RT-PCR para amplificar las regiones variables (cadenas pesadas y ligeras) de los anticuerpos, que luego se clonaron en un vector de clonación estándar por separado y se secuenciaron.

60

65

El ARN total se aisló de las células de hibridoma siguiendo el manual técnico del Sistema de purificación de ARN TRIzol® Plus (Invitrogen, Cat. N.º: 15596-026). El ARN total se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa. Con más detalle, el ARN total aislado de las muestras se ejecutó junto con un marcador de ADN Marker III (TIANGEN, Cat. N.º: MD103) en un gel de agarosa / GelRed™ al 1,5 %. La fig. 6A ilustra el gel de agarosa por electroforesis del marcador de ADN Marker III, mientras que las figs. 6B-6D ilustran los geles de electroforesis de agarosa correspondientes con el marcador de ADN Marker III (carril M) y el ARN total de XPA 210-Ar1 (Fig. 6B), XPA 210-Ar2 (Fig. 6C) y XPA 210-Ar3 (Fig. 6D) produciendo células de hibridoma.

El ARN total se transcribió de manera inversa en ADNc utilizando cebadores antisentido específicos de isotipo o cebadores universales siguiendo el manual técnico del sistema de síntesis de primera cadena SuperScript™ III (Invitrogen, Cat. N.º: 18080-051). Los fragmentos de anticuerpos de VH y VL se amplificaron según el procedimiento operativo estándar de RACE de GenScript.

Con más detalle, se ejecutaron 4 µl de los productos de PCR de cada muestra junto con el marcador de ADN Marker III en un gel de agarosa / GelRed™ al 1,5 % como se muestra en las figs. 7A-7C. Los productos de PCR se purificaron y almacenaron a -20 °C hasta su uso posterior. El carril M en las figs. 7A-7C indica el marcador de ADN Marker III, mientras que los carriles 1 y 2 corresponden a los fragmentos VH y VL, respectivamente, de XPA 210-Ar1 (Fig. 7A), XPA 210-Ar2 (Fig. 7B) y XPA 210-Ar3 (Fig. 7C).

Los fragmentos de anticuerpos amplificados se clonaron por separado en un vector de clonación estándar utilizando procedimientos de clonación molecular estándar.

Se realizó una selección de PCR de colonias para identificar clones con insertos de tamaños correctos. Se secuenciaron no menos de cinco colonias individuales con insertos de tamaños correctos para cada fragmento de anticuerpo. Con más detalle, se enviaron cinco colonias individuales con tamaños de insertos VH y VL correctos para la secuenciación. Los genes VH y VL de cinco clones diferentes se encontraron casi idénticos. Se cree que las secuencias de consenso, que se enumeran a continuación, son la secuencia del anticuerpo producido por las respectivas células de hibridoma.

XPA 210-Ar1

25 Cadena pesada: Secuencia de ADN (405 pb) - SEQ ID NO: 37 Secuencia líder-FR1-**CDR1**-FR2-**CDR2**-FR3-**CDR3**-FR4

ATGGAATGGAGCTGGGTCTTTCTCTTCCTCCTGTCAGTAACTGCAGGTGTCCAATCCCAGGT
TCAACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAATGAAGCTGTCCTGCA
AGGCTTTGGGCTACACATTA**ACTGACTATGAAATGCAC**TGGGTGAAACAGACACCTGCGCAT
GGCCTGGAATGGATTGGAG**CTATTCATCCAGGATATGGTGGTACTGCCTATAATCAGAAGTT**
CAAGGGCAAGGCCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCA
GCCTGACATCTGAGGACTCTGCTGTCTATTACTGTACA**ACTTTTATTACTAAATTTGACTAC**
TGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

30 Cadena pesada: Secuencia de aminoácidos (135 aa) - SEQ ID NO: 38 Secuencia líder-FR1-**CDR1**-FR2-**CDR2**-FR3-**CDR3**-FR4

MEWSWVFLFLLSVTAGVQSQVQLQQSGAELVRPGASMKLSCKALGYTLTDYEMHWVKQTPAH
GLEWIGAIHPGYGGTAY**NQKFKG**KATLTADKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCTT**FI**TKFDY
WGQGTTLTVSS

35 Cadena ligera: Secuencia de ADN (396 pb) - SEQ ID NO: 39 Secuencia líder-FR1-**CDR1**-FR2-**CDR2**-FR3-**CDR3**-FR4

ES 2 737 626 T3

ATGATGAGTCCTGCCAGTTCCTGTTTCTCTTAGTGCTCTGGATTCGGGAAACCAACGGTGA
TGTTGTCCTGACCCAGACTCCACTCACTTTGTTCGGTAACCATTGGACAACCAGCCTCCATCT
CTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAGACTTTTTTGAATTGGTTGTTA
CAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGTCTAATCTATCTGGTGTCTAAACTGGACTCTGGAGT
CCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTGAGAATCAGCAGAGTGG
AGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTATTGCTGGCAAGGTACACATTTTCCGTGGACGTTCCGGT
GGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

Cadena ligera: Secuencia de aminoácidos (132 aa) - SEQ ID NO: 40 Secuencia líder-FR1-**CDR1**-FR2-**CDR2**-FR3-**CDR3**-FR4

5

MMSPAQFLFLLVWLWIRETNGDVVLTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTFLNWLL
QRPQGSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGVYYCWQGTHTFPWTFG
GGTKLEIK

XPA 210-Ar2

10 Cadena pesada: Secuencia de ADN (405 pb) - SEQ ID NO: 41 Secuencia líder-FR1-**CDR1**-FR2-**CDR2**-FR3-**CDR3**-FR4

ATGGAATGGAGCTGGGTCTTTCTCTTCCTCCTGTCAGTAACTGCAGGTGTCCAATCCCAGGT
TCAACTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGAACTGTCTTGCA
AGGCTTTGGGCTACACATTTACTGACTATGAAATGCACCTGGGTGAGGCAGACACCTGTGCAT
GGCCTGGAATGGATTGGAGCTATTCTTCCAGGAAGTGGTGGTACTGCCTACAATCAGAAGTT
CAAGGGCAAGGCCCACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCA
GCCTGACATCTGAGGACTCTGCTGTCTATTACTGTACTACTTTGATTACGACCTTTGACTAC
TGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

15 Cadena pesada: Secuencia de aminoácidos (135 aa) - SEQ ID NO: 42 Secuencia líder-FR1-**CDR1**-FR2-**CDR2**-FR3-**CDR3**-FR4

MEWSWVFLFLLSVTAGVQSQVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKALGYTFTDYEMHWVRQTPVH
GLEWIGAILPGSGGTAYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCTTLITTFDY
WGQGTTLTVSS

20 Cadena ligera: Secuencia de ADN (396 pb) - SEQ ID NO: 43 Secuencia líder-FR1-**CDR1**-FR2-**CDR2**-FR3-**CDR3**-FR4

ES 2 737 626 T3

ATGATGAGTCCTGCCAGTTCCTGTTTCTGTTAGTGCTCTGGATTCGGGAAACCAACGGTGA
TGTTGTGTTGACCCAGACTCCACTCACATTGTGGTTACCATTGGACAACCAGCCTCCATTT
CTTGTAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAGACATATTTGAATTGGTTGTTA
CAGAGGCCAGGCCAGTCTCAAAGCGCCTAATCTATCTGGTGTCTAAATTGGACTCTGGAGT
CCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTGAAAATCAGCAGAGTGG
AGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTATTGCTGGCAAGGTACACATTTTCCGTGGACGTTCCGGT
GGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

Cadena ligera: Secuencia de aminoácidos (132 aa) - SEQ ID NO: 44 Secuencia líder-FR1-**CDR1**-FR2-**CDR2**-FR3-**CDR3**-FR4

5

MMSPAQFLFLLVLWIRETNGDVVLTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLL
QRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHTFPWTFG
GGTKLEIK

XPA 210-Ar3

10 Cadena pesada: Secuencia de ADN (411 pb) - SEQ ID NO: 45 Secuencia líder-FR1-**CDR1**-FR2-**CDR2**-FR3-**CDR3**-FR4

ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTGCCTGTTACAGCCTTTCCTGGTATCCTGTCTGATGTGCA
GCTTCAGGAGTCAGGACCTGACCTGGTCAAACCTTCTCAGTCACTTTCCTCACCTGCACTG
TCACTGGCTACTCCATCACCAGTGGTTATAGCTGGCAGTGGATCCGGCAGTTTCCAGGAAAC
AAACTGGAATGGTTGGGCTACATACACTATAGTGGTAGCACTACCTACAACCCATCTCTCAA
AGGTCGGATCTCTATCACTCGAGACACATCCAAGAACCAGTTCTTCTGAGTTGAATTCTG
TGACTACTGAGGACACTGCCACATATTACTGTGCAAGATGGGGTACTGGCCACTGGTACTTC
GATGTCTGGGCCCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

15 Cadena pesada: Secuencia de aminoácidos (137 aa) - SEQ ID NO: 46 Secuencia líder-FR1-**CDR1**-FR2-**CDR2**-FR3-**CDR3**-FR4

MRVLILLCLFTAFPGILSDVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSGYSWHWIRQFPGN
KLEWLGYIHYSGSTTYNPSLKGRISITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCARWGTGHWYF
DVWAAGTTVTVSS

20 Cadena ligera: Secuencia de ADN (384 pb) - SEQ ID NO: 47 Secuencia líder-FR1-**CDR1**-FR2-**CDR2**-FR3-**CDR3**-FR4

ATGGCCTGGATTTCACTTATACTCTCTCTCCTGGCTCTCAGCTCAGGGGCCATTTCCAGGC
 TGTTGTGACTCAGGAATCTGCACTCACCATCACCTGGTAAAACAGTCACACTCACTTGTG
GCTCAAGTACTGGGGCTGTTACAACACTAATACTATGCCAACTGGGTCCAAGAAAAACCAGAT
 CATTATTCACTGGTCTAATAGGT**GGTACCAACAACCGAGTTCCA**GGTGTTCCTGCCAGATT
 CTCAGGCTCCCTGATTGGAGACAAGGCTGCCCTCACCATCACAGGGGCACAGACTGAGGATG
 AGGCAATATATTTCTGT**GCTCTATGGTACAGCAACCATTGGGTGTT**CGGTGGAGGAACCAA
 CTGACTGTCCTA

Cadena ligera: Secuencia de aminoácidos (128 aa) - SEQ ID NO: 48 Secuencia líder-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

5

MAWISLILSLLALSSGAISQAVVTQESALTTSPGKTVTLT**CRSSTGAVTTTNYAN**WVQEKPD
 HLFTGLIG**TNNRV**PGVPARFSGSLIGDKAALTIITGAQTEDEAIYFC**ALWYSNHWV**FGGGTK
 LTVL

Ejemplo 8: Identificación de isotipo del anticuerpo monoclonal anti-TK1

10 Se utilizaron anticuerpos monoclonales anti-TK1 de la línea celular de hibridoma XPA 210-Ar1 para el análisis de isotipificación, que se realizó siguiendo el manual técnico de SBA Clonotyping™ Sistema-HRP (SouthernBiotech, Cat. N.º: 5300-05). Se determinó que el isotipo del anticuerpo monoclonal XPA 210-Ar1 era una cadena pesada de IgG1 y una cadena ligera K, véase la Tabla 3 a continuación.

15

Tabla 3 - Identificación de isotipo de los sobrenadantes de reserva

	Isotipo	Absorbancia a 450 nm
Cadena pesada	IgG1	1,604
	IgG2a	0,168
	IgG2b	0,134
	IgG3	0,138
	IgA	0,150
	IgM	0,133
Cadena ligera	K	0,418
	λ	0,153

Los ejemplos presentados anteriormente describen la producción y selección de un par de anticuerpos anti-TK1 monoclonales que se pueden utilizar para establecer un ensayo diagnóstico de rutina *in vitro* con suficiente especificidad y sensibilidad para ser clínicamente relevantes. La inmunización, selección y caracterización de dicho par de anticuerpos, XPA 210-Ar1 y XPA 210-Ar2, se han descrito y el rendimiento de un ensayo ELISA de prototipo tipo sándwich con muestras de donantes de sangre sanos y pacientes con cáncer de mama y próstata han producido resultados prometedores con mayor sensibilidad que la del ensayo de enlace TK disponible.

La estrategia de selección inicial se basó en conjugados peptídicos con una región seleccionada de TK1 que representa el dominio C-terminal, que está involucrado en la regulación del ciclo celular de la enzima.

Se han seleccionado tres anticuerpos monoclonales y su propiedad única es que se unen eficazmente a la forma sérica de la TK1 humana. Esto es único ya que varios otros anticuerpos pueden unirse a los péptidos antigénicos y a la rTK1 humana, pero solo estos tres anticuerpos monoclonales podrían funcionar en un formato de inmunoensayo tipo sándwich utilizando suero humano.

Dos de los anticuerpos se obtuvieron con conjugados BSA peptídicos (XPA 210-Ar1 y XPA 210-Ar3), mientras que uno (XPA 210-Ar2) se produjo con el conjugado KLH peptídico. No se encontraron anticuerpos que tuvieran las características deseadas resultantes de la inmunización con rTK1 humana que mostrara esta capacidad aunque inicialmente se seleccionaron cuatro clones. Este resultado está según el hecho de que ahora hay varios anticuerpos

monoclonales anti-TK1 disponibles comercialmente y aún no hay un ensayo desarrollado para uso clínico basado en estos anticuerpos.

- Cuatro de los anticuerpos monoclonales comerciales (3B3.E11 de Abcam; M02, clon F12 de Abnova; EPR3194 y EPR3193, Mabs de conejo de Abnova) se probaron en un formato de ensayo ELISA tipo sándwich descrito aquí, pero ninguno de ellos pudo reaccionar suficientemente con TK1 sérica. Por lo tanto, la generación de anticuerpos monoclonales adecuados basados en rTK1 es aparentemente ineficiente y puede estar relacionada con la compleja estructura oligomérica de la proteína TK1 que se encuentra en la sangre.
- 10 La naturaleza única de los anticuerpos monoclonales anti-TK1 descritos aquí se debe probablemente en parte a sus propiedades de unión al epítipo, que es diferente y aparentemente se complementa para una detección inmune eficiente.

- En el ensayo ELISA prototipo descrito se utilizaron XPA 210-Ar1 y XPA 210-Ar2. Alternativamente, uno de estos anticuerpos podría intercambiarse por XPA 210-Ar3. Además, para un ensayo mejorado o para aplicaciones especiales del ensayo inmune es muy probable que la disponibilidad de XPA 210-Ar3 sea muy beneficiosa. La existencia de estos anticuerpos monoclonales anti-TK1 es un requisito previo para un ensayo ELISA funcional.

Ejemplo 9: Estudios de unión de la interacción entre TK1 recombinante y XPA 210-Ar1 y XPA 210-Ar2

- Con el fin de determinar las características de unión de las interacciones entre TK1 recombinante y los dos anticuerpos monoclonales utilizados en el procedimiento ELISA de sándwich, se realizaron estudios de unión preliminares con tecnología de sensor de resonancia de superficie, más específicamente el sistema de flujo continuo de doble canal Attana 200. Este procedimiento se basa en la tecnología de microbalanza de cristal de cuarzo, que proporciona información muy importante desde el punto de vista biológico sobre las propiedades de unión de las interacciones antígeno-anticuerpo.

- En el experimento mostrado en las figs. 8A y 8B se utilizó un chip sensor carboxilo LNB, que se reactivó con el kit de captura de IgG de ratón (Biacore, GE Healthcare) con el procedimiento de acoplamiento de amina. Los ligandos fueron XPA 210-Ar1 y XPA 210-Ar2 y se capturaron en la superficie con anticuerpos anti-ratón mediante dos inyecciones de soluciones de anticuerpos de 50 µg / ml en un tampón de acetato de 10 mM, pH 4,5. Se utilizó un chip tratado de forma idéntica sin el anticuerpo de captura como control negativo. Se inyectó TK1 recombinante pura, diluida a 20 µg / ml en 10 mM de HEPES, 150 mM de NaCl, Tween 20 al 0,005 %, pH 7,4 y se inyectó sobre la superficie a 25 µl / min. El tiempo de asociación fue de 84 s y la disociación se midió durante otros 300 s. El tampón sin TK1 recombinante se inyectó como un blanco y se sustrajo de las señales de inyección de la muestra.

- Las mediciones cinéticas se realizaron mediante una serie de inyecciones con cinco concentraciones de TK1 recombinante de 20 µg / ml a 1,25 µg / ml y los resultados con XPA 210-Ar1 y XPA 210-Ar2 se muestran en la fig. 8A y 8B, respectivamente. Se utilizó un modelo de unión 1:1 para el cálculo de las constantes cinéticas a partir de las curvas ajustadas de los datos de doble referencia como se muestra en las figs. 8A y 8B. Los resultados presentados del estudio preliminar de unión demostraron afinidad nanomolar (nM) por TK1 recombinante con XPA 210-Ar1 (KD = 0,65 nM) y XPA 210-Ar2 (KD = 4,12 nM). Los resultados indican además que parece haber una interacción significativamente más fuerte entre XPA 210-Ar1 y TK1 recombinante en comparación con la interacción entre XPA 210-Ar2 y TK1 recombinante.

REFERENCIAS

- [1] Gronowitz, J.S., Hagberg, H., Kallander, C.F., Simonsson, B., 1983, The use of serum deoxythymidine kinase as a prognostic marker, and in the monitoring of patients with non-Hodgkin's lymphoma. *British Journal of Cancer* 47, 487-495.
- [2] Karlstrom, A.R., Neumuller, M., Gronowitz, J.S., Kallander, C.F., 1990. Molecular forms in human serum of enzymes synthesizing DNA precursors and DNA. *Molecular and Cellular Biochemistry* 92,23-35.
- [3] He, Q.M., Skog, S., Wang, N.N., Eriksson, S., Tribukait, B., 1996. Characterization of a peptide antibody against a C-terminal part of human and mouse cytosolic thymidine kinase, which is a marker for cell proliferation. *European Journal of Cell Biology* 70, 117-124.
- [4] Zhang, F., Li, H., Pendleton, A.R., Robison, J.G., Monson, K.O., Murray, B.K., O'Neill, K.L., 2001. Thymidine kinase 1 immunoassay: a potential marker for breast cancer. *Cancer Detection and Prevention* 25, 8-15.
- [5] He, Q., Zou, L., Zhang, P.A., Liu, J.X., Skog, S., Fornander, T., 2000. The clinical significance of thymidine kinase 1 measurement in serum of breast cancer patients using anti-TK1 antibody. *The International Journal of Biological Markers* 15, 139-146.
- [6] Hallek, M., Langenmayer, I., Nerl, C., Knauf, W., Dietzfelbinger, H., Adorf, D., Ostwald, M., Busch, R., Kuhn-Hallek,

- I., Thiel, E., Emmerich, B., 1999. Elevated serum thymidine kinase levels identify a subgroup at high risk of disease progression in early, nonmolding chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 93, 1732-1737.
- [7] O'Neill, K.L., Zhang, F., Li, H., Fuja, D.G., Murray, B.K., 2007. Thymidine kinase 1 - A prognostic and diagnostic indicator in ALL and AML patients. *Leukemia* 21, 560-563.
- [8] von Euler, H., Eriksson, S., 2011. Comparative aspects of the proliferation marker thymidine kinase 1 in human and canine tumor diseases. *Veterinary and Comparative Oncology* 9, 1-15.
- 10 [9] Ohrvik, A., Lindh, M., Einarsson, R., Grassi, J., Eriksson, S., 2004. Sensitive nonradiometric method for determining thymidine kinase 1 activity. *Clinical Chemistry* 50, 1597-1606.
- [10] He, Q., Fornander, T., Johansson, H., Johansson, U., Hu, G.Z., Rutqvist, L.E., Skog, S., 2006. Thymidine kinase 1 in serum predicts increased risk of distant or loco-regional recurrence following surgery in patients with early breast cancer. *Anticancer Research* 26, 4753-4759.
- 15 [11] He, Q.M., Zhang, P.G., Zou, L., Li, H.X., Wang, X.Q., Zhou, S., Fornander, T., Skog, S., 2005. Concentration of thymidine kinase 1 in serum (S-TK1) is a more sensitive proliferation marker in human solid tumors than its activity. *Oncology Reports* 14, 1013-1019.
- 20 [12] He, E., Xu, X.H., Guan, H., Chen, Y., Chen, Z.H., Pan, Z.L., Tang, L.L., Hu, G.Z., Li, Y., Zhang, M., Zhou, J., Eriksson, S., Fornander, T., Skog, S., 2010. Thymidine kinase 1 is a potential marker for prognosis and monitoring the response to treatment of patients with breast, lung, and esophageal cancer and non-Hodgkin's lymphoma. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*. 29, 352-358.
- 25 [13] Wu, C., Yang, R., Zhou, J., Bao, S., Zou, L., Zhang, P., Mao, Y., Wu, J., He, Q., 2003. Production and characterisation of a novel chicken IgY antibody raised against C-terminal peptide from human thymidine kinase 1. *Journal of Immunological Methods* 277, 157-169.
- 30 [14] Sherley, J.L., Kelly, T.J., 1988. Regulation of human thymidine kinase during the cell cycle. *Journal of Biological Chemistry* 263, 8350-8358.
- [15] Ke, P.Y., Chang, C.-F., 2004. Mitotic degradation of human thymidine kinase 1 is dependent on the anaphase-promoting complex/cyclosome-CDH1-mediated pathway. *Molecular and Cellular Biology* 24, 514-526.
- 35 [16] Eriksson, S., Munch-Petersen, B., Johansson, K., Eklund, H., 2002. Structure and function of cellular deoxyribonucleoside kinases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59, 1327-1346.
- [17] Sharif, H., Kiran Kumar, J., Wang, L., He, E., Eriksson, S., 2012. Quaternary structures of recombinant, cellular, and serum forms of Thymidine Kinase 1 from dogs and humans. *BMC Biochemistry* 13, 12.
- 40 [18] Kiran Kumar J, Sharif, H., Westberg, S., von Euler, H., Eriksson, S., 2013. High levels of inactive thymidine kinase 1 polypeptide in sera from dogs with solid tumours by immunoaffinity methods: Implications for in vitro diagnostics. *The Veterinary Journal* 197, 854-860.
- 45 [19] Flemington, F., Bradshaw Jr., H.D., Traina-Dorge, V., Slagel, V., Deininger, P.L., 1987. Sequence, structure and promoter characterization of the human thymidine kinase gene. *Gene* 52, 267-277.
- [20] Welin M, Kosinska U, Mikkelsen NE, Carnrot C, Zhu C, Wang L, Eriksson S, Munch-Petersen B, Eklund H, 2004. Structures of thymidine kinase 1 of human and mycoplasmic origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 101, 17970-17975.
- 50 [21] Wu, J.P., Mao, Y.R., Hu, L.X., Wang, N., Wu, C.J., He, Q., Skog, S., 2000. A new cell proliferating marker: Cytosolic thymidine kinase as compared to proliferating cell nuclear antigen in patients with colorectal carcinoma. *Anticancer Research* 20, 4815-4820.
- 55 [22] Sharif, H., von Euler, H., Westberg, S., He, E., Wang, L., Eriksson, S., 2012. A sensitive and kinetically defined radiochemical assay for canine and human serum thymidine kinase 1 (TK1) to monitor canine malignant lymphoma. *The Veterinary Journal* 194, 40-47.
- 60 [23] Gasparri, F., Wang, N., Skog, S., Galvani, A., Eriksson, S., 2009. Thymidine kinase 1 expression defines an activated G1 state of the cell cycle as revealed with site-specific antibodies and ArrayScan assays. *European Journal of Cell Biology* 88, 779-785.
- 65 [24] Documento WO 2004/100760

[25] Documento WO 2008/142664

[26] Munch-Petersen B., 2009. Reversible tetramerization of human TK1 to the high catalytic efficient form is induced by pyrophosphate, in addition to tripolyphosphates, or high enzyme concentration. FEBS Journal 276, 571-580

5

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> AROCELL AB

5 <120> ANTICUERPOS ANTI-TK1 MONOCLONALES

<130> P1197PC00

<150> SE 1351531-7

10 <151> 19/12/2013

<160> 48

<170> PatentIn versión 3.5

15

<210> 1

<211> 31

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 1

Gly Gln Pro Ala Gly Pro Asp Asn Lys Glu Asn Cys Pro Val Pro Gly
1 5 10 15

Lys Pro Gly Glu Ala Val Ala Ala Arg Lys Leu Phe Ala Pro Gln
20 25 30

25 <210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30 <400> 2

Gly Glu Ala Val Ala Ala Arg Lys Leu Phe
1 5 10

<210> 3

35 <211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

40

Asn Cys Pro Val Pro Gly Lys Pro Gly Glu Ala Val
1 5 10

<210> 4

<211> 10

45 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Asn Cys Pro Val Pro Gly Lys Pro Gly Glu
1 5 10

50

<210> 5

ES 2 737 626 T3

<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5 <400> 5

Pro Val Pro Gly Lys Pro Gly Glu Ala Val
1 5 10

<210> 6
10 <211> 5
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 6

15

Asp Tyr Glu Met His
1 5

<210> 7
<211> 17
20 <212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 7

Ala Ile His Pro Gly Tyr Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

25 Gly

<210> 8
<211> 7
<212> PRT
30 <213> Mus musculus

<400> 8

Phe Ile Thr Lys Phe Asp Tyr
1 5

35

<210> 9
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus

40

<400> 9

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Phe Leu Asn
1 5 10 15

45 <210> 10
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

50

<400> 10

ES 2 737 626 T3

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
1 5

<210> 11
<211> 9
5 <212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 11

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Trp Thr
10 1 5

<210> 12
<211> 17
<212> PRT
15 <213> Mus musculus

<400> 12

Ala Ile Leu Pro Gly Ser Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly
20
<210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus
25
<400> 13

Leu Ile Thr Thr Phe Asp Tyr
1 5

30 <210> 14
<211> 16
<212> PRT
<213> Mus musculus
35 <400> 14

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 15
40 <211> 6
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 15
45

Ser Gly Tyr Ser Trp His
1 5

<210> 16
<211> 16
50 <212> PRT

ES 2 737 626 T3

<213> Mus musculus

<400> 16

5

Tyr Ile His Tyr Ser Gly Ser Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Gly
1 5 10 15

<210> 17

<211> 10

10 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 17

15 Trp Gly Thr Gly His Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 18

<211> 14

<212> PRT

20 <213> Mus musculus

<400> 18

Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Thr Asn Tyr Ala Asn
1 5 10

25

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

30

<400> 19

Gly Thr Asn Asn Arg Val Pro
1 5

35 <210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

40 <400> 20

Ala Leu Trp Tyr Ser Asn His Trp Val
1 5

<210> 21

45 <211> 41

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

50

ES 2 737 626 T3

Lys Lys Ala Ser Gly Gln Pro Ala Gly Pro Asp Asn Lys Glu Asn Cys
1 5 10 15

Pro Val Pro Gly Lys Pro Gly Glu Ala Val Ala Ala Arg Lys Leu Phe
20 25 30

Ala Pro Gln Gln Ile Leu Gln Cys Ser
35 40

<210> 22

<211> 40

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 22

Lys Lys Ser Ser Ala Gln Thr Ala Gly Ser Asp Asn Lys Asn Cys Leu
1 5 10 15

Val Leu Gly Gln Pro Gly Glu Ala Leu Val Val Arg Lys Leu Phe Ala
20 25 30

Ser Gln Gln Val Leu Gln Tyr Asn
10 35 40

<210> 23

<211> 39

<212> PRT

15 <213> Rattus norvegicus

<400> 23

Lys Lys Ser Ser Ala Gln Thr Ala Asp Asn Lys Glu Asn Tyr Ser Val
1 5 10 15

Leu Gly Gln Pro Ile Glu Ile Pro Ala Val Arg Lys Leu Phe Ala Pro
20 25 30

Gln Gln Ile Leu Gln Cys Asn
35

20

<210> 24

<211> 33

<212> PRT

<213> Gallus gallus

25

<400> 24

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

Met Gly Val Lys Gln Leu Asp Met Pro Ala Ser Arg Lys Ile Phe Ala
20 25 30

Ser

ES 2 737 626 T3

<210> 25
 <211> 48
 <212> PRT <213> Canis lupus

5

<400> 25

Lys Ala Ser Gly Pro Pro Met Gly Leu Asp Ser Arg Glu Asn Lys Glu
 1 5 10 15

Asn Val Leu Val Leu Val Pro Gly Lys Pro Gly Glu Gly Lys Glu Ala
 20 25 30

Thr Gly Val Arg Lys Leu Phe Ala Pro Gln His Val Leu Gln Cys Ser
 35 40 45

10 <210> 26
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15 <400> 26

Ala Ser Gly Gln Pro Ala Gly Pro Asp Asn
 1 5 10

<210> 27
 20 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 27
 25

Gly Gln Pro Ala Gly Pro Asp Asn Lys Glu
 1 5 10

<210> 28
 <211> 10
 30 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 28

Pro Ala Gly Pro Asp Asn Lys Glu Asn Cys
 1 5 10

35

<210>> 29
 <211> 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40

<400> 29

Gly Pro Asp Asn Lys Glu Asn Cys Pro Val
 1 5 10

45 <210> 30

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 30

Asp Asn Lys Glu Asn Cys Pro Val Pro Gly
 1 5 10

<210> 31
 10 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 31
 15

Lys Glu Asn Cys Pro Val Pro Gly Lys Pro
 1 5 10

<210> 32
 <211> 10
 20 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 32

Pro Gly Lys Pro Gly Glu Ala Val Ala Ala
 1 5 10
 25

<210> 33
 <211> 10
 <212> PRT
 30 <213> Homo sapiens

<400> 33

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

35 <210> 34
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40 <400> 34

Ala Val Ala Ala Arg Lys Leu Phe Ala Pro
 1 5 10

45 <210> 35
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

50 <400> 35

Ala Ala Arg Lys Leu Phe Ala Pro Gln Gln
 1 5 10

ES 2 737 626 T3

<210> 36
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 36

Ala Arg Lys Leu Phe Ala Pro Gln Gln Ile
 1 5 10

10 <210> 37
 <211> 405
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

15 <400> 37

atggaatgga gctgggtctt tctcttcctc ctgtcagtaa ctgcaggtgt ccaatcccag 60
 gttcaactgc agcagtctgg ggctgagctg gtgaggcctg gggcttcaat gaagctgtcc 120
 tgcaaggctt tgggctacac attaactgac tatgaaatgc actgggtgaa acagacacct 180
 gcgcatggcc tggaatggat tggagctatt catccaggat atggtggtac tgcctataat 240
 cagaagttca agggcaaggc cacactgact gcagacaaat cctccagcac agcctacatg 300
 gagctcagca gcctgacatc tgaggactct gctgtctatt actgtacaac ttttattact 360
 aaatttgact actggggcca aggcaccact ctcacagtct cctca 405

<210> 38
 20 <211> 135
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 38

25

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Met Lys Leu Ser Cys Lys Ala Leu Gly Tyr Thr Leu
 35 40 45
 Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Ala His Gly Leu

ES 2 737 626 T3

Met Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg
 1 5 10 15

Glu Thr Asn Gly Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser
 20 25 30

Val Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
 35 40 45

Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Phe Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg
 50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
 65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95

Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr
 100 105 110

Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 115 120 125

Leu Glu Ile Lys
 130

<210> 41
 5 <211> 405
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 41
 10
 atggaatgga gctgggtctt tctcttcctc ctgtcagtaa ctgcaggtgt ccaatcccag 60
 gttcaactgc agcagtctgg ggctgagctg gtgaggcctg gggcttcagt gaaactgtcc 120
 tgcaaggctt tgggctacac attactgac tatgaaatgc actgggtgag gcagacacct 180
 gtgcatggcc tggaatggat tggagctatt cttccaggaa gtggtggtac tgccataaat 240
 cagaagttca agggcaaggc cacactgact gcagacaaat cctccagcac agcctacatg 300
 gagctcagca gcctgacatc tgaggactct gctgtctatt actgtactac tttgattacg 360
 acctttgact actggggcca aggcaccact ctcacagtct cctca 405

<210> 42
 <211> 135
 15 <212> PRT
 <213> Mus musculus

ES 2 737 626 T3

<400> 42

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

5

<210> 43
 <211> 396
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

10

<400> 43

atgatgagtc ctgccagtt cctgtttctg ttagtgctct ggattcggga aaccaacggt 60
 gatgttgtgt tgaccagac tccactcaca ttgtcgggta ccattggaca accagcctcc 120
 atttcttgta agtcaagtca gaggctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg 180
 ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaag cgcctaattct atctggtgtc taaattggac 240
 tctggagtcc ctgacagggt cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc 300
 agcagagtgg aggctgagga tttgggagtt tattattgct ggcaaggtag acattttccg 360
 tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa 396

15

<210> 44
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

ES 2 737 626 T3

<400> 44

Met Met Ser Pro Ala Gln Phe Leu Phe Leu Leu Val Leu Trp Ile Arg
 1 5 10 15

Glu Thr Asn Gly Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser
 20 25 30

Val Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
 35 40 45

Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg
 50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
 65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr
 100 105 110

Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
 115 120 125

Leu Glu Ile Lys
 130

5

<210> 45

<211> 411

<212> ADN

10 <213> Mus musculus

<400> 45

atgagagtgc tgattctttt gtgcctgttc acagcctttc ctggtatcct gtctgatgtg 60
 cagcttcagg agtcaggacc tgacctgggtg aaaccttctc agtcactttc actcacctgc 120
 actgtcactg gctactccat caccagtgggt tatagctggc actggatccg gcagtttcca 180
 ggaaacaaac tggaatggtt gggctacata cactatagtg gtagcactac ctacaacca 240
 tctctcaaag gtcggatctc tatcactcga gacacatcca agaaccagtt cttcctgcag 300
 ttgaattctg tgactactga ggacactgcc acatattact gtgcaagatg gggactggc 360
 cactggtact tcgatgtctg ggccgcaggg accacgggtca ccgtctcctc a 411

15

<210> 46

<211> 137

<212> PRT

<213> Mus musculus

ES 2 737 626 T3

<400> 46

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

Leu Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro
 20 25 30

Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr
 35 40 45

Ser Gly Tyr Ser Trp His Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu
 50 55 60

Glu Trp Leu Gly Tyr Ile His Tyr Ser Gly Ser Thr Thr Tyr Asn Pro
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Gly Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln
 85 90 95

Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Thr Gly His Trp Tyr Phe Asp Val Trp Ala
 115 120 125

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135

5

<210> 47

<211> 384

<212> ADN

10 <213> Mus musculus

<400> 47

atggcctgga tttcacttat actctctctc ctggctctca gctcaggggc catttcccag 60
 gctgtttgtga ctcaggaatc tgcactcacc acatcacctg gtaaaacagt cacactcact 120
 tgtcgctcaa gtactggggc tgttacaact actaactatg ccaactgggt ccaagaaaaa 180
 ccagatcatt tattcactgg tctaataagg ggtaccaaca accgagttcc aggtgttcct 240
 gccagattct caggctccct gattggagac aaggctgccc tcaccatcac aggggcacag 300
 actgaggatg aggcaatata tttctgtgct ctatggtaca gcaaccattg ggtgttcggt 360
 ggaggaacca aactgactgt ccta 384

ES 2 737 626 T3

<210> 48

<211> 128

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 48

Met Ala Trp Ile Ser Leu Ile Leu Ser Leu Leu Ala Leu Ser Ser Gly
1 5 10 15

Ala Ile Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser
20 25 30

Pro Gly Lys Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val
35 40 45

Thr Thr Thr Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu
50 55 60

Phe Thr Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Asn Arg Val Pro Gly Val Pro
65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile
85 90 95

Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp
100 105 110

Tyr Ser Asn His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
115 120 125

10

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal o un fragmento de un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a una forma
5 sérica de timidina quinasa 1 humana, TK1, donde dicho anticuerpo o fragmento monoclonal tiene especificidad por un epítipo GEAVAARKLF (SEQ ID NO: 2) de dicha TK1 humana y dicho anticuerpo o fragmento monoclonal tiene una región 1 determinante de la complementariedad de dominios pesados, VH, variables, CDR1 que tiene secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 6);
una CDR2 de dominio VH que tiene la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 7);
10 una CDR3 de dominio VH que tiene la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 8);
una CDR1 de dominio VL ligero variable que tiene la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 9);
una CDR2 de dominio VL que tiene la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 10); y
una CDR3 de dominio VL que tiene la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 11).
- 15 2. El anticuerpo o fragmento monoclonal según la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo o fragmento monoclonal es capaz de unirse a la TK1 recombinante humana y a una forma celular de la TK1 humana.
3. El anticuerpo o fragmento monoclonal según la reivindicación 1 o 2, donde dicho anticuerpo o fragmento monoclonal también es capaz de unirse a un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos
20 GQPAGPDNKENCVPVPGKPGGEAVAARKLFAPQ (SEQ ID NO: 1).
4. El anticuerpo o fragmento monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, obtenible mediante un proceso que comprende:
inmunizar un animal no humano con un primer conjugado peptídico que comprende un péptido que tiene la secuencia
25 de aminoácidos GQPAGPDNKENCVPVPGKPGGEAVAARKLFAPQ (SEQ ID NO: 1) acoplado a una primera proteína portadora o un segundo conjugado peptídico que comprende dicho péptido que tiene la secuencia de aminoácidos GQPAGPDNKENCVPVPGKPGGEAVAARKLFAPQ (SEQ ID NO: 1) acoplado a una segunda proteína portadora que es diferente de dicha primera proteína portadora;
aislar esplenocitos de dicho animal no humano con títulos en sangre para el primer conjugado peptídico o el segundo
30 conjugado peptídico;
formar hibridomas fusionando dichos esplenocitos con mielomas;
seleccionar el sobrenadante de hidridomas, que resulta de la inmunización con dicho primer conjugado peptídico, para títulos para dicho segundo conjugado peptídico y seleccionar el sobrenadante de hidridomas, resultante de dicha inmunización con dicho segundo conjugado peptídico, para títulos para dicho primer conjugado peptídico;
35 seleccionar un hibridoma que produce anticuerpos monoclonales capaces de unirse a dicho primer conjugado peptídico, a dicho segundo conjugado peptídico y a la TK1 recombinante humana; y
aislar dicho anticuerpo monoclonal del sobrenadante de dicho hibridoma seleccionado.
5. Un procedimiento para determinar un nivel de material de TK1 celular y/o sérica en una muestra
40 corporal, que comprende:
poner en contacto dicha muestra corporal con un anticuerpo o fragmento monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4; y
detectar una cantidad de anticuerpo o fragmento monoclonal unido.
- 45 6. Un kit para determinar un nivel de material de TK1 celular y/o sérica en una muestra corporal, que comprende:
un primer anticuerpo monoclonal según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 inmovilizado en un soporte sólido o destinado a ser inmovilizado en dicho soporte sólido; y
un segundo anticuerpo monoclonal, donde
50 dicho anticuerpo monoclonal tiene especificidad por un epítipo seleccionado de un grupo que consiste en:
al menos uno de NCPVPGKPGGE (SEQ ID NO: 4), VPVPGKPGGEAV (SEQ ID NO: 5) y NCPVPGKPGGEAV (SEQ ID NO: 3) de dicha TK1 humana; y
un epítipo dependiente de la conformación de dicha TK1 humana.
55
7. El kit según la reivindicación 6, donde dicho segundo anticuerpo o fragmento monoclonal tiene una CDR1 de dominio VH que tiene la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 6);
una CDR2 de dominio VH que tiene la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 12);
una CDR3 de dominio VH que tiene la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 13);
60 una CDR1 de dominio VL que tiene la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 14);
una CDR2 de dominio VL que tiene la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 10); y
una CDR3 de dominio VL que tiene la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 11).
8. El kit según la reivindicación 6, donde dicho segundo anticuerpo o fragmento monoclonal tiene
65 una CDR1 de dominio VH que tiene la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 15);

- una CDR2 de dominio VH que tiene la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 16);
- una CDR3 de dominio VH que tiene la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 17);
- una CDR1 de dominio VL que tiene la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 18);
- una CDR2 de dominio VL que tiene la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 19); y
- 5 una CDR3 de dominio VL que tiene la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 20).

9. Un procedimiento para estimar la probabilidad de recurrencia de un tumor en un sujeto, que comprende:

10 determinar un nivel de material de TK1 sérica en una muestra corporal de dicho sujeto utilizando un procedimiento según la reivindicación 5 o un kit según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, y comparar dicho nivel de material de TK1 sérica en dicha muestra corporal con un nivel de material de TK1 sérica representativo de una población de sujetos sanos o con un nivel de material de TK1 sérica previamente determinado en dicho sujeto.

15 10. Un procedimiento para determinar la proliferación celular en un sujeto, que comprende: determinar un nivel de material de TK1 sérica en una muestra corporal de dicho sujeto utilizando un procedimiento según la reivindicación 5 o un kit según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, y determinar dicha proliferación celular basándose en dicho nivel de material de TK1 sérica en dicha muestra corporal.

20 11. Un procedimiento para determinar la respuesta de un proceso de proliferación en un sujeto que padece una enfermedad maligna, que comprende: determinar un nivel de material de TK1 sérica en una muestra corporal de dicho sujeto utilizando un procedimiento según la reivindicación 5 o un kit según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, y determinar dicha respuesta al proceso de proliferación celular basándose en dicho nivel de material de TK1 sérica en
25 dicha muestra corporal.

12. Un procedimiento para determinar un nivel de inflamación, infección o proliferación de células tumorales en un sujeto, que comprende:
30 determinar un nivel de material de TK1 sérica en una muestra corporal de dicho sujeto utilizando un procedimiento según la reivindicación 5 o un kit según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, y determinar dicho nivel de inflamación, infección o proliferación celular tumoral basándose en dicho nivel de material de TK1 sérica en dicha muestra corporal.

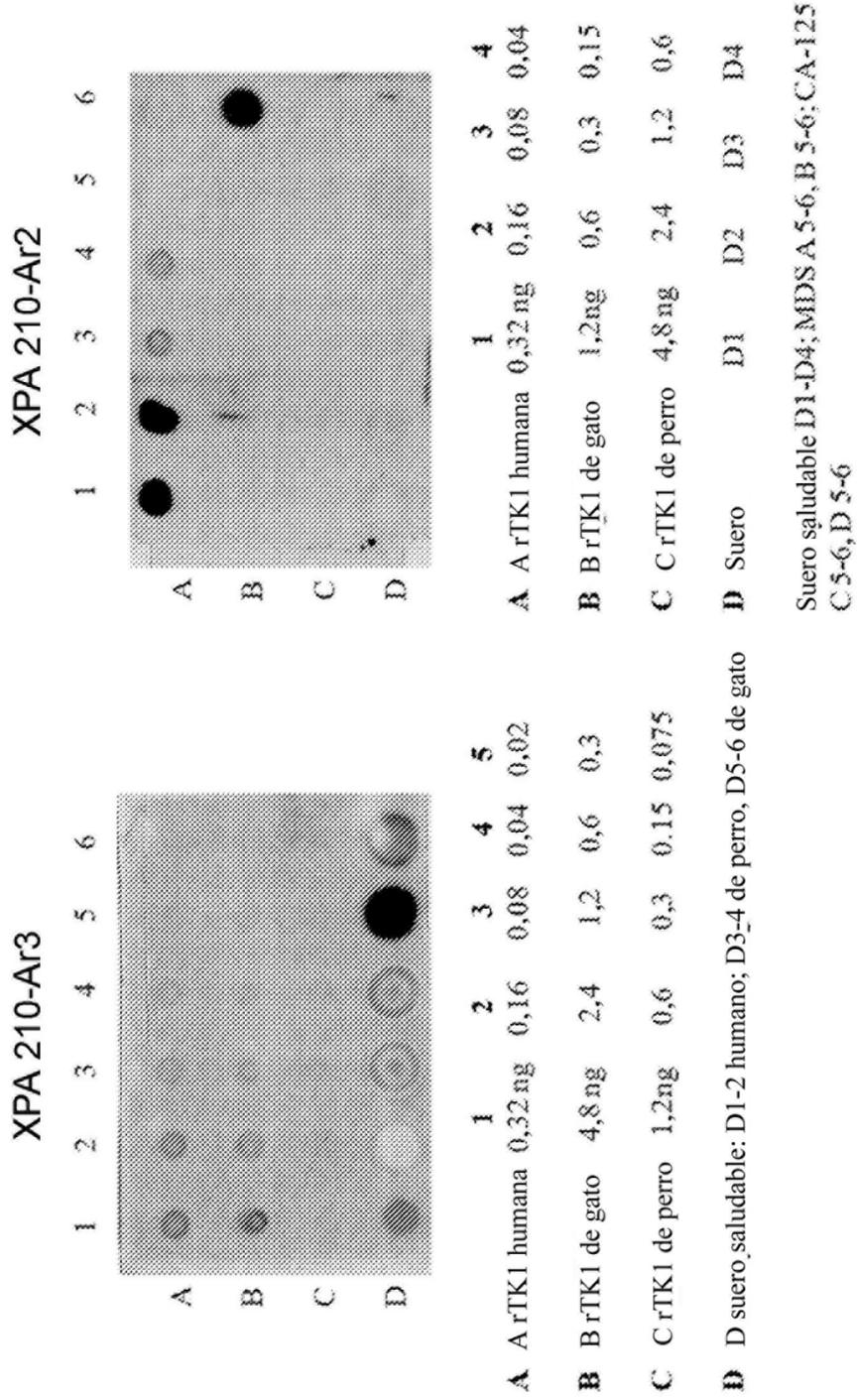


Fig. 1

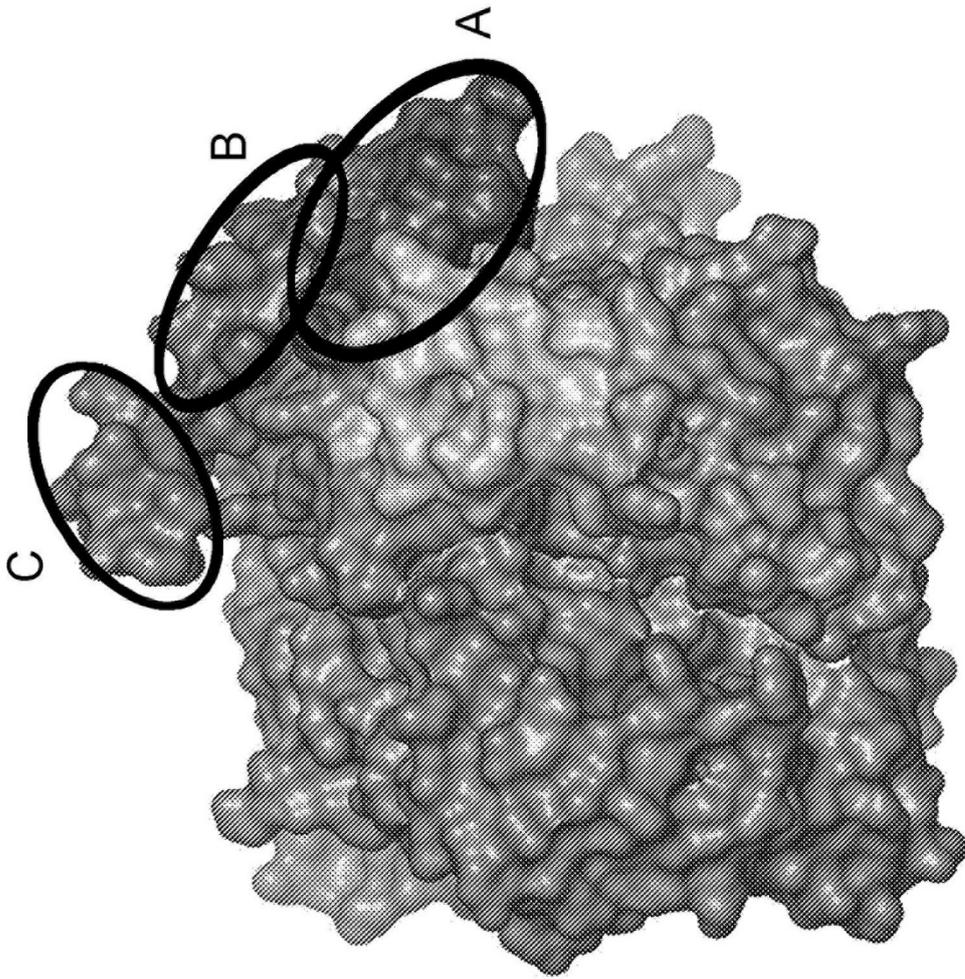


Fig. 2

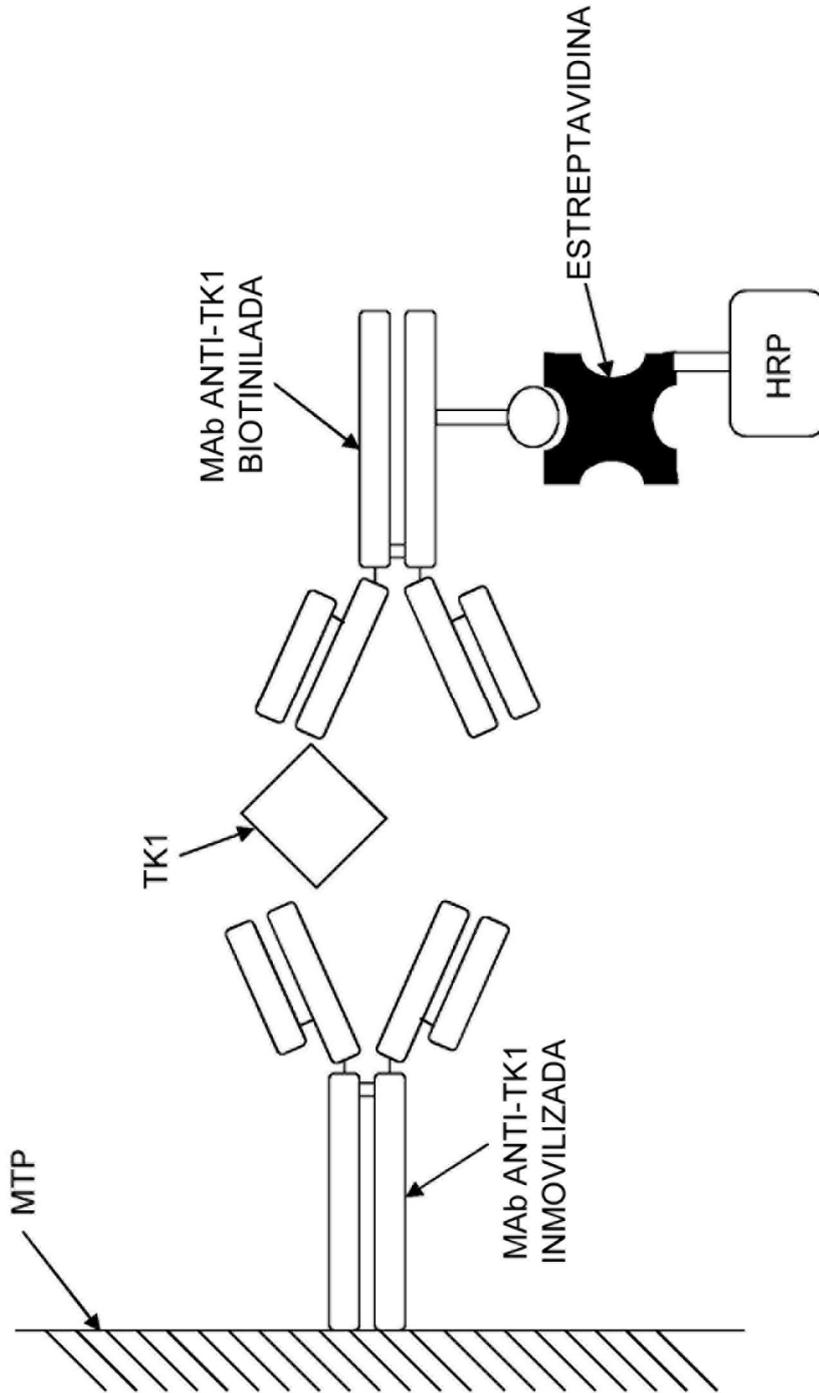


Fig. 3

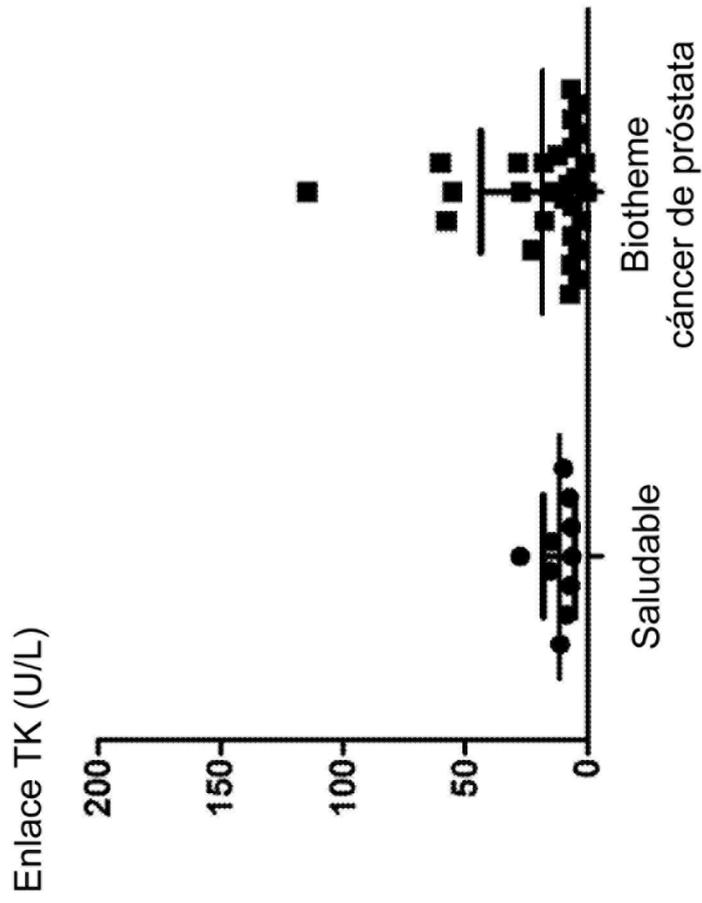


Fig. 4

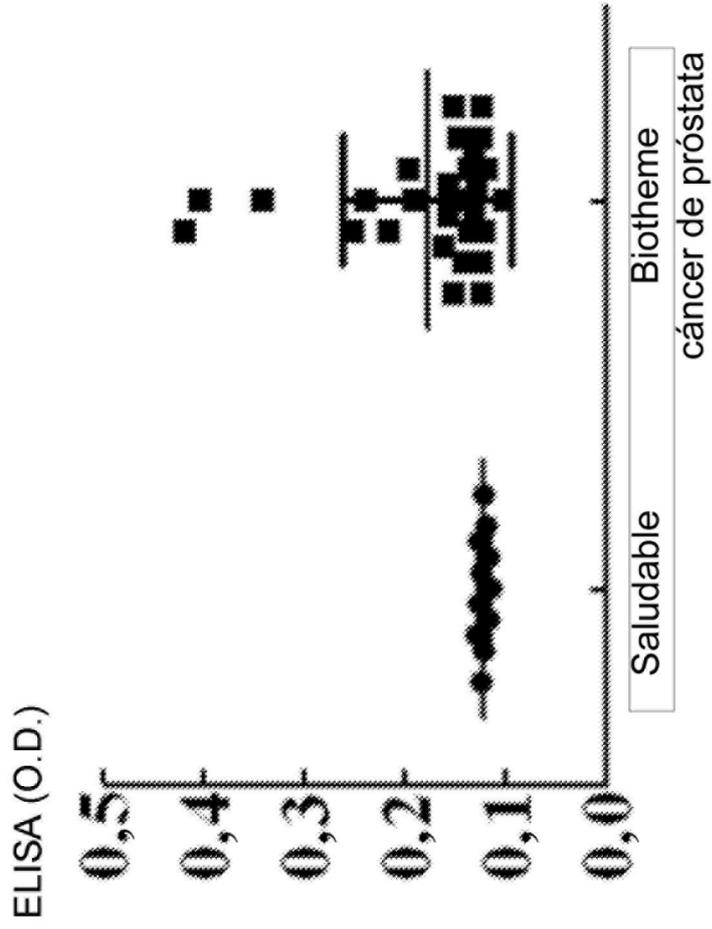


Fig. 5

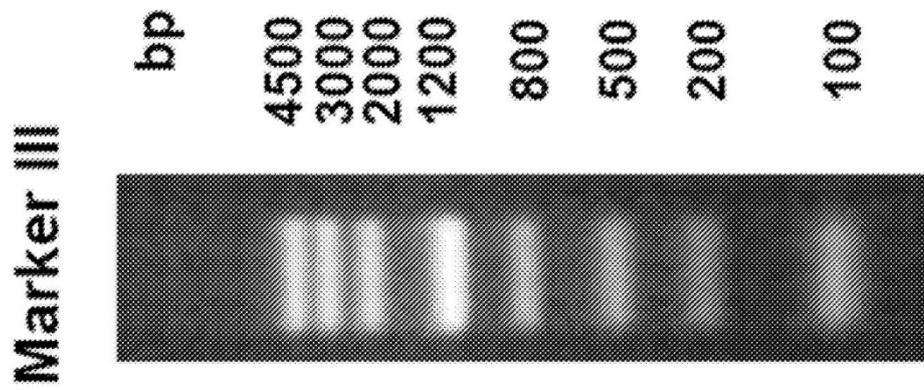


Fig. 6A

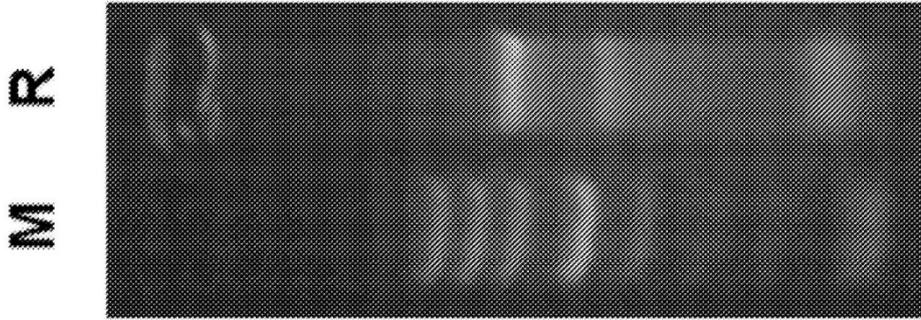


Fig. 6B

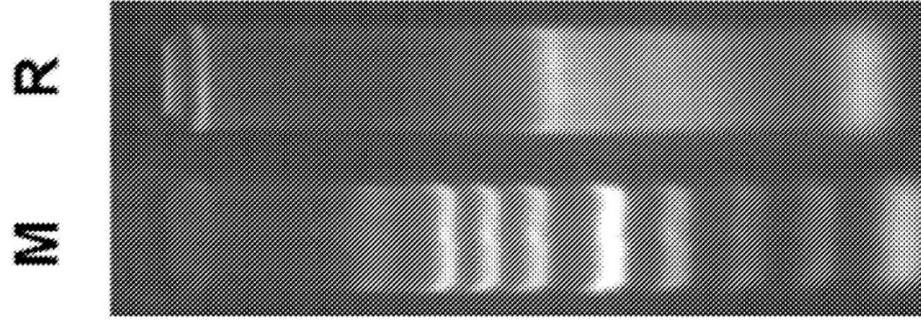


Fig. 6C

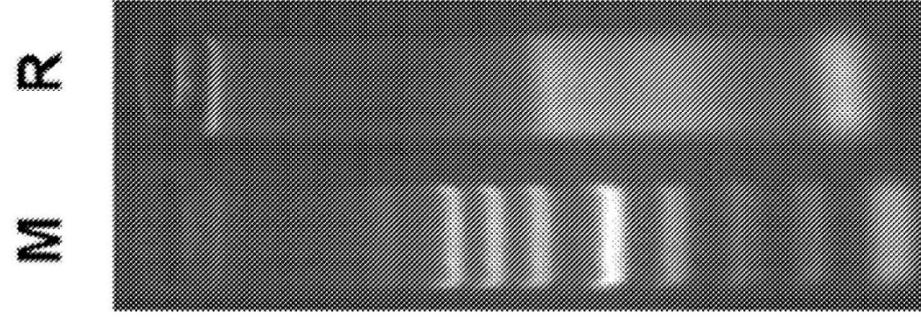
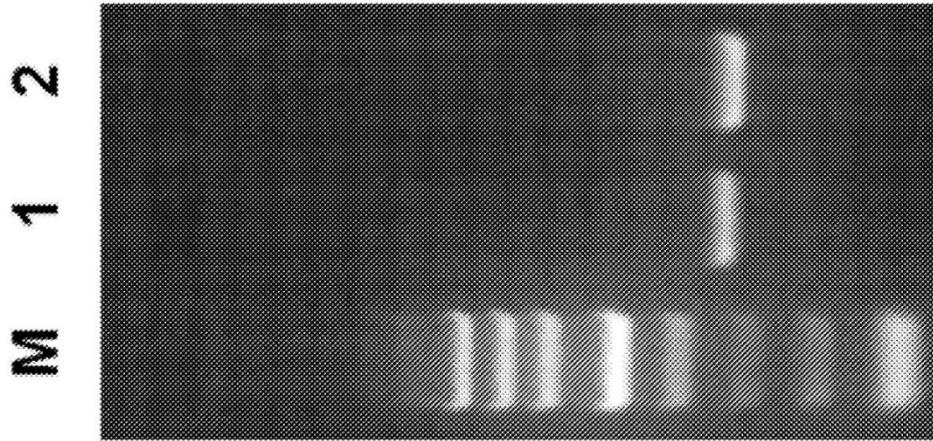
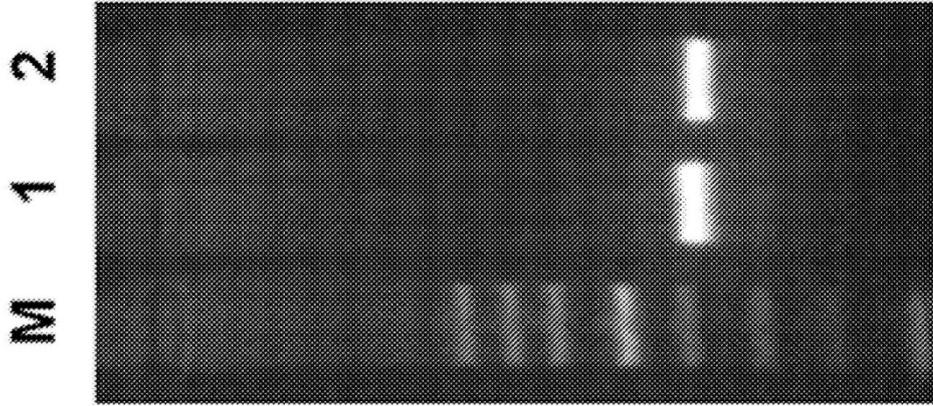


Fig. 6D



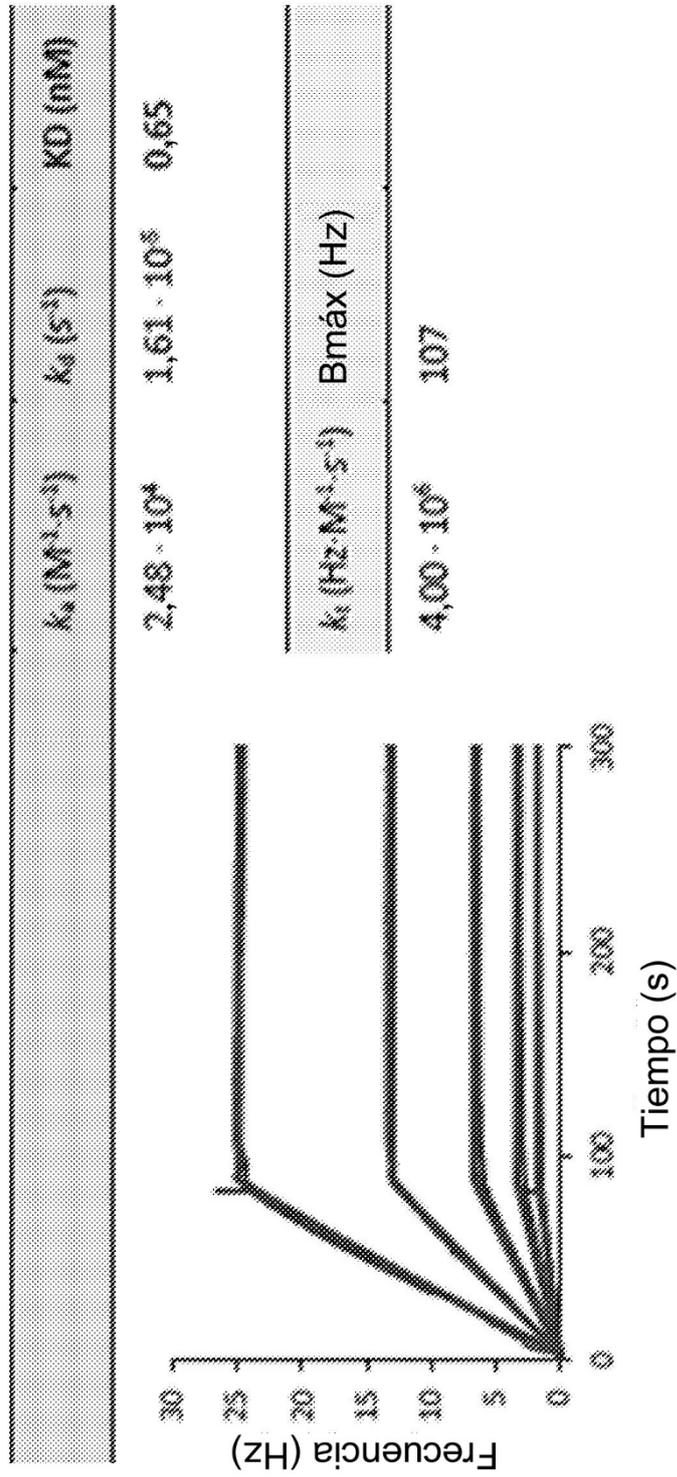


Fig. 8A

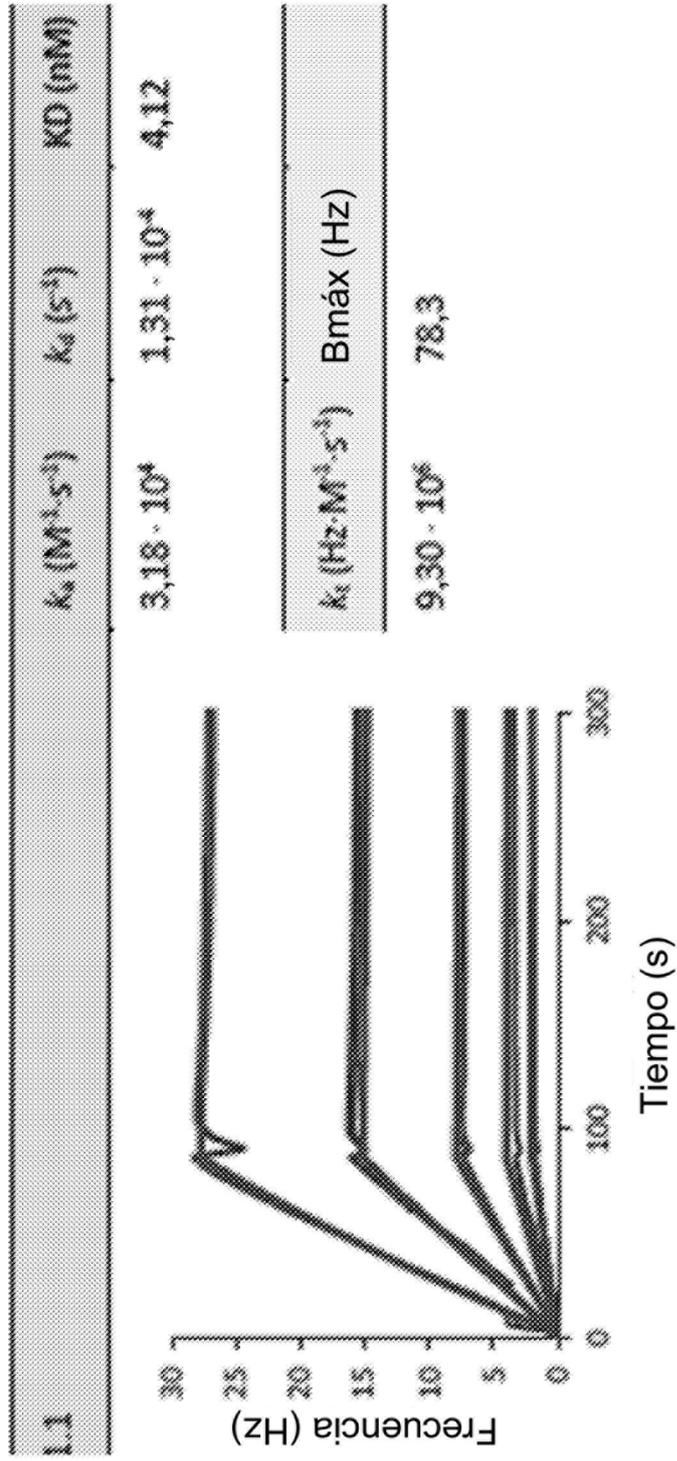


Fig. 8B