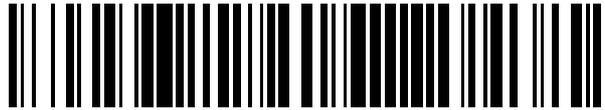


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 742 287**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.09.2013 PCT/EP2013/070127**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.04.2014 WO14049087**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2013 E 13776433 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2019 EP 2900263**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales contra el factor de diferenciación de crecimiento 15 (GDF-15)**

30 Prioridad:

26.09.2012 EP 12186185

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

13.02.2020

73 Titular/es:

**JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT
WÜRZBURG (100.0%)
Sanderring 2
97070 Würzburg, DE**

72 Inventor/es:

**WISCHHUSEN, JÖRG;
JUNKER, MARKUS;
MÜLLER, THOMAS y
SAREMBA, STEFAN**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

Observaciones:

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

ES 2 742 287 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos monoclonales contra el factor de diferenciación de crecimiento 15 (GDF-15)

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a nuevos anticuerpos monoclonales anti-GDF-15 humano, a composiciones farmacéuticas, a kits y a usos y a las líneas celulares capaces de producir los anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento. La presente invención se refiere además a nuevos anticuerpos contra GDF-15 humano capaces de inhibir el crecimiento del cáncer.

Antecedentes

Hasta la fecha, muchos cánceres son todavía áreas de necesidades médicas insatisfechas y, por consiguiente, significa que es necesario inhibir de manera más eficaz el crecimiento del cáncer, e inhibir el crecimiento del cáncer en una gama más amplia de cánceres.

Se sabe que muchos tipos de cáncer expresan factores de crecimiento, incluyendo factores tales como VEGF, PDGF, TGF- β y GDF-15.

El GDF-15, factor de diferenciación de crecimiento 15, es un miembro divergente de la superfamilia de TGF- β . Es una proteína que se expresa de manera intracelular como precursor, posteriormente se procesa y finalmente se secreta de la célula al entorno. Tanto la forma totalmente procesada (madura), activa como el precursor de GDF-15 pueden encontrarse fuera de las células. El precursor se une covalentemente a través de su secuencia de aminoácidos COOH-terminal a la matriz extracelular (Bauskin AR *et al.*, Cancer Research 2005) y, por tanto, reside en el exterior de una célula. La forma totalmente procesada (madura), activa de GDF-15 es soluble y se encuentra en los sueros sanguíneos. Por tanto, la forma procesada de GDF-15 puede actuar potencialmente sobre cualquier célula diana dentro del cuerpo que esté relacionada con la circulación sanguínea, siempre que la célula diana potencial exprese un receptor para el ligando de GDF-15 soluble.

Durante el embarazo, el GDF-15 se encuentra en condiciones fisiológicas en la placenta. Sin embargo, muchos cánceres malignos (especialmente cánceres agresivos del cerebro, melanoma, cáncer de pulmón, tumores gastrointestinales, cáncer de colon, cáncer de páncreas, cáncer de próstata y cáncer de mama (Mimeault M y Batra SK, J. Cell Physiol 2010)) presentan niveles aumentados de GDF-15 en el tumor así como en el suero sanguíneo. De la misma manera, se han descrito correlaciones entre una alta expresión de GDF-15 y quimioresistencia (Huang CY *et al.*, Clin. Cancer Res. 2009) y entre una alta expresión de GDF-15 y un mal pronóstico, respectivamente (Brown DA *et al.*, Clin. Cancer Res. 2009).

El GDF-15 se expresa en gliomas de diferente grados de la OMS evaluados mediante inmunohistoquímica (Roth *et al.*, Clin. Cancer Res. 2010). Además, Roth *et al.* expresaron de manera estable constructos de ADN que expresan ARN en horquilla cortos que seleccionan como diana GDF-15 endógeno o constructos de control en células de glioma SMA560. Cuando se usaron estas líneas celulares estables preestablecidas, observaron que se retrasó la formación de tumores en ratones que portaban células SMA560 de silenciamiento de GDF-15 en comparación con los ratones que portaban constructos de control.

Fairlie WD *et al.*, Biochemistry. 9 de enero de 2001; 40(1):65-73, divulgan anticuerpos monoclonales contra GDF-15 humano.

Las solicitudes de patente WO 2005/099746 y WO 2009/021293 se refieren a un anticuerpo anti-GDF-15 humano (Mab26) capaz de antagonizar los efectos del GDF-15 humano sobre la pérdida de peso inducida por tumores *in vivo* en ratones: en estos documentos, se les administró a ratones inmunológicamente deprimidos células tumorales humanas (células de carcinoma de próstata DU145) transfectadas con plásmidos que sobreexpresan GDF-15 humano. Las células tumorales que portan plásmidos que carecen de una secuencia de GDF-15 sirvieron como control negativo. Los ratones que expresan GDF-15 en xenoinjertos presentaron una pérdida de peso inducida por tumores (término clínico: caquexia) y anorexia. Una única administración intraperitoneal de 1 mg de Mab26 a partir del documento WO 2005/099746 dio como resultado una reversión completa de la pérdida de peso inducida por tumores. Los documentos WO 2005/099746 y WO 2009/021293 no divulgan efectos de un anticuerpo anti-GDF-15 humano sobre el crecimiento tumoral.

De manera similar, Johnen H *et al.* (Nature Medicine, 2007) notificaron los efectos de un anticuerpo monoclonal anti-GDF-15 humano sobre la pérdida de peso y anorexia inducidas por cáncer pero no observaron ningún efecto del anticuerpo anti-GDF-15 humano sobre el tamaño del tumor formado por el cáncer, ni siquiera cuando se administró el anticuerpo a una alta dosificación de 1 mg y, por tanto, el anticuerpo no inhibió el crecimiento del cáncer.

Por consiguiente, hasta la fecha, existía todavía una necesidad en la técnica de medios para inhibir de manera eficaz el crecimiento del cáncer, y de medios para inhibir el crecimiento del cáncer en una amplia gama de cánceres.

Por tanto, es un objeto de la invención obtener medios para inhibir de manera eficaz el crecimiento del cáncer, y medios que puedan usarse para inhibir el crecimiento del cáncer en una amplia gama de cánceres.

5 En un esfuerzo por encontrar nuevos medios para inhibir el crecimiento del cáncer, los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que un nuevo anticuerpo monoclonal contra GDF-15 humano puede inhibir el crecimiento del cáncer de tumores de xenoinjerto humanos en ratones.

10 De manera adicional, y al contrario que los anticuerpos terapéuticos conocidos en la técnica, un anticuerpo contra GDF-15 humano según la presente invención tiene una constante de disociación en equilibrio de aproximadamente 790 pM para GDF-15 recombinante incluso sin maduración de afinidad adicional, que es una mayor afinidad en comparación con los anticuerpos terapéuticos más conocidos.

15 Por tanto, el anticuerpo contra GDF-15 humano según la presente invención tiene propiedades superiores en comparación con los anticuerpos conocidos en la técnica, y es particularmente útil para inhibir el crecimiento del cáncer. Por consiguiente, se completó la presente invención.

Breve descripción de la invención

20 La presente invención resuelve los objetos anteriormente mencionados proporcionando los anticuerpos monoclonales, las composiciones farmacéuticas, los kits, los usos y las líneas celulares capaces de producir los anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento, tal como se define por las reivindicaciones adjuntas.

25 En particular, los presentes inventores mostraron sorprendentemente que nuevos anticuerpos monoclonales contra el GDF-15 humano y porciones de unión a antígeno de los mismos según la invención son capaces de inhibir el crecimiento del cáncer. Esto fue inesperado porque los anticuerpos monoclonales contra GDF-15 que se conocían previamente en la técnica (documentos WO 2005/099746, WO 2009/021293 y Johnen H *et al.*, Nature Medicine, 2007) se conocían por producir una reversión de la pérdida de peso inducida por cáncer (es decir una reversión de un síntoma secundario inducido por el GDF-15 expresado por el cáncer), pero no mostraron que pudieran inhibir el crecimiento del cáncer.

30 Mostrando que los nuevos anticuerpos monoclonales contra GDF-15 humano según la invención son capaces de inhibir el crecimiento del cáncer, los presentes inventores también muestran sorprendentemente que la proteína del GDF-15 humano puede seleccionarse como diana por los anticuerpos de la invención de manera que se inhiba el crecimiento del cáncer. Se espera que el mismo mecanismo de inhibición del crecimiento del cáncer sea aplicable a un gran número de cánceres que sobreexpresan GDF-15 humano incluyendo los cánceres enumerados a continuación.

35 Por tanto, la presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a GDF-15 humano, o una porción de unión a antígeno del mismo capaz de unirse a GDF-15 humano, tal como se define según la reivindicación 1.

40 La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo según la invención.

45 Además, la invención se refiere a un anticuerpo o a una porción de unión a antígeno del mismo o a una composición farmacéutica según la invención para su uso en un método para tratar el cáncer en un mamífero, comprendiendo el método administrar el anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo o la composición farmacéutica a dicho mamífero.

50 De manera adicional, la invención se refiere a un kit que comprende la composición farmacéutica según la invención.

55 La invención también se refiere a un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para el anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo según la invención.

Además, la invención se refiere a una línea celular capaz de producir un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo según la invención.

60 Por tanto, proporcionando nuevos anticuerpos monoclonales contra GDF-15 humano, la presente invención proporciona un nuevo inhibidor del crecimiento del cáncer que cumple con las necesidades anteriormente definidas en la técnica.

Breve descripción de los dibujos

65 Figura 1: expresión de NKG2D en linfocitos citotóxicos naturales después del tratamiento con o sin GDF-15. La expresión de superficie celular de NKG2D se determinó en linfocitos citotóxicos naturales después del tratamiento con

las citocinas indicadas en presencia o ausencia del anticuerpo anti-GDF-15 Acm B1-23. La figura presenta las intensidades de fluorescencia específicas determinadas mediante citometría de flujo, cuantificadas en relación a un anticuerpo de control no específico.

5 Figura 2: fosforilación de Akt en la línea celular de carcinoma de ovario SK-OV-3. Para cuantificar la inmunotransferencia de tipo Western para la línea celular de carcinoma de ovario SK-OV-3, se calculó la razón de Akt fosforilada con respecto a la cantidad total de Akt y se normalizó al control no tratado.

10 Figura 3: fosforilación de JNK1/2 en células inmunitarias. Para cuantificar la inmunotransferencia de tipo Western, se calculó la razón de JNK1/2 fosforilada con respecto a la cantidad total de JNK y se normalizó al control no tratado.

15 Figura 4: efecto antitumoral de B1-23 *in vivo*. Se usaron ratones desnudos Balb/c^{nu/nu} en un xenoinjerto que se ajustó con la línea celular de melanoma UACC-257. El tamaño del tumor de la cohorte de animales tratados con B1-23 (cuadrados blancos) se disminuyó significativamente, en comparación con el grupo de control de PBS (círculos sólidos rellenos). La significancia se definió como $p < 0,05$ tal como se evalúa mediante la prueba de logaritmo de los rangos de Wilcoxon.

Descripción detallada de la invención

20 La invención es tal como se define según las reivindicaciones adjuntas.

Definiciones

25 A menos que se defina lo contrario a continuación, los términos usados en la presente invención deberán entenderse de acuerdo con su significado común conocido por el experto en la técnica.

30 El término "anticuerpo" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier anticuerpo funcional que es capaz de unirse específicamente al antígeno de interés, tal como se explica generalmente en el capítulo 7 de Paul, W.E. (Ed.): *Fundamental Immunology* 2^a Ed. Raven Press, Ltd., Nueva York 1989. Sin limitación particular, el término "anticuerpo" abarca anticuerpos de cualquier especie de fuente apropiada, incluyendo gallina y mamíferos tales como ratón, cabra, primate no humano y humano. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. El anticuerpo es preferiblemente un anticuerpo monoclonal que puede prepararse mediante métodos bien conocidos en la técnica. El término "anticuerpo" abarca un anticuerpo de isotipo IgG-1, 2, 3 ó 4, IgE, IgA, IgM o IgD. El término "anticuerpo" abarca anticuerpos monoméricos (tales como IgD, IgE, IgG) o anticuerpos oligoméricos (tales como IgA o IgM). El término "anticuerpo" también abarca (sin limitaciones particulares) anticuerpos aislados y anticuerpos modificados, tales como anticuerpos transformados por ingeniería genética, por ejemplo anticuerpos quiméricos.

35 La nomenclatura de los dominios de anticuerpos sigue los términos tal como se conoce en la técnica. Cada monómero de un anticuerpo comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, tal como se conoce generalmente en la técnica. De éstas, cada cadena pesada y ligera comprende un dominio variable (denominado V_H para la cadena pesada y V_L para la cadena ligera) que es importante para la unión al antígeno. Estos dominios variables de cadena pesada y ligera comprenden (en un orden de extremo N-terminal a extremo C-terminal) las regiones FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4 (FR, región de entramado; CDR, región determinante de complementariedad, que también se conoce como región hipervariable). La identificación y asignación de las regiones de los anticuerpos anteriormente mencionadas dentro de la secuencia del anticuerpo es generalmente según Kabat *et al.* (*Sequences of proteins of immunological interest*, U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. 1983), o Chothia *et al.* (*Conformations of immunoglobulin hypervariable regions*. *Nature*. 21-28 de diciembre de 1989;342(6252):877-83.), o puede realizarse usando el software IMGT/V-QUEST descrito en Giudicelli *et al.* (IMGT/V-QUEST, an integrated software program for immunoglobuline and T cell receptor V-J and V-D-J rearrangement analysis. *Nucleic Acids Res.* 1 de julio de 40 2004;32(edición del servidor Web):W435-40.). Preferiblemente, las regiones de anticuerpos indicadas anteriormente se identifican y asignan usando el software IMGT/V-QUEST.

45 Un "anticuerpo monoclonal" es un anticuerpo de una población esencialmente homogénea de anticuerpos, en la que los anticuerpos son sustancialmente idénticos en secuencia (es decir, idénticos excepto por una fracción menor de anticuerpos que contiene modificaciones de secuencia que se producen de manera natural tales como modificaciones de aminoácidos en sus extremos terminales N y C). A diferencia de los anticuerpos policlonales que contienen una mezcla de diferentes anticuerpos dirigidos a numerosos epítopos, los anticuerpos monoclonales se dirigen al mismo epítipo y son, por tanto, muy específicos. El término "anticuerpo monoclonal" incluye (pero no se limita a) anticuerpos que se obtienen a partir de una población de células monoclonales derivadas de un solo clon celular, como por ejemplo los anticuerpos generados por el método del hibridoma descrito en Kohler y Milstein (*Nature*, 7 de agosto de 1975;256(5517):495-7) o Harlow y Lane (*"Antibodies: A Laboratory Manual"* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York 1988). Un anticuerpo monoclonal también puede obtenerse a partir de otros métodos adecuados, incluyendo técnicas de visualización de fagos tales como las descritas en Clackson *et al.* (*Nature*. 15 de agosto de 1991;352(6336):624-8) o Marks *et al.* (*J Mol Biol.* 5 de diciembre de 1991;222(3):581-97). Un anticuerpo monoclonal puede ser un anticuerpo que se ha optimizado para

propiedades de unión a antígeno tales como los valores de K_d disminuidos, cinéticas de asociación y disociación optimizadas mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los valores de K_d pueden optimizarse mediante métodos de visualización incluyendo visualización de fagos, dando como resultado anticuerpos monoclonales madurados por afinidad. El término “anticuerpo monoclonal” no se limita a las secuencias de anticuerpos de especies particulares de origen o a una sola especie de origen. Por tanto, el significado del término “anticuerpo monoclonal” abarca anticuerpos monoclonales quiméricos tales como anticuerpos monoclonales humanizados.

Los “anticuerpos humanizados” son anticuerpos que contienen secuencias humanas y una porción menor de secuencias no humanas que confieren especificidad de unión a un antígeno de interés (por ejemplo GDF-15 humano). Normalmente, los anticuerpos humanizados se generan reemplazando secuencias de regiones hipervariables de un anticuerpo aceptor humano mediante secuencias de regiones hipervariables de un anticuerpo donador no humano (por ejemplo, un anticuerpo donador de ratón, conejo, rata) que se une a un antígeno de interés (por ejemplo, GDF-15 humano). En algunos casos, las secuencias de regiones de entramado del anticuerpo aceptor también se reemplazan por las secuencias correspondientes del anticuerpo donador. Además de las secuencias derivadas de los anticuerpos donador y aceptor, un “anticuerpo humanizado” o bien puede contener otros (adicionales o sustitutos) residuos o secuencias o bien no. Tales otros residuos o secuencias pueden servir para mejorar adicionalmente las propiedades del anticuerpo tales como las propiedades de unión (por ejemplo, para disminuir los valores de K_d) y/o las propiedades inmunogénicas (por ejemplo, para disminuir la antigenicidad en humanos). Los ejemplos no limitativos de métodos para generar anticuerpos humanizados se conocen en la técnica, por ejemplo en Riechmann *et al.* (Nature. 24 de marzo de 1988;332 (6162) : 323-7) o Jones *et al.* (Nature. 29 de mayo-4 de junio de 1986;321(6069):522-5).

El término “anticuerpo humano” se refiere a un anticuerpo que contiene secuencias de dominios constantes y variables humanos. Esta definición abarca anticuerpos que tienen secuencias humanas que portan sustituciones o modificaciones de aminoácidos individuales que pueden servir para mejorar adicionalmente las propiedades del anticuerpo tales como las propiedades de unión (por ejemplo, para disminuir los valores de K_d) y/o las propiedades inmunogénicas (por ejemplo, para disminuir la antigenicidad en humanos). El término “anticuerpo humano” excluye anticuerpos humanizados en los que una porción de secuencias no humanas confiere especificidad de unión a un antígeno de interés.

Una “porción de unión a antígeno” de un anticuerpo, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una porción de un anticuerpo que retiene la capacidad del anticuerpo para unirse específicamente al antígeno (por ejemplo, GDF-15), es decir la “porción de unión a antígeno” es capaz de competir con el anticuerpo por la unión específica al antígeno. La “porción de unión a antígeno” puede contener uno o más fragmentos del anticuerpo. Sin limitación particular, puede producirse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica, incluyendo métodos y preparación de ADN recombinante mediante fragmentación química o enzimática de anticuerpos. Las porciones de unión a antígeno pueden ser fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), fragmentos F(ab')₂, anticuerpos de cadena sencilla (scFv), anticuerpos con un dominio único, diacuerpos o cualquier otra porción del anticuerpo que permita retener la unión al antígeno.

Un “anticuerpo” (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) o una “porción de unión a antígeno” puede haberse derivado o puede unirse a una molécula diferente. Por ejemplo, moléculas que pueden unirse al anticuerpo son otras proteínas (por ejemplo, otros anticuerpos), un marcador molecular (por ejemplo, una moléculacoloreada, luminiscente, fluorescente o radiactiva), un producto farmacéutico y/o un agente tóxico. El anticuerpo o la porción de unión a antígeno puede unirse directamente (por ejemplo, en forma de una fusión entre dos proteínas), o a través de una molécula ligadora (por ejemplo, cualquier tipo adecuado de ligador químico conocido en la técnica).

Tal como se usa en el presente documento, los términos “que se une” o “unirse” se refieren a la unión específica al antígeno de interés (por ejemplo, GDF-15 humano). Preferiblemente, el valor de K_d es de menos de 100 nM, más preferiblemente de menos de 50 nM, todavía más preferiblemente de menos de 10 nM, todavía más preferiblemente de menos de 5 nM y lo más preferiblemente de menos de 2 nM.

El término “epítipo”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una pequeña porción de un antígeno que forma el sitio de unión para un anticuerpo.

En el contexto de la presente invención, la unión o la unión competitiva de anticuerpos o sus porciones de unión a antígeno al antígeno de interés (por ejemplo, GDF-15 humano) se mide usando mediciones de resonancia de plasmón superficial como un ensayo de patrón de referencia, tal como se describe a continuación.

Los términos “K_D” o “valor de K_D” se refieren a la constante de disociación en equilibrio tal como se conoce en la técnica. En el contexto de la presente invención, estos términos se refieren a la constante de disociación en equilibrio de un anticuerpo con respecto a un antígeno particular de interés (por ejemplo, GDF-15 humano). La constante de disociación en equilibrio es una medida de la propensión de un complejo (por ejemplo, un complejo de antígeno-anticuerpo) para disociarse de manera reversible en sus componentes (por ejemplo, el antígeno y el anticuerpo). Para los anticuerpos según la invención, los valores de K_D (tal como aquellos para el antígeno GDF-15

humano) se determinan generalmente usando mediciones de resonancia de plasmón superficial tal como se describe a continuación.

El término “crecimiento del cáncer” tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier crecimiento medible del cáncer. Para cánceres que forman tumores sólidos, “crecimiento del cáncer” se refiere a un aumento medible en el volumen del tumor a lo largo del tiempo. Si el cáncer ha formado solo un único tumor, “crecimiento del cáncer” se refiere solo al aumento en volumen del único tumor. Si el cáncer ha formado múltiples tumores tales como metástasis, “crecimiento del cáncer” se refiere al aumento en volumen de todos los tumores medibles. Para tumores sólidos, el volumen del tumor puede medirse mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo formación de imágenes por resonancia magnética y tomografía computerizada (barrido de CT).

Para leucemias que se caracterizan por la presencia de células cancerosas del sistema sanguíneo en la sangre, “crecimiento del cáncer” se refiere a un aumento medible en el número de células cancerosas por volumen sanguíneo. Para llevar a cabo tales mediciones, pueden identificarse células cancerosas a partir de muestras de sangre usando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo mediciones de morfología celular, o tinción de proteínas marcadoras de células tumorales tales como proteínas de la superficie celular marcadoras de tumores, por ejemplo mediante tinción con anticuerpos específicos, y pueden contarse las células cancerosas.

Los términos tales como “que inhibe el crecimiento del cáncer”, tal como se usan en el presente documento, se refieren a una inhibición medible del crecimiento del cáncer en un paciente tratado con el anticuerpo. Preferiblemente, la inhibición es estadísticamente significativa. La inhibición del crecimiento del cáncer puede evaluarse comparando el crecimiento del cáncer en un grupo de pacientes tratados según la presente invención con respecto a un grupo de control de pacientes no tratados, o comparando un grupo de pacientes que reciben un tratamiento contra el cáncer habitual de la técnica más un tratamiento según la invención con un grupo de control de pacientes que solo reciben un tratamiento contra el cáncer habitual de la técnica. Tales estudios para evaluar la inhibición del crecimiento del cáncer se diseñan según normas aceptadas para estudios clínicos, por ejemplo estudios de doble ciego, aleatorizados con suficiente potencia estadística. El término “que inhibe el crecimiento del cáncer” incluye una inhibición del crecimiento del cáncer donde el crecimiento del cáncer se inhibe de manera parcial (es decir, donde el crecimiento del cáncer en el paciente se retrasa en comparación con el grupo de control de pacientes), una inhibición donde el crecimiento del cáncer se inhibe de manera completa (es decir, donde se detiene el crecimiento del cáncer en el paciente), y una inhibición donde se revierte el crecimiento del cáncer (es decir, el cáncer se reduce).

Un “anticuerpo aislado”, tal como se usa en el presente documento, es un anticuerpo que se ha identificado y separado de la mayoría de los componentes (en peso) de su entorno fuente, por ejemplo a partir de los componentes de un cultivo celular de hibridoma o un cultivo celular diferente que se usó para su producción (por ejemplo, células productoras tales como células CHO que expresan de manera recombinante el anticuerpo). La separación se realiza de manera tal que se eliminan suficientemente los componentes que de lo contrario pueden interferir con la idoneidad del anticuerpo para las aplicaciones deseadas (por ejemplo, con un uso terapéutico del anticuerpo anti-GDF-15 humano según la invención). Los métodos para preparar anticuerpos aislados se conocen en la técnica e incluyen cromatografía de afinidad con proteína A, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, filtración y ultrafiltración retentiva de virus. Preferiblemente, la preparación del anticuerpo aislado es al menos pura al 70% (p/p), más preferiblemente al menos pura al 80% (p/p), todavía más preferiblemente al menos pura al 90% (p/p), todavía más preferiblemente al menos pura al 95% (p/p), y lo más preferiblemente al menos pura al 99% (p/p), tal como se mide usando el ensayo de proteínas de Lowry.

Un “diacuerpo”, tal como se usa en el presente documento, es una pequeña porción de anticuerpo de unión a antígeno bivalente que comprende un dominio variable de cadena pesada unido a un dominio variable de cadena ligera en la misma cadena polipeptídica unida por un ligador peptídico que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Esto da como resultado el apareamiento con los dominios complementarios de otra cadena y el ensamblaje de una molécula dimérica con dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos pueden ser bivalentes y monoespecíficos (tales como diacuerpos con dos sitios de unión a antígeno para GDF-15 humano), o pueden ser bivalentes y biespecíficos (por ejemplo, diacuerpos con dos sitios de unión a antígeno, siendo uno un sitio de unión para GDF-15 humano, y siendo el otro un sitio de unión para un antígeno diferente). Una descripción detallada de los diacuerpos puede encontrarse en Holliger P *et al.* (“Diabodies”: small bivalent and bispecific antibody fragments.” Proc Natl Acad Sci EEUU. 15 de julio de 1993;90(14):6444-8.).

Un “anticuerpo con un solo dominio” (que también se denomina “Nanobody™”), tal como se usa en el presente documento, es un fragmento de anticuerpo que consiste en un único dominio de anticuerpo variable monomérico. Las estructuras de y los métodos para producir anticuerpos con un único dominio se conocen en la técnica, por ejemplo en Holt LJ *et al.* (“Domain antibodies: proteins for therapy.” Trends Biotechnol. Noviembre de 2003;21(11):484-90.), Saerens D *et al.* (“Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics.” Curr Opin Pharmacol. Octubre de 2008;8(5):600-8. Epub del 22 de agosto de 2008.), y Arbabi Ghahroudi M *et al.* (“Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies.” FEBS Lett. 15 de septiembre de 1997;414(3):521-6.).

El término “mayor”, tal como se usa en el presente documento, significa que un valor (por ejemplo, un nivel de GDF-15) en una muestra de un paciente es mayor que un valor en una muestra de control o grupo de muestras de control correspondiente. Preferiblemente, la diferencia es estadísticamente significativa.

5 El término “niveles de GDF-15 elevados”, tal como se usa en el presente documento, significa que el paciente humano tiene niveles mayores de GDF-15 en suero sanguíneo antes de la administración del anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo o de la composición farmacéutica según la invención, cuando se compara con la mediana de los niveles de GDF-15 en sueros sanguíneos de individuos humanos sanos de control como referencia.

10 Una referencia de mediana preferida para el nivel de GDF-15 en sueros sanguíneos de individuos humanos sanos de control es <0,8 ng/ml. El intervalo esperado es de entre 0,2 ng/ml y 1,2 ng/ml en controles humanos sanos (Referencia: Tanno T *et al.*: “Growth differentiation factor 15 in erythroid health and disease.” *Curr Opin Hematol.* Mayo de 2010; 17(3): 184-190.).

15 Preferiblemente, los niveles son 1,2 veces mayores, más preferiblemente 1,5 veces mayores, todavía más preferiblemente 2 veces mayores y lo más preferiblemente 5 veces mayores.

20 El término “antes de la administración”, tal como se usa en el presente documento, significa el periodo de tiempo inmediatamente antes de la administración del anticuerpo, del fragmento del mismo o de la composición farmacéutica según la invención. Preferiblemente, el término “antes de la administración” significa un periodo de 30 días inmediatamente antes de la administración; lo más preferiblemente un periodo de una semana inmediatamente antes de la administración.

25 Los términos “significativo”, “significativamente”, etc., tal como se usan en el presente documento, se refieren a una diferencia estadísticamente significativa entre valores.

30 Los términos “cáncer” y “célula cancerosa” se usan en el presente documento según su significado común en la técnica (véase por ejemplo, Weinberg R. *et al.*: *The Biology of Cancer*. Garland Science: Nueva York 2006. Pág. 850).

Según la presente invención, cada aparición del término “que comprende” puede sustituirse opcionalmente con el término “que consiste en”.

35 Métodos y técnicas

Generalmente, a menos que se defina lo contrario en el presente documento, los métodos usados en la presente invención (por ejemplo, métodos de clonación o métodos relacionados con anticuerpos) se realizan según procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo los procedimientos descritos en Sambrook *et al.* (“*Molecular Cloning: A Laboratory Manual.*”, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York 1989), Ausubel *et al.* (“*Current Protocols in Molecular Biology.*” Greene Publishing Associates and Wiley Interscience; Nueva York 1992), y Harlow y Lane (“*Antibodies: A Laboratory Manual*” Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York 1988).

45 La unión de anticuerpos monoclonales anti-GDF-15 humanos según la invención se evalúa generalmente empleando mediciones de resonancia de plasmón superficial usando un sistema Biorad ProteOn XPR36 y chips de sensores Biorad GLC, tal como se describe para anti-GDF-15 humano Acm-B1-23 en el ejemplo 1.

50 Las alineaciones de secuencia de secuencias según la invención se realizan usando el algoritmo BLAST (véase Altschul *et al.*(1990) “Basic local alignment search tool.” *Journal of Molecular Biology* 215. Págs. 403-410.; Altschul *et al.*: (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.). Preferiblemente, se usan los siguientes parámetros: 10 secuencias diana máximas; tamaño de palabra 3; matriz 62BLOSUM; 11 costes de hueco: existencia, extensión de 1; ajuste de matriz de puntuación composicional condicional. Por tanto, cuando se usan junto con secuencias, los términos tales como “identidad” o “idéntico” se refieren al valor de identidad obtenido usando el algoritmo BLAST.

55 Pueden producirse anticuerpos monoclonales según la invención mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, los métodos mencionados en Siegel DL (“*Recombinant monoclonal antibody technology.*” *Transfus Clin Biol.* Enero de 2002;9(1):15-22.). En una realización preferida, un anticuerpo según la invención se produce mediante la línea celular de hibridoma B1-23 depositada ante la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares GmbH (DSMZ) con el n.º de registro DSM ACC3142 según el Tratado de Budapest. El depósito se presentó el 29 de septiembre de 2011.

65 La proliferación celular puede medirse mediante métodos adecuados conocidos en la técnica, incluyendo (pero sin limitarse a) microscopía visual, ensayos metabólicos tales como los que miden el potencial redox mitocondrial (por ejemplo, el ensayo de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio); tinción con resazurina, que también se conoce como ensayo Alamar Blue®), tinción de biomarcadores de proliferación endógenos conocidos

(por ejemplo Ki-67) y métodos que miden la síntesis de ADN celular (por ejemplo, ensayos de incorporación de BrdU y [3H]-timidina).

La inmunosupresión puede medirse mediante métodos adecuados conocidos en la técnica, que incluyen (pero sin limitarse a) proliferación de células inmunitarias, secreción de citocinas, tinción de citocinas intracelulares mediante citometría de flujo, medición de citocinas mediante qTA-PCR, lisis de células diana redirigidas, citotoxicidad adicional o ensayos de desgranulación, regulación reductora de la activación de receptores de células inmunitarias (como NKG2D), regulación por incremento de receptores inhibidores de células inmunitarias, formación de sinapsis inmunológica, infiltración de células inmunitarias. Para que se aplique el término inmunosupresión, debe poder medirse un efecto en al menos uno de estos o en cualquier otro ensayo adecuado. La falta de efecto en una prueba específica no implica una ausencia general de inmunosupresión.

Los niveles de GDF-15 humano pueden medirse mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo las mediciones de los niveles de ARNm de GDF-15 mediante métodos que incluyen (pero sin limitarse a) PCR cuantitativa en tiempo real (qTA-PCR) para ARNm de GDF-15 humano usando cebadores específicos para hibridación *in situ* de ARNm de GDF-15 humano con sondas específicas para GDF-15 humano, métodos de secuenciación profunda de ARNm; e incluyendo mediciones de los niveles de proteína GDF-15 mediante métodos que incluyen (pero no se limitan a) espectrometría de masas para proteínas o péptidos derivados de GDF-15 humano, inmunotransferencia de tipo Western usando anticuerpos específicos contra GDF-15 humano, citometría de flujo usando anticuerpos específicos contra GDF-15 humano, pruebas de tira usando anticuerpos específicos contra GDF-15 humano, o inmunocitoquímica usando anticuerpos específicos contra GDF-15 humano. Para tales métodos que usan anticuerpos específicos contra GDF-15 humano, se prefieren los anticuerpos anti-GDF-15 humanos de la presente invención, y el anticuerpo de la invención producido por la línea celular de hibridoma B1-23 depositada ante la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares GmbH (DSMZ) con el n.º de registro DSM ACC3142 es el más preferido.

Realizaciones de la invención

Tal como se describe anteriormente, los inventores demuestran que la proteína del GDF-15 humano puede seleccionarse como diana por un anticuerpo de la invención de manera que se inhibe el crecimiento del cáncer.

Esto es un hallazgo sorprendente en vista de la técnica que enseña que solo la pérdida de peso inducida por cáncer puede revertirse por anticuerpos anti-GDF-15, y que el crecimiento del cáncer no puede inhibirse (documentos WO 2005/099746, WO 2009/021293 y Johnen H *et al.*, Nature Medicine, 2007).

Cuando se tiene en cuenta la presente invención, resulta evidente que los anticuerpos anti-GDF-15 conocidos de los documentos WO 2005/099746, WO 2009/021293 y Johnen H *et al.*, Nature Medicine, 2007, solo inhiben uno de los efectos del GDF-15 humano (es decir, la pérdida de peso inducida por cáncer), pero no pueden inhibir otros efectos del GDF-15 humano tales como los relacionados con el crecimiento del cáncer. En vista de la presente invención, una posible explicación para este fallo es que los anticuerpos conocidos de los documentos anteriores solo pueden interferir con el transporte de GDF-15 humano a través de la barrera hematoencefálica (formando un gran complejo que no puede transportarse a través de la barrera hematoencefálica), pero son incapaces de unirse al GDF-15 humano de una manera que generalmente lo hacen incapaz de interactuar con su receptor (por ejemplo, un receptor que reside en las células fuera del cerebro).

Se espera que las siguientes propiedades de los anticuerpos de la presente invención contribuyan a su capacidad de inhibir los efectos del GDF-15 humano más completamente, incluida la inhibición del crecimiento del cáncer:

Amplia especificidad de unión a las formas del GDF-15 humano

Los anticuerpos de la presente invención son capaces de unirse al GDF-15 humano recombinante maduro (representado por SEQ ID NO: 8) y, por tanto, son capaces de unirse al GDF-15 humano completamente procesado (maduro) y activo.

Además, realizando experimentos de tinción con el anticuerpo Acm-B1-23 según la invención en células humanas, los inventores muestran que el anticuerpo Acm-B1-23 según la invención es capaz de unirse al precursor de GDF-15 humano en células humanas.

Por tanto, se espera que la unión y los efectos de los anticuerpos de la presente invención (por ejemplo, la inhibición del crecimiento del cáncer) no se limiten a los efectos sobre una forma particular de GDF-15 humano.

Alta afinidad de unión

Los anticuerpos y las porciones de unión a antígeno de los mismos según la invención tienen una alta afinidad de unión, tal como lo demuestra el anticuerpo Acm-B1-23, según la invención, que tiene una constante de disociación en equilibrio de aproximadamente 790 pM para el GDF-15 humano recombinante. De manera notable, tales valores

de afinidad son superiores a la mayoría de los anticuerpos terapéuticos existentes, por ejemplo al anticuerpo terapéutico rituximab que tiene una constante de disociación en equilibrio de aproximadamente 8 nM.

5 La alta afinidad de unión asegurará que el anticuerpo contra el GDF-15 humano según la invención se una de manera estable al GDF-15 humano, de manera que los efectos del GDF-15 humano, incluyendo los efectos sobre el crecimiento del cáncer, se inhiben de manera eficaz.

Unión a un epítipo discontinuo o conformacional

10 Los anticuerpos y porciones de unión a antígeno de los mismos según la invención se unen a un epítipo discontinuo o conformacional, tal como se demuestra a continuación para el anticuerpo AcM-B1-23 según la invención.

15 La unión de anticuerpos y porciones de unión a antígeno de los mismos según la invención a un epítipo GDF-15 discontinuo o conformacional puede ayudar a mantener el GDF-15 humano en una conformación específica y contribuir de ese modo a la inhibición eficaz de los efectos del GDF-15 humano, incluyendo los efectos sobre el crecimiento del cáncer.

Por tanto, la invención se refiere a las siguientes realizaciones:

20 A) Anticuerpos, vectores y líneas celulares

25 Concretamente, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal capaz de unirse al GDF-15 humano, o a una porción de unión al antígeno del mismo capaz de unirse al GDF-15 humano, en el que el dominio variable de cadena pesada comprende una región CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 90% a la misma, y en el que el dominio variable de cadena ligera comprende una región CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 85% a la misma, tal como se define según la reivindicación 1.

30 También se describe en el presente documento un anticuerpo monoclonal capaz de unirse al GDF-15 humano, o una porción de unión al antígeno del mismo, en el que el dominio variable de cadena pesada comprende una región CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o una secuencia de aminoácidos que difiere en no más de un aminoácido de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, y en el que el dominio variable de cadena ligera comprende una región CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o una secuencia de aminoácidos o una secuencia de aminoácidos que difiere en no más de un aminoácido de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

35 En todavía otra realización según las anteriores realizaciones, el dominio variable de cadena pesada comprende una región que comprende una región FR1, una CDR1, una FR2, una CDR2 y una FR3, y que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o una secuencia idéntica en el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% a la misma, y el dominio variable de cadena ligera comprende una región que comprende una región FR1, una CDR1, una FR2, una CDR2 y una FR3, y que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o una secuencia idéntica en el 85%, el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% a la misma.

45 En una realización preferida según las realizaciones anteriores, el dominio variable de cadena pesada comprende una región que comprende una región FR1, una CDR1, una FR2, una CDR2 y una FR3, y que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o una secuencia idéntica en el 95% a la misma, y el dominio variable de cadena ligera comprende una región que comprende una región FR1, una CDR1, una FR2, una CDR2 y una FR3, y que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o una secuencia idéntica en el 95% a la misma.

50 En una realización más preferida según las realizaciones anteriores, el dominio variable de cadena pesada comprende una región que comprende una región FR1, una CDR1, una FR2, una CDR2 y una FR3, y que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o una secuencia idéntica en el 98% a la misma, y el dominio variable de cadena ligera comprende una región que comprende una región FR1, una CDR1, una FR2, una CDR2 y una FR3, y que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o una secuencia idéntica en el 98% a la misma.

55 En una realización todavía más preferida según las realizaciones anteriores, el dominio variable de cadena pesada comprende una región que comprende una región FR1, una CDR1, una FR2, una CDR2 y una FR3, y que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y el dominio variable de cadena ligera comprende una región que comprende una región FR1, una CDR1, una FR2, una CDR2 y una FR3, y que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

60 La divulgación también se refiere a un anticuerpo monoclonal capaz de unirse al GDF-15 humano, o una porción de unión al antígeno del mismo, en el que el dominio variable de cadena pesada comprende una región CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 y una región CDR2 que comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 4, y en el que el dominio variable de cadena ligera comprende una región CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y una región CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7. En un aspecto preferido, el anticuerpo puede tener secuencias de CDR3 tal como se define en cualquiera de las realizaciones de la invención descritas anteriormente.

5 La divulgación también se refiere a un anticuerpo monoclonal capaz de unirse al GDF-15 humano, o a una porción de unión a antígeno del mismo, en el que el anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo es capaz de inhibir el crecimiento del cáncer en un mamífero, preferiblemente un paciente humano.

10 Según el párrafo anterior, la divulgación puede referirse a una porción de unión a antígeno capaz de unirse a GDF-15 humano, en la que la porción de unión a antígeno es un anticuerpo con un único dominio (también denominado "Nanobody™"). En un aspecto, el anticuerpo con un único dominio comprende las secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, respectivamente. En otro aspecto, el anticuerpo con un único dominio comprende las secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 7, respectivamente. En un aspecto preferido, el anticuerpo con un único dominio es un anticuerpo humanizado.

20 Preferiblemente, los anticuerpos de la invención capaces de unirse al GDF-15 humano o las porciones de unión al antígeno del mismo tienen una constante de disociación en equilibrio para el GDF-15 humano que es igual o menor de 100 nM, menor de 20 nM, preferiblemente menor de 10 nM, más preferiblemente menos de 5 nM y lo más preferiblemente entre 0,1 nM y 2 nM, siempre que la constante de disociación en equilibrio esté de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

25 También se divulga en el presente documento un anticuerpo capaz de unirse al GDF-15 humano o una porción de unión al antígeno del mismo que se une al mismo epítipo de GDF-15 humano como el anticuerpo al GDF-15 humano, que puede obtenerse a partir de la línea celular B1-23 depositada ante la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares GmbH (DMSZ) con el n.º de registro DSM ACC3142. Tal como se describe en el presente documento, la unión del anticuerpo al GDF-15 humano, según la presente invención, se evalúa mediante mediciones de resonancia de plasmón superficial como un método de patrón de referencia, según los procedimientos descritos en el ejemplo 1. La unión al mismo epítipo en GDF-15 humano puede evaluarse de manera similar mediante experimentos de unión competitiva de resonancia de plasmón superficial del anticuerpo contra GDF-15 humano que puede obtenerse a partir de la línea celular B1-23 y el anticuerpo que se espera que se una al mismo epítipo de GDF-15 humano que el anticuerpo contra GDF-15 humano que puede obtenerse de la línea celular B1-23.

35 En una realización muy preferida, el anticuerpo de la invención es el anticuerpo monoclonal capaz de unirse al GDF-15 humano que puede obtenerse a partir de la línea celular B1-23 depositada ante la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares GmbH (DMSZ) con el n.º de registro DSM ACC3142 o una porción de unión a antígeno del mismo.

40 En una realización preferida, el anticuerpo capaz de unirse al GDF-15 humano o la porción de unión al antígeno del mismo según la invención es un anticuerpo monoclonal humanizado o una porción de unión al antígeno del mismo. Para cualquier secuencia de anticuerpo no humano dada según la invención (es decir, una secuencia de anticuerpo donador), pueden generarse anticuerpos anti-GDF-15 humanos monoclonales humanizados de la invención o porciones de unión a antígeno de los mismos según técnicas conocidas en la técnica, tal como se describe anteriormente.

50 En una realización muy preferida, el anticuerpo monoclonal capaz de unirse al GDF-15 humano o la porción de unión al antígeno del mismo es un anticuerpo humanizado derivado del anticuerpo monoclonal capaz de unirse al GDF-15 humano que puede obtenerse a partir de la línea celular B1-23 depositada ante la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares GmbH (DMSZ) con el n.º de registro DSM ACC3142, o una porción de unión a antígeno del mismo, siempre que el anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo esté de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

55 La presente invención también se refiere a un anticuerpo monoclonal capaz de unirse al GDF-15 humano, o una porción de unión al antígeno del mismo capaz de unirse al GDF-15 humano, en el que la unión se une a un epítipo conformacional o discontinuo en el GDF-15 humano que se compone de las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26, tal como se define según las reivindicaciones adjuntas. En un aspecto preferido de esta realización, el anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo, tal como se define en una cualquiera de las realizaciones anteriores.

60 En otra realización de la invención según las realizaciones anteriores, el anticuerpo capaz de unirse al GDF-15 humano o la porción de unión al antígeno del mismo es un diacuerpo. En un aspecto de esta realización, el diacuerpo es bivalente y mono-específico, con dos sitios de unión a antígeno idénticos para GDF-15 humano. En un segundo aspecto alternativo de esta realización, el diacuerpo es bivalente y biespecífico, con un sitio de unión a antígeno que es un sitio de unión para GDF-15 humano, y el otro sitio de unión a antígeno es un sitio de unión para

un antígeno diferente. Los ejemplos no limitativos para los diferentes antígenos según este segundo aspecto de esta realización son i) antígenos de la superficie celular que se coexpresan con GDF-15 a niveles altos en el mismo cáncer (por ejemplo, a niveles mayores en comparación con una muestra de control del mismo paciente obtenida de una parte no cancerosa del tejido que es el tejido de origen del cáncer) y ii) antígenos de superficie celular en células del sistema inmunitario que se conocen como antígenos útiles para el reclutamiento de células del sistema inmunitario al tumor.

En todavía otra realización de la invención según las realizaciones anteriores, el anticuerpo capaz de unirse al GDF-15 humano o la porción de unión al antígeno del mismo se unen a un fármaco. En aspectos no limitativos de esta realización, el fármaco puede ser un agente anticancerígeno y/o una molécula inmunoestimuladora conocidos. Los agentes anticancerígenos conocidos incluyen agentes alquilantes tales como cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, mecloretamina, ciclofosfamida, clorambucilo e ifosfamida; antimetabolitos tales como azatioprina y mercaptopurina; alcaloides tales como alcaloides de la vinca (por ejemplo, vincristina, vinblastina, vinorelbina y vindesina), taxanos (por ejemplo, paclitaxel, docetaxel), etopósido y tenipósido; inhibidores de topoisomerasa tales como camptotecinas (por ejemplo, irinotecán y topotecán); antibióticos citotóxicos como actinomicina, antraciclina, doxorubicina, daunorrubicina, valrubicina, idarrubicina, epirubicina, bleomicina, plicamicina y mitomicina; y radioisótopos. Se espera que la unión de los anticuerpos o las porciones de unión a antígeno de los mismos de la invención a los agentes anticancerígenos dé como resultado una inhibición más fuerte del crecimiento tumoral del cáncer en comparación con el anticuerpo sin el agente anticancerígeno, debido a que el conjugado resultante se acumulará en el sitio del tumor debido la presencia de GDF-15 en el tumor, lo que conduce a la acumulación del agente anticancerígeno en el sitio del tumor y a los efectos mejorados del agente anticancerígeno en el tumor.

En una realización adicional según las realizaciones anteriores, el anticuerpo capaz de unirse al GDF-15 humano o la porción de unión al antígeno del mismo se modifica mediante una etiqueta de aminoácido. Los ejemplos no limitativos de tales etiquetas incluyen etiquetas de polihistidina (His-), etiqueta FLAG, etiqueta de hemaglutinina (HA), etiqueta de glicoproteína D (gD) y etiqueta c-myc. Las etiquetas pueden usarse para diversos propósitos. Por ejemplo, pueden usarse para ayudar a la purificación del anticuerpo capaz de unirse al GDF-15 humano o la porción de unión al antígeno del mismo, o pueden usarse para la detección del anticuerpo o la porción de unión al antígeno del mismo (por ejemplo, cuando se usa en ensayos de diagnóstico). Preferiblemente, tales etiquetas están presentes en el extremo C-terminal o el extremo N-terminal del anticuerpo capaz de unirse al GDF-15 humano o la porción de unión al antígeno del mismo.

En la presente invención, el anticuerpo capaz de unirse al GDF-15 humano o la porción de unión al antígeno del mismo es capaz de inhibir el crecimiento del cáncer en un mamífero, preferiblemente un paciente humano.

En otra realización preferida de la presente invención según las realizaciones anteriores, el GDF-15 humano es GDF-15 humano recombinante que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 8.

En todavía otra realización preferida de la presente invención según las realizaciones anteriores, la unión del anticuerpo capaz de unirse al GDF-15 humano o la porción de unión a antígeno del mismo es una unión a un epítipo discontinuo o conformacional en el GDF-15 humano.

Preferiblemente, los anticuerpos monoclonales de la presente invención capaces de unirse al GDF-15 humano o las porciones de unión a antígeno de los mismos son anticuerpos aislados.

La invención también se refiere a un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para el anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo de la invención, tal como se definió anteriormente.

Además, la presente invención también proporciona una línea celular capaz de producir un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo según la presente invención.

En una realización, la línea celular puede derivarse de cualquier línea celular que se conoce en esta técnica y es adecuada para la producción de anticuerpos o porciones de unión a antígeno de los mismos.

En una realización preferida, la línea celular es la línea celular B1-23 depositada ante la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares GmbH (DMSZ) con el n.º de registro DSM ACC3142.

En otra realización preferida, la línea celular contiene un vector de expresión según la invención, tal como se definió anteriormente.

B) Composiciones farmacéuticas

En una realización adicional, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los anticuerpos o las porciones de unión a antígeno de los mismos de la invención, tal como se definió anteriormente.

Las composiciones farmacéuticas según la presente invención se preparan según normas conocidas para la preparación de composiciones farmacéuticas que contienen anticuerpos y porciones de los mismos.

5 Por ejemplo, las composiciones se preparan de una manera que puedan almacenarse y administrarse de manera apropiada, por ejemplo usando componentes farmacéuticamente aceptables tales como portadores, excipientes o estabilizadores.

10 Tales componentes farmacéuticamente aceptables no son tóxicos en las cantidades usadas cuando se administra la composición farmacéutica a un paciente. Los componentes farmacéuticamente aceptables añadidos a las composiciones farmacéuticas pueden depender del uso previsto particular de las composiciones farmacéuticas y la vía de administración.

15 En general, los componentes farmacéuticamente aceptables usados junto con la presente invención según el conocimiento disponible en la técnica, por ejemplo en Remington's Pharmaceutical Sciences, Ed. AR Gennaro, 20ª edición, 2000, Williams & Wilkins, PA, EE.UU.

C) Métodos y productos terapéuticos para su uso en estos métodos

20 La presente divulgación se refiere además a un método para tratar un cáncer en un mamífero, comprendiendo el método administrar un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo tal como se definió anteriormente, o una composición farmacéutica tal como se definió anteriormente a dicho mamífero. Alternativamente, la presente invención se refiere a un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo de la invención tal como se definió anteriormente, o a una composición farmacéutica de la invención tal como se definió anteriormente para usar en estos métodos. En un aspecto muy preferido de estas realizaciones, el mamífero es un paciente humano.

25 Todos los métodos para tratar un cáncer a los que se hace referencia en el presente documento excluyen un tratamiento de pérdida de peso inducida por cáncer de acuerdo con el documento WO 2005/099746, WO 2009/021293 y Johnen H *et al.*, Nature Medicine, 2007. Esto refleja el hecho de que de acuerdo con estas enseñanzas de la técnica, solo la pérdida de peso inducida por el cáncer puede revertirse por los anticuerpos anti-GDF-15, y que el crecimiento del cáncer no puede inhibirse.

30 Cuando se tiene en cuenta la presente invención, resulta evidente que los anticuerpos anti-GDF-15 conocidos de los documentos WO 2005/099746, WO 2009/021293 y Johnen H *et al.*, Nature Medicine, 2007 solo inhiben uno de los efectos del GDF-15 humano (es decir, pérdida de peso inducida por cáncer), pero no pueden inhibir otros efectos del GDF-15 humano tal como lo relacionados con el crecimiento del cáncer.

35 La inhibición del crecimiento del cáncer según la presente invención no excluye los beneficios terapéuticos adicionales o secundarios que también se producen en los pacientes. Por ejemplo, un beneficio adicional o secundario puede ser una influencia en la pérdida de peso inducida por cáncer. Sin embargo, se entiende que el tratamiento primario para el que se busca protección es para inhibir el crecimiento del cáncer, cualquier efecto secundario o adicional solo refleja ventajas opcionales adicionales del tratamiento del crecimiento del cáncer.

40 En una realización preferida de los anticuerpos, las porciones de unión a antígeno de los mismos o las composiciones farmacéuticas para su uso en los métodos anteriores, el paciente humano tiene niveles elevados de GDF-15 en suero sanguíneo antes de la administración. En un subgrupo de pacientes que tiene niveles elevados de GDF-15 en suero sanguíneo, se espera que los métodos de tratamiento, a los que se hace referencia en el presente documento, sean particularmente eficaces para inhibir el crecimiento del cáncer. En el aspecto más preferido, los niveles de GDF-15 son niveles de proteína GDF-15 medidos usando el anticuerpo según la invención que puede obtenerse a partir de la línea celular de hibridoma B1-23 depositada ante la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares GmbH (DSMZ) con el n.º de registro DSM ACC3142, preferiblemente medido mediante inmunoquímica.

45 En otra realización de los anticuerpos, las porciones de unión a antígeno de los mismos o las composiciones farmacéuticas para su uso en los métodos anteriores, el anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo es el único principio farmacéuticamente activo contra el cáncer usado en el método.

50 En una realización alternativa de los anticuerpos, las porciones de unión a antígeno de los mismos o las composiciones farmacéuticas para su uso en los métodos anteriores, el anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo se usan en combinación con uno o más principios farmacéuticamente activos adicionales contra el cáncer. En un aspecto de esta realización, el uno o más principios farmacéuticamente activos adicionales contra el cáncer es un agente anticancerígeno y/o una molécula inmunoestimuladora conocidos, tal como se definió anteriormente.

55 En una realización preferida de los anticuerpos, las porciones de unión a antígeno de los mismos o las composiciones farmacéuticas para su uso en los métodos anteriores, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cánceres del cerebro incluyendo glioma, cánceres del sistema nervioso, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de

cavidad oral y labio, carcinoma hepático, leucemia, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, cáncer de cuerpo uterino, cáncer de testículo, cáncer de tiroides, cáncer de riñón, cáncer de vesícula biliar, mieloma múltiple, cáncer de nasofaringe, cáncer de laringe, cáncer de faringe, cáncer de esófago, tumores gastrointestinales que incluyen cáncer de estómago y colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, 5 cáncer de ovario y cáncer de mama, preferiblemente del grupo que consiste en melanoma, cáncer de próstata, cáncer de mama, cánceres del cerebro incluyendo glioma, cáncer colorrectal, cáncer de estómago, cáncer de esófago y cáncer de ovario, y lo más preferiblemente es melanoma. En una realización, el cáncer se selecciona del grupo anterior, que comprende además cáncer de endometrio, tal como carcinoma de endometrio, cáncer de mama incluyendo subtipos de cáncer de mama, en particular cáncer de mama triple negativo y cáncer de vejiga tal como carcinoma de células uroteliales.

En otra realización preferida de los anticuerpos, las porciones de unión a antígeno de los mismos o las composiciones farmacéuticas para su uso en los métodos anteriores, el tumor o los tumores formados por el cáncer tienen niveles mayores de GDF-15 humano antes de la administración en comparación con una muestra de control del mismo paciente obtenido de una parte no cancerosa del tejido que es el tejido de origen del cáncer, preferiblemente niveles 1,2 veces mayores, más preferiblemente niveles 1,5 veces mayores, todavía más preferiblemente niveles 2 veces mayores y lo más preferiblemente niveles 5 veces mayores. En un subgrupo de pacientes que tienen niveles más altos de GDF-15 en el tumor o los tumores formados por el cáncer en comparación con la muestra de control anterior, se espera que los métodos de tratamiento a los que se hace referencia en el presente documento sean particularmente eficaces para inhibir el crecimiento del cáncer.

En una realización muy preferida de los anticuerpos, las porciones de unión a antígeno de los mismos o las composiciones farmacéuticas para su uso en los métodos anteriores, el método comprende la inhibición del crecimiento del cáncer. En un aspecto preferido de esta realización, se detiene el crecimiento del cáncer. En un aspecto más preferido, el cáncer se reduce.

En una realización preferida de los anticuerpos, las porciones de unión a antígeno de los mismos o las composiciones farmacéuticas para su uso en los métodos anteriores, el método comprende la inducción de la destrucción de células cancerosas mediante linfocitos citolíticos naturales y células T CD8+ en el paciente humano. Debido a su capacidad de prevención de la regulación por disminución mediada por GDF-15 del conocido regulador de vigilancia inmunitaria NKG2D, se espera que los anticuerpos o las porciones de unión a antígeno de los mismos según la invención restablezcan la vigilancia inmunitaria e induzcan la destrucción de células cancerosas por las linfocitos citolíticos naturales y las células T CD8+, además de los efectos de los anticuerpos o las porciones de unión a antígeno de los mismos que son independientes del sistema inmunitario.

D) Kits

La presente invención también proporciona kits que comprenden las composiciones farmacéuticas de la invención definidas anteriormente.

En una realización, los kits son kits para su uso tal como se define en la reivindicación 16.

La presente divulgación también proporciona un kit diagnóstico que comprende cualquiera de los anticuerpos o las porciones de unión a antígeno de los mismos según la invención.

El kit diagnóstico puede usarse para detectar si el tumor o tumores de un paciente con cáncer formado(s) por el cáncer tiene(n) niveles mayores de GDF-15 humano en comparación con la muestra de control del mismo paciente obtenida de una parte no cancerosa del tejido que es el tejido de origen del cáncer.

El kit diagnóstico también puede usarse para detectar si un paciente humano con cáncer tiene niveles elevados de GDF-15 en suero sanguíneo.

E) Secuencias

Las secuencias de aminoácidos a las que se hace referencia en la presente solicitud son las siguientes (en un orden de extremo N-terminal a extremo C-terminal; representadas en el código de aminoácidos de una letra):

SEQ ID NO: 1 (región del dominio variable de cadena pesada que comprende una región FR1, una CDR1, una FR2, una CDR2 y una FR3 de la secuencia de polipéptido de anti-GDF-15 humano monoclonal Acm-B1-23):

**QVKLQQSGPGILQSSQTLSTLCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKRY
NPTLKSRLTISKDPSRNQVFLKITSVDTADTATYYC**

SEQ ID NO: 2 (región de la dominio variable de cadena ligera que comprende una región FR1, una CDR1, una FR2,

ES 2 742 287 T3

una CDR2 y una FR3 de la secuencia de polipéptido de anti-GDF-15 humano monoclonal Acm-B1-23):

DIVLTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWFLOKPGQSPKALIYSASYRYSQVDPDR
FTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFC

5 SEQ ID NO: 3 (secuencia peptídica de la región CDR1 de cadena pesada de anti-GDF-15 humano monoclonal Acm-B1-23):

GFSLSTSGMG

10 SEQ ID NO: 4 (secuencia peptídica de la región CDR2 de cadena pesada de anti-GDF-15 humano monoclonal Acm-B1-23):

IYWDDDK

15 SEQ ID NO: 5 (secuencia peptídica de la región CDR3 de cadena pesada de anti-GDF-15 humano monoclonal Acm-B1-23):

ARSSYGAMDY

20 SEQ ID NO: 6 (secuencia peptídica de la región CDR1 de cadena ligera de anti-GDF-15 humano monoclonal Acm-B1-23):

QNVGTN

25 Secuencia peptídica de la región CDR2 de cadena ligera de anti-GDF-15 humano monoclonal Acm-B1-23

SAS

30 SEQ ID NO: 7 (secuencia peptídica de la región CDR3 de cadena ligera de anti-GDF-15 humano monoclonal Acm-B1-23):

QQYNNFPYT

35 SEQ ID NO: 8 (proteína madura recombinante GDF-15 humana del):

GSARNGDHCPLGPGRCRLHTVSRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHA
QIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLOTYDDLAKDCHCI

SEQ ID NO: 9 (proteína del precursor del GDF-15 humano):

MPGQELRTVNGSQMLLVLLVLSWLPHGALSLAEASRASFPGPSELHSEDSRFRELRKRYE
DLLTRLRANQSWEDSNTDLVPAPAVRILTPEVRLGSGGHLHLRISRALPEGLPEASRLHR
ALFRLSPTASRSWDVTRPLRRQLSLARPQAPALHLRLSPPPSQDQLLAESSARPQLELH
LRPQAARGRRRARARNGDHCPLGPGRCRLHTVSRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGAC
PSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLOTYDDLAKDC

40 HCI

SEQ ID NO: 10 (proteína del precursor del GDF-15 + ligador GSGS del extremo N-terminal y del extremo C-terminal):

GSGSGSGMPGQELRTVNGSQMLLVLLVLSWLPHGALSLAEASRASFPGPSELHSEDSRFR
 ELRKRYEDLLTRLRANQSWEDSNTDLVPAPAVRILTPEVRLGSGGHLHLRISRAALPEGLP
 EASRLHRALFRLSPTASRSWDVTRPLRRQLSLARPQAPALHLRLSPPPSQSDQLLAESSA
 RPQLELHLRPQAARGRRRARARNGDHCPLGPGRCRRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQV
 TMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYD
 DLLAKDCHCIGSGSGSG

SEQ ID NO: 11 (péptido Flag): DYKDDDDKGG

5 SEQ ID NO: 12 (péptido HA): YPYDVDPYAG

SEQ ID NO: 13 (péptido derivado del GDF-15 humano): ELHLRPQAARGRR

10 SEQ ID NO: 14 (péptido derivado del GDF-15 humano): LHLRPQAARGRRR

SEQ ID NO: 15 (péptido derivado del GDF-15 humano): HLRPQAARGRRRA

SEQ ID NO: 16 (péptido derivado del GDF-15 humano): LRPQAARGRRRAR

15 SEQ ID NO: 17 (péptido derivado del GDF-15 humano): RPQAARGRRRARA

SEQ ID NO: 18 (péptido derivado del GDF-15 humano): PQAARGRRRARAR

20 SEQ ID NO: 19 (péptido derivado del GDF-15 humano): QAARGRRRARARN

SEQ ID NO: 20 (péptido derivado del GDF-15 humano): MHAQIKTSLHRLK

SEQ ID NO: 25 (péptido del GDF-15 que comprende parte del epítipo del GDF-15 que se une a B1-23):

25 EVQVTMCIGACPSQFR

SEQ ID NO: 26 (péptido del GDF-15 que comprende parte del epítipo del GDF-15 que se une a B1-23):

TDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI

30 Las secuencias de ácido nucleico a las que se hace referencia en la presente solicitud son las siguientes (en un orden de 5' a 3'; representadas por el código de ácidos nucleicos habitual):

35 SEQ ID NO: 21 (secuencia de nucleótidos de ADN que codifican para la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO: 1):

CAAGTGAAGCTGCAGCAGTCAGGCCCTGGGATATTGCAGTCCTCCCAGACCCTCAGTCTGA
 CTTGTTCTTTCTCTGGGTTTTCACTGAGTACTTCTGGTATGGGTGTGAGCTGGATTCGTCA
 GCCTTCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTTACTGGGATGATGACAAGCGCTAT
 AACCCAACCCTGAAGAGCCGGCTCACAATCTCCAAGGATCCCTCCAGAAACCAGGTATTCC
 TCAAGATCACAGTGTGGACACTGCAGATACTGCCACATACTACTGT

40 SEQ ID NO: 22 (secuencia de nucleótidos de ADN que codifican para la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO: 2):

GACATTGTGCTCACCCAGTCTCCAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCG
 TCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTAATGTGGCCTGGTTTCTACAGAAACCAGG
 GCAATCTCCTAAAGCACTTATTTACTCGGCATCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGC
 TTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAACGTGCAGTCTGAAG
 ACTTGGCAGAGTATTTCTGT

SEQ ID NO: 23 (secuencia de nucleótidos de ADN que codifican para la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO: 5):

GCTCGAAGTTCCTACGGGGCAATGGACTAC

SEQ ID NO: 24 (secuencia de nucleótidos de ADN que codifican para la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID NO: 7):

CAGCAATATAACAACCTTTCCGTACACG

F) Ejemplos

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos no limitativos:

Ejemplo 1: Generación y caracterización del anticuerpo B1-23 de GDF-15

El anticuerpo B1-23 se generó en un ratón inactivado para el GDF-15. Se usó GDF-15 recombinante humano (SEQ ID NO: 8) como el inmunógeno.

La línea celular de hibridoma B1-23 que produce Acm-B1-23 se depositó en la Colección Alemana para Microorganismos y Cultivos Celulares GmbH (DMSZ) con el n.º de registro DSM ACC3142, según el Tratado de Budapest.

Por medio de un sistema de tiras de prueba comercialmente disponible, se identificó B1-23 como un isotipo de IgG2a (cadena kappa). Usando mediciones de resonancia de plasmón superficial, se determinó la constante de disociación (K_D) de la siguiente manera:

Se midió la unión del anticuerpo monoclonal anti-GDF-15 humano Acm-B1-23 según la invención empleando mediciones de resonancia de plasmón superficial usando un sistema Biorad ProteOn XPR36 y chips de sensores Biorad GLC:

Para preparar los biosensores, se inmovilizó proteína madura recombinante del GDF-15 humano sobre células de flujo 1 y 2. En una célula de flujo se usó GDF-15 recombinante derivado de células de insecto transfectadas con baculovirus (células de insecto HighFive) y en la otra proteína recombinante derivada de la expresión en *E. coli*. El chip de sensor GLC se activó usando sulfo-NHS (N-hidroxisulfosuccinimida) y EDC (clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida) (kit de acoplamiento de aminas de Biorad ProteOn) según la recomendación del fabricante, la superficie del sensor se cargó posteriormente con las proteínas hasta una densidad de aproximadamente 600 RU ($1\text{Ru} = 1\text{pg}\cdot\text{mm}^{-2}$). Los grupos de acoplamiento no reaccionados se extinguieron luego mediante perfusión con etanolamina 1 M a pH 8,5 y se equilibró el biosensor perfundiendo el chip con tampón de funcionamiento (HEPES 10 M, NaCl 150 mM, EDTA 3,4 mM, Tween-20 al 0,005%, pH 7,4, denominado HBS150). Como controles se usaron dos células de flujo, una vacía sin proteína acoplada y una acoplada con un reactivo de proteína no fisiológico (interleucina-5 humana), que se inmovilizó usando la misma química de acoplamiento y la misma densidad de acoplamiento. Para las mediciones de interacción, se disolvió anti-GDF-15 humano Acm-B1-23 en HBS150 y se usó en seis concentraciones diferentes como analito (concentración: 0,4, 0,8, 3, 12, 49 y 98 nM). Se perfundió el analito sobre el biosensor usando la configuración de cinética de un único disparo para evitar la regeneración intermitente, todas las mediciones se realizaron a 25°C y usando una velocidad de flujo de $100\ \mu\text{l}\ \text{min}^{-1}$. Para procesar el efecto de superficie aparente y la unión inespecífica a la matriz del sensor, se eliminó restando los datos de SPR de la célula de flujo vacía (célula de flujo 3) de los otros datos de SPR. Se analizó el sensograma resultante usando el software ProteOn Manager versión 3.0. Para el análisis de la cinética de unión, se supuso una interacción de tipo Langmuir 1:1. Puede determinarse para la constante de velocidad de asociación un valor de $5,4\pm 0,06\times 10^5\ \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (k_{on}) y para la constante de velocidad de disociación un valor de $4,3\pm 0,03\times 10^{-4}\ \text{s}^{-1}$ (k_{off}) (los valores son para la interacción de anti-GDF-15 humano Acm-B1-23 con GDF-15 derivado de la expresión de células de insecto). La constante de disociación en equilibrio se calculó usando la ecuación $K_D = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ para proporcionar un valor de aproximadamente 790 pM. Los valores de afinidad para la interacción de GDF-15 derivado de la expresión de *E. coli* y el anti-GDF-15 humano Acm-B1-23 difieren en menos de un factor de 2, las constantes de velocidad para GDF-15 derivado de células de insecto y *E. coli* se desvían en aproximadamente el 45% y están por tanto dentro de la precisión de las mediciones de SPR, y probablemente no reflejen una diferencia real en la afinidad. En las condiciones usadas, el anti-GDF-15 humano Acm-B1-23 no muestra unión a la interleucina-5 humana y, por tanto, confirma la especificidad de los datos de interacción y el anti-GDF-15 humano Acm-B1-23.

La secuencia de aminoácidos de GDF-15 humano recombinante (tal como se expresa en células de insecto transfectadas con baculovirus) es:

GSARNGDHCP LGPGRCCRLH TVRASLEDLG WADWVLSPRE VQVTMCIGAC
 PSQFRAANMH AQIKTSLHRL KPDTVPAPCC VPASYNPMVL IQKTDTGVSL
 QTYDDLAKD CHCI

(SEQ ID NO: 8)

5 Por tanto, usando mediciones de resonancia de plasmón superficial, se determinó la constante de disociación (Kd) de 790 pM. Como comparación: el anticuerpo Rituximab terapéuticamente usado tiene una afinidad significativamente menor (Kd = 8 nM).

10 Ejemplo 2: Antagonización de los efectos mediados por el GDF-15 con mAB B1-23

10 a) El receptor NKG2D (grupo citolítico natural 2D), que se expresa en linfocitos citolíticos naturales y células T CD8+, se conoce por desempeñar un papel importante en la vigilancia inmunitaria contra los tumores. Las células transformadas así como las infectadas por virus expresan ligandos, que se unen al receptor NKG2D, activando de ese modo las funciones efectoras citotóxicas de las células inmunitarias descritas. Las células transformadas de esta
 15 manera pueden detectarse y eliminarse del sistema inmunitario. Después del tratamiento de las células inmunitarias con o bien GDF-15 humano recombinante o bien con GDF-15 secretado por células tumorales *in vitro* durante 72 horas, se reguló por disminución el nivel de expresión de NKG2D sobre la superficie celular de linfocitos (figura 1). Después de 72 horas de incubación, se tiñeron las células inmunitarias con los siguientes anticuerpos de FACS: anti CD3, anti CD56, anti-NKG2D. Usando esta combinación de anticuerpos, el experimento se centró en los linfocitos
 20 citolíticos naturales y su expresión de superficie de NKG2D. El bajo nivel de NKG2D en las células inmunitarias condujo a una lisis de la célula diana/tumoral deteriorada. La regulación por disminución mediada por GDF-15 de NKG2D se impidió mediante Acm B1-23.

25 Se concluye por tanto que el GDF-15 humano regula por disminución la expresión de NKG2D sobre la superficie celular de linfocitos y regulando de ese modo por disminución la vigilancia inmunitaria contra los tumores. Uniéndose al GDF-15 humano, los anticuerpos de la presente invención son capaces de impedir la regulación por disminución mediada por GDF-15 de NKG2D y deben ser capaces de restaurar la vigilancia inmunitaria e inducir la destrucción de células cancerosas mediante linfocitos citolíticos naturales y células T CD8+.

30 b) El tratamiento de la línea celular de cáncer de ovario SK-OV-3 con GDF-15 recombinante condujo a la fosforilación de AKT. La AKT es una molécula, que es parte de la ruta de PI3K y contribuye a la activación y proliferación de células. En este experimento, se trataron células SK-OV-3 con GDF-15 recombinante 10 ng/ml durante 10 min a 37°C, CO₂ al 5%. La preincubación de 5 minutos de 2 µg de Acm-B1-23 con GDF-15 10 ng/ml a
 35 37°C bloqueó la fosforilación de AKT mediada por GDF-15 (figura 2). Esto demostró el efecto neutralizante de Acm-B1-23.

c) El tratamiento de células inmunitarias con GDF-15 recombinante condujo a la fosforilación de JNK, una cinasa que se activa o bien mediante citocinas o bien mediante estrés. La antagonización de GDF-15 10 ng/ml con 2 µg de Acm-B1-23 (5 minutos de preincubación a 37°C) bloqueó la fosforilación de JNK1/2 mediada por GDF-15 (figura 3).

40 Ejemplo 3: Inhibición de la proliferación de células de cáncer usando Acm B1-23

Los datos generados con B1-23 mostraron un efecto antiproliferativo del anticuerpo en células cancerosas *in vitro*. El efecto antiproliferativo más fuerte se observó usando la línea celular de cáncer de próstata LnCap, que produce
 45 mucho GDF-15. Un ensayo metabólico (ensayo Alamar Blue) mostró una disminución de la proliferación del 30% después de 72 h cuando estaba presente Acm-B1-23, en comparación con el grupo de control, donde no se aplicó el anticuerpo. Debido a que los efectos citotóxicos del anticuerpo se han excluido en diferentes ensayos, este efecto prueba una velocidad de división celular significativamente disminuido tras el bloqueo de GDF-15.

50 Ejemplo 4: Acm B1-23 inhibe el crecimiento de tumores *in vivo*

En una configuración de estudio experimental, se estudia el crecimiento tumoral en un modelo de células de melanoma humano SK-Mel28 en ratones NMRI inmunodeficientes. Se implantaron 7,5 x 10⁶ células de melanoma por vía subcutánea en cada ratón. En el día 23 después de la inoculación (es decir, durante la fase de crecimiento
 55 exponencial del malignoma), el anticuerpo Acm B1-23 se administra por primera vez. Después de la inyección de Acm B1-23 (30 mg/kg de peso corporal i.p.), no se observa crecimiento tumoral adicional en los ratones tratados con Acm B1-23 durante una semana, mientras que los tumores en las muestras de control negativas continúan creciendo.

60 Este ejemplo demuestra que el anticuerpo Acm B1-23 de la presente invención inhibe el crecimiento del cáncer en ratones que portan tumores derivados de células humanas.

Debido a que este ejemplo usa células de melanoma humano, los anticuerpos anti-GDF-15 humanos de la presente invención también deben inhibir el crecimiento del cáncer en un paciente humano. La inhibición del crecimiento del cáncer debe ser particularmente eficaz si el paciente tiene niveles elevados de GDF-15 en el suero sanguíneo antes de la administración, o si el tumor o los tumores formados por el cáncer tienen niveles mayores de GDF-15 humano en comparación con una muestra de control del mismo paciente obtenida de una parte no cancerosa del tejido que es el tejido de origen del cáncer. El presente ejemplo usa ratones inmunodeficientes. Por tanto, se concluye que los anticuerpos de la presente invención son capaces de inhibir el crecimiento del cáncer de una manera que es independiente de un sistema inmunitario intacto.

Además, se mostró anteriormente en el ejemplo 2 que los anticuerpos anti-GDF-15 humanos de la presente invención son capaces de prevenir la regulación por disminución mediada por GDF-15 de NKG2D y deben ser capaces de inducir la destrucción de células cancerosas por las linfocitos citotóxicos naturales y células T CD8+. Por tanto, se espera que la inhibición del crecimiento del cáncer por los anticuerpos anti-GDF-15 humanos sea más fuerte en los pacientes que en los ratones inmunodeficientes, ya que los pacientes no tienen las deficiencias inmunitarias de los ratones utilizados en el presente ejemplo.

En una configuración alternativa de estudio experimental, se realizó el siguiente estudio *in vivo*:

Para evaluar un efecto antitumoral de B1-23 *in vivo*, se usaron ratones desnudos Balb/c^{nu/nu} en un entorno de xenoinjerto con la línea celular de melanoma UACC-257. Los ratones se trataron o bien con el anticuerpo B1-23 o bien con PBS. Cada cohorte de tratamiento contenía 10 ratones desnudos Balb/c^{nu/un}.

Antes de la inyección, se cultivaron las células de melanoma UACC-257 en medio completo, excluyendo cualquier contaminación. Las células se cosecharon cuando se alcanzó el 70-80% de confluencia en el matraz de cultivo celular. Luego se lavaron las células con PBS y se contaron. Se suspendieron 1x10⁷ células viables en PBS.

La primera inyección/tratamiento se administró a ratones desnudos Balb/c^{nu/nu} de 6 semanas de edad. El área de inoculación de los ratones se limpió con etanol. Las células UACC 257 se mezclaron y extrajeron en una jeringa sin aguja, para evitar la presión negativa sobre las células tumorales. La suspensión celular que contiene 1x10⁷ células en PBS se inyectó por vía subcutánea (s.c.) en el costado inferior de los ratones.

La inyección intraperitoneal (i.p.) de B1-23 (25 mg/kg de peso corporal) o el mismo volumen de PBS se inició inmediatamente después de la inoculación de células tumorales (definida como el día 1) y se administró dos veces por semana. Los tumores se cultivaron durante 48 días. Los diámetros del tumor se midieron con un calibrador y se calculó el volumen del tumor en mm³ mediante la fórmula:

$$\text{Volumen} = (\text{anchura})^2 \times \text{longitud} / 2$$

Los resultados que se obtuvieron del estudio se muestran en la figura 4.

Tal como se demostró en la figura, el tamaño del tumor de la cohorte de animales tratados con B1-23 disminuyó significativamente, en comparación con el grupo de control de PBS.

Ejemplo 5: Acm B1-23 reconoce un epítipo conformacional o discontinuo de GDF-15 humano

Mapeo de epítipos: anticuerpo monoclonal de ratón GDF-15 contra péptidos lineales de 13 meros derivados de GDF-15.

Antígeno: GDF-15:

GSGSGSGMPGQELRTVNGSQMLLVLLVLSWLPHGALSLAEASRASFPGPSELHSEDSRFR
ELRKRYEDLLTRLRANQSWEDSNTDLVPAPAVRILTPEVRLGSGGHLHLRISRALPEGLP
EASRLHRALFRLSPTASRSWDVTRPLRRQLSLARPQAPALHLRLSPPPSQSDQLLAESSA
RPQLELHLRPQAARGRRRARARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQV
TMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDGTGVSLQTYD
DLLAKDCHCIGSGSGSG (322 amino acids with linker) (SEQ ID No:
 10)

La secuencia de la proteína se tradujo en péptidos de 13 meros con un desplazamiento de un aminoácido. Los extremos terminales C y N se alargaron mediante un ligador neutral GSGS para evitar los péptidos truncados (letras en negrita).

ES 2 742 287 T3

Péptidos de control:

5 Flag: DYKDDDDKGG (SEQ ID NO:13), 78 puntos; HA: YPYDVDPYAG (SEQ ID NO:14), 78 puntos (cada copia de matriz)

Identificador de chip de péptido:

10 000264_01 (10/90, ligador Ala2Asp)

Condiciones de tinción:

Tampón patrón: PBS, pH 7,4 + Tween 20 al 0,05%

15 Tampón de bloqueo: tampón de bloqueo Rockland MB-070

Tampón de incubación: tampón patrón con tampón de bloqueo Rockland MB-070 al 10%

20 Muestra primaria: anticuerpo monoclonal de ratón GDF-15 (1 µg/µl): tinción en tampón de incubación durante 16 h a 4°C a una dilución de 1:100 y agitación ligera a 500 rpm

Anticuerpo secundario: anticuerpo secundario de cabra anti-IgG (H+L) de ratón IRDye680, tinción en tampón de incubación con una dilución de 1:5000 durante 30 min a temperatura ambiente (TA)

25 Anticuerpos de control: anti-HA (12CA5)-LL-Atto 680 monoclonal (1:1000), anti-FLAG(M2)-FluoProbes752 monoclonal (1:1000); tinción en tampón de incubación durante 1 h a TA

Escáner:

30 Sistema de formación de imágenes Odyssey, LI-COR Biosciences

Ajustes: desfase: 1 mm; resolución: 21 µm; intensidad verde/rojo: 7/7

Resultados:

35 Después de 30 minutos de hinchamiento previo en tampón patrón y 30 minutos en tampón de bloqueo, la matriz de péptidos con péptidos lineales derivados de B7H3 de 10, 12 y 15 meros se incubó con anticuerpo secundario anti-IRDye680 de ratón conjugado con (H+L) de cabra solo a una dilución de 1:5000 durante 1 hora a temperatura ambiente para analizar las interacciones de fondo del anticuerpo secundario. El PEPperCHIP® se lavó 2x1 min con
40 tampón patrón, se enjuagó con agua dest. y se secó en una corriente de aire. La lectura se realizó con el sistema de formación de imágenes Odyssey a una resolución de 21 µm e intensidades verde/rojo de 7/7: se observó una interacción débil de péptidos ricos en arginina (ELHLRPQAARGRR (SEQ ID NO:15), LHLRPQAARGRRR (SEQ ID NO:16), HLRPQAARGRRRA (SEQ ID NO:17), LRPQAARGRRRAR (SEQ ID NO:18), RPQAARGRRRARA (SEQ ID NO:19), PQAARGRRRARAR (SEQ ID NO:20) y QAARGRRRARARN (SEQ ID NO:21)) que se conocen como
45 aglutinantes, y con el péptido básico MHAQIKTSLHRLK (SEQ ID NO:22) debido a interacciones iónicas con el colorante del anticuerpo cargado.

Después del hinchamiento previo durante 10 minutos en tampón patrón, la micromatriz de péptidos se incubó durante la noche a 4°C con el anticuerpo monoclonal de ratón GDF-15 a una dilución de 1:100. El lavado repetido en
50 tampón patrón (2x1 min) fue seguido por incubación durante 30 min con el anticuerpo secundario a una dilución de 1:5000 a temperatura ambiente. Después de 2x10 s de lavado en tampón patrón y enjuague corto con agua dest., el PEPperCHIP® se secó en una corriente de aire. La lectura se realizó con el sistema de formación de imágenes Odyssey a una resolución de 21 µm e intensidades verde/rojo de 7/7 antes y después de la tinción de los péptidos de control con anticuerpos anti-HA y anti-FLAG (M2).

55 Se demostró que ninguno de los péptidos de 13 meros lineales derivados de GDF-15 interactuaba con el anticuerpo monoclonal de ratón GDF-15 incluso a intensidades sobrerreguladas. Sin embargo, la tinción de los péptidos de control Flag y HA que enmarcan la matriz dio lugar a intensidades de puntos buenas y homogéneas.

60 Sumario:

El mapeo de epítomos del anticuerpo monoclonal de ratón GDF-15 contra GDF-15 no reveló ningún epítomo lineal con los péptidos de 13 meros derivados del antígeno. Según este hallazgo, es muy probable que el anticuerpo monoclonal de ratón GDF-15 reconozca un epítomo conformacional o discontinuo con baja afinidad de epítomos parciales. Debido a la ausencia obvia de cualquier señal de GDF-15 por encima de la tinción de fondo del anticuerpo secundario solamente, se omitieron la cuantificación de las intensidades de puntos con el analizador PepSlide® y la

65

anotación posterior de péptidos.

Ejemplo 6: Identificación estructural de epítomos de ligandos peptídicos mediante escisión de epítomos y extracción de epítomos de espectrometría de masas

5 El epítomo del GDF-15 humano recombinante que se une al anticuerpo B1-23 se identificó mediante el método de escisión de epítomos y el método de extracción de epítomos (Suckau *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A. diciembre de 1990; 87 (24): 9848-9852.; R.Stefanescu *et al.*, Eur. J. Mass Spectrom. 13, 69-75 (2007)).

10 Para la preparación de la columna de anticuerpos, se añadió el anticuerpo B1-23 a Sepharose acoplada a ácido 6-aminohexanoico activado por NHS. El anticuerpo B1-23 acoplado a Sepharose se cargó luego en una microcolumna de 0,8 ml y se lavó con tampones de bloqueo y lavado.

Experimento de extracción de epítomos:

15 El GDF-15 humano recombinante se digirió con tripsina durante 2 horas a 37°C (en solución), dando como resultado diferentes péptidos, según los sitios de escisión de tripsina en la proteína. Después de la digestión completa, los péptidos se cargaron en la columna de afinidad que contenía el anticuerpo B1-23 inmovilizado. Los péptidos no unidos y potencialmente unidos de GDF-15 se usaron para el análisis de espectrometría de masas. No fue posible la
20 identificación de péptidos mediante espectrometría de masas. Este fue un indicador adicional de que la región de unión de GDF-15 en el complejo B1-23 inmunitario comprende un epítomo discontinuo o conformacional. En el caso de un epítomo lineal continuo, los péptidos digeridos deben unirse a su compañero de interacción, a menos que haya un sitio de escisión de tripsina en el péptido del epítomo. Un epítomo discontinuo o conformacional puede confirmarse mediante el método de escisión del epítomo descrito en la siguiente parte.

25 Experimento de excisión de epítomos:

El anticuerpo B1-23 inmovilizado en la columna de afinidad se incubó luego con GDF-15 recombinante durante 2 h. El complejo inmunitario formado en la columna de afinidad se incubó luego con tripsina durante 2 horas a 37°C. La
30 escisión dio como resultado diferentes péptidos derivados del GDF-15 recombinante. El anticuerpo inmovilizado en sí mismo es proteolíticamente estable. Los péptidos resultantes de la proteína GDF-15 digerida, que estaban protegidos por el anticuerpo y, por tanto, protegidos de la escisión proteolítica, se eluyeron en condiciones ácidas (TFA, pH 2), se recogieron e identificaron mediante espectrometría de masas.

35 El método de escisión de epítomos usando la identificación EM/EM dio como resultado los siguientes péptidos:

| Péptido | Posición en la secuencia | Masa | Ión/Carga |
|--|--------------------------|---------|------------|
| EVQVTMCIGACPSQFR (SEQ ID NO: 25) | 40-55 | 1769,91 | 590,50(3+) |
| TDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO: 26) | 94-114 | 2310,96 | 771:33(3+) |

40 La parte del GDF-15 humano, que se une al anticuerpo B1-23, comprende un epítomo discontinuo o conformacional. La espectrometría de masas identificó 2 péptidos en la proteína GDF-15, que son responsables de la formación del complejo inmunitario. Estos péptidos se restringen a las posiciones 40-55 (EVQVTMCIGACPSQFR) y 94-114 (TDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI) en la secuencia de aminoácidos de GDF-15. Por tanto, estos dos péptidos comprenden un epítomo de la proteína GDF-15 que se une al anticuerpo B1-23.

45 G) Aplicabilidad industrial

Los anticuerpos, las porciones de unión a antígeno de los mismos, las composiciones farmacéuticas y los kits según la presente invención pueden fabricarse de manera industrial y venderse como productos para los usos reivindicados (por ejemplo para su uso en el tratamiento de cáncer), según normas conocidas para la fabricación de productos farmacéuticos. Por consiguiente, la presente invención es industrialmente aplicable.

50 Bibliografía

Arbabi Ghahroudi M *et al.*: "Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavychain antibodies." FEBS Lett. 15 de septiembre de 1997;414(3):521-6.

55 Ausubel *et al.*: "Current Protocols in Molecular Biology." Greene Publishing Associates and Wiley Interscience; Nueva York 1992.

60 Bauskin AR *et al.*: "The propeptide mediates formation of stromal stores of PROMIC-1: role in determining prostate cancer outcome." Cancer Res. 15 de marzo de 2005;65(6):2330-6.

- Brown DA *et al.*: "Macrophage inhibitory cytokine 1: a new prognostic marker in prostate cancer." Clin Cancer Res. 1 de noviembre de 2009;15(21) :6658-64.
- 5 Chothia C *et al.*: Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. Nature. 21-28 de diciembre de 1989 Dec;342(6252):877-83.
- Clackson T *et al.*: "Making antibody fragments using phage display libraries." Nature. 15 de agosto de 1991;352(6336):624-8.
- 10 Giudicelli V *et al.*: IMGT/V-QUEST, an integrated software program for immunoglobulin and T cell receptor V-J and V-D-J rearrangement analysis. Nucleic Acids Res. 1 de julio de 2004 Jul 1;32(edición del servidor Web):W435-40.
- Harlow and Lane: "Antibodies: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York 1988.
- 15 Holliger P *et al.*: "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments." Proc Natl Acad Sci U S A. 15 de Julio de 1993;90(14):6444-8.
- Holt LJ *et al.*: "Domain antibodies: proteins for therapy." Trends Biotechnol. Noviembre de 2003;21(11):484-90.
- 20 Huang CY *et al.*: "Molecular alterations in prostate carcinomas that associate with in vivo exposure to chemotherapy: identification of a cytoprotective mechanism involving growth differentiation factor 15." Clin Cancer Res. Octubre de 2007 1;13(19):5825-33.
- 25 Johnen H *et al.*: "Tumor-induced anorexia and weight loss are mediated by the TGF-beta superfamily cytokine MIC-1." Nat Med. Noviembre de 2007;13(11):1333-40.
- Jones PT *et al.*: "Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse." Nature. 29 de mayo-4 de junio de 1986;321(6069):522-5.
- 30 Kabat *et al.*: Sequences of proteins of immunological interest, U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. 1983.
- Kohler G and Milstein C: "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." Nature. 7 de agosto de 1975;256(5517):495-7.
- 35 Marks JD *et al.*: "By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage." J Mol Biol. 5 de diciembre de 1991;222(3):581-97.
- 40 Mimeault M and Batra SK: "Divergent molecular mechanisms underlying the pleiotropic functions of macrophage inhibitory cytokine-1 in cancer." J Cell Physiol. Septiembre de 2010;224(3) :626-35.
- Paul, W.E. (Ed.): "Fundamental Immunology" 2ª ed. Raven Press, Ltd., Nueva York 1989.
- 45 Remington's Pharmaceutical Sciences, Ed. AR Gennaro, 20ª edición, 2000, Williams & Wilkins, PA, EE.UU..
- Riechmann L *et al.*: "Reshaping human antibodies for therapy." Nature. 24 de marzo de 1988;332(6162):323-7.
- Roth P *et al.*: "GDF-15 contributes to proliferation and immune escape of malignant gliomas." Clin Cancer Res. 1 de agosto de 2010;16(15):3851-9.
- 50 Saerens D *et al.*: "Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics." Curr Opin Pharmacol. Octubre de 2008;8(5):600-8. Epub de 22 de agosto de 2008.
- 55 Sambrook *et al.*: "Molecular Cloning: A Laboratory Manual.", 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York 1989.
- Siegel DL: "Recombinant monoclonal antibody technology." Transfus Clin Biol. Enero de 2002;9(1):15-22.
- 60 Stefanescu R. *et al.*, Eur.J.Mass Spectrom. 13, 69-75 (2007)
- Suckau *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A. Diciembre de 1990; 87(24): 9848-9852.
- Weinberg R. *et al.*: The Biology of Cancer. Garland Science: Nueva York 2006. Pág. 850.
- 65 Documento WO 2005/099746

Documento WO 2009/021293

Lista de secuencias

5

<110> Universidad Julius-Maximilians Wurzburg

<120> Anticuerpos monoclonales contra el factor de diferenciación de crecimiento 15 (GDF-15)

10

<130> 152737

<160> 26

<170> PatentIn versión 3.5

15

<210> 1

<211> 97

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

20

<400> 1

Gln Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Ser Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Met Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Thr
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Pro Ser Arg Asn Gln Val
65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys

25

<210> 2

<211> 88

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

30

<400> 2

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
20 25 30

ES 2 742 287 T3

Val Ala Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys
 85

5 <210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 3

10 Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly
 1 5 10

15 <210> 4
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 4

20 Ile Tyr Trp Asp Asp Asp Lys
 1 5

25 <210> 5
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 5

30 Ala Arg Ser Ser Tyr Gly Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

35 <210> 6
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 6

40 Gln Asn Val Gly Thr Asn
 1 5

45 <210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 7

45 Gln Gln Tyr Asn Asn Phe Pro Tyr Thr
 1 5

ES 2 742 287 T3

<210> 8
 <211> 114
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> proteína madura recombinante del GDF-15 humano

10 <400> 8

Gly Ser Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys
 1 5 10 15

Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala
 20 25 30

Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly
 35 40 45

Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys
 50 55 60

Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys
 65 70 75 80

Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr
 85 90 95

Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His
 100 105 110

Cys Ile

15 <210> 9
 <211> 308
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 9

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

Val Leu Leu Val Leu Ser Trp Leu Pro His Gly Gly Ala Leu Ser Leu
 20 25 30

ES 2 742 287 T3

Ala Glu Ala Ser Arg Ala Ser Phe Pro Gly Pro Ser Glu Leu His Ser
35 40 45

Glu Asp Ser Arg Phe Arg Glu Leu Arg Lys Arg Tyr Glu Asp Leu Leu
50 55 60

Thr Arg Leu Arg Ala Asn Gln Ser Trp Glu Asp Ser Asn Thr Asp Leu
65 70 75 80

Val Pro Ala Pro Ala Val Arg Ile Leu Thr Pro Glu Val Arg Leu Gly
85 90 95

Ser Gly Gly His Leu His Leu Arg Ile Ser Arg Ala Ala Leu Pro Glu
100 105 110

Gly Leu Pro Glu Ala Ser Arg Leu His Arg Ala Leu Phe Arg Leu Ser
115 120 125

Pro Thr Ala Ser Arg Ser Trp Asp Val Thr Arg Pro Leu Arg Arg Gln
130 135 140

Leu Ser Leu Ala Arg Pro Gln Ala Pro Ala Leu His Leu Arg Leu Ser
145 150 155 160

Pro Pro Pro Ser Gln Ser Asp Gln Leu Leu Ala Glu Ser Ser Ser Ala
165 170 175

Arg Pro Gln Leu Glu Leu His Leu Arg Pro Gln Ala Ala Arg Gly Arg
180 185 190

Arg Arg Ala Arg Ala Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly
195 200 205

Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly
210 215 220

Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys
225 230 235 240

Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln
245 250 255

Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro
260 265 270

Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr

ES 2 742 287 T3

275 280 285

Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp
 290 295 300

Cys His Cys Ile
 305

<210> 10
 <211> 322
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> *Proteína precursora de GDF-15 humano* + ligador GSGS del extremo N-terminal y del extremo C-terminal

<400> 10

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Met Pro Gly Gln Glu Leu Arg Thr Val
 1 5 10 15

Asn Gly Ser Gln Met Leu Leu Val Leu Leu Val Leu Ser Trp Leu Pro
 20 25 30

His Gly Gly Ala Leu Ser Leu Ala Glu Ala Ser Arg Ala Ser Phe Pro
 35 40 45

Gly Pro Ser Glu Leu His Ser Glu Asp Ser Arg Phe Arg Glu Leu Arg
 50 55 60

Lys Arg Tyr Glu Asp Leu Leu Thr Arg Leu Arg Ala Asn Gln Ser Trp
 65 70 75 80

Glu Asp Ser Asn Thr Asp Leu Val Pro Ala Pro Ala Val Arg Ile Leu
 85 90 95

Thr Pro Glu Val Arg Leu Gly Ser Gly Gly His Leu His Leu Arg Ile
 100 105 110

Ser Arg Ala Ala Leu Pro Glu Gly Leu Pro Glu Ala Ser Arg Leu His
 115 120 125

Arg Ala Leu Phe Arg Leu Ser Pro Thr Ala Ser Arg Ser Trp Asp Val
 130 135 140

Thr Arg Pro Leu Arg Arg Gln Leu Ser Leu Ala Arg Pro Gln Ala Pro
 145 150 155 160

Ala Leu His Leu Arg Leu Ser Pro Pro Pro Ser Gln Ser Asp Gln Leu

ES 2 742 287 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | | 165 | | | | | | 170 | | | | | | 175 |
| Leu | Ala | Glu | Ser | Ser | Ser | Ala | Arg | Pro | Gln | Leu | Glu | Leu | His | Leu | Arg | |
| | | | 180 | | | | | 185 | | | | | 190 | | | |
| Pro | Gln | Ala | Ala | Arg | Gly | Arg | Arg | Arg | Ala | Arg | Ala | Arg | Asn | Gly | Asp | |
| | | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | | |
| His | Cys | Pro | Leu | Gly | Pro | Gly | Arg | Cys | Cys | Arg | Leu | His | Thr | Val | Arg | |
| | 210 | | | | | 215 | | | | | 220 | | | | | |
| Ala | Ser | Leu | Glu | Asp | Leu | Gly | Trp | Ala | Asp | Trp | Val | Leu | Ser | Pro | Arg | |
| 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 | |
| Glu | Val | Gln | Val | Thr | Met | Cys | Ile | Gly | Ala | Cys | Pro | Ser | Gln | Phe | Arg | |
| | | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | | |
| Ala | Ala | Asn | Met | His | Ala | Gln | Ile | Lys | Thr | Ser | Leu | His | Arg | Leu | Lys | |
| | | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | | |
| Pro | Asp | Thr | Val | Pro | Ala | Pro | Cys | Cys | Val | Pro | Ala | Ser | Tyr | Asn | Pro | |
| | | 275 | | | | | 280 | | | | | 285 | | | | |
| Met | Val | Leu | Ile | Gln | Lys | Thr | Asp | Thr | Gly | Val | Ser | Leu | Gln | Thr | Tyr | |
| | 290 | | | | | 295 | | | | | 300 | | | | | |
| Asp | Asp | Leu | Leu | Ala | Lys | Asp | Cys | His | Cys | Ile | Gly | Ser | Gly | Ser | Gly | |
| 305 | | | | | 310 | | | | | 315 | | | | | 320 | |

Ser Gly

<210> 11
 <211> 10
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido Flag

10 <400> 11

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Gly
 1 5 10

15 <210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Péptido HA

<400> 12

Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly
1 5 10

5 <210> 13
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> péptido derivado del GDF-15 humano

<400> 13

Glu Leu His Leu Arg Pro Gln Ala Ala Arg Gly Arg Arg
1 5 10

15 <210> 14
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> péptido derivado del GDF-15 humano

<400> 14

25 **Leu His Leu Arg Pro Gln Ala Ala Arg Gly Arg Arg Arg**
1 5 10

30 <210> 15
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> péptido derivado del GDF-15 humano

<400> 15

His Leu Arg Pro Gln Ala Ala Arg Gly Arg Arg Arg Ala
1 5 10

40 <210> 16
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> péptido derivado del GDF-15 humano

<400> 16

Leu Arg Pro Gln Ala Ala Arg Gly Arg Arg Arg Ala Arg
1 5 10

50 <210> 17
 <211> 13
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> péptido derivado del GDF-15 humano

60 <400> 17

ES 2 742 287 T3

Arg Pro Gln Ala Ala Arg Gly Arg Arg Arg Ala Arg Ala
1 5 10

5 <210> 18
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> péptido derivado del GDF-15 humano

<400> 18

Pro Gln Ala Ala Arg Gly Arg Arg Arg Ala Arg Ala Arg
1 5 10

15 <210> 19
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> péptido derivado del GDF-15 humano

<400> 19

25 **Gln Ala Ala Arg Gly Arg Arg Arg Ala Arg Ala Arg Asn**
1 5 10

30 <210> 20
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> péptido derivado del GDF-15 humano

<400> 20

Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu Lys
1 5 10

40 <210> 21
 <211> 291
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

45 <400> 21

caagtgaagc tgcagcagtc aggccctggg atattgcagt cctcccagac cctcagtctg 60
acttgttctt tctctgggtt ttcactgagt acttctggta tgggtgtgag ctggattcgt 120
cagccttcag gaaaggtct ggagtggctg gcacacattt actgggatga tgacaagcgc 180
tataacccaa ccctgaagag ccggctcaca atctccaagg atccctccag aaaccaggta 240
ttcctcaaga tcaccagtgt ggacactgca gatactgcca catactactg t 291

50 <210> 22
 <211> 264
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

ES 2 742 287 T3

<400> 22
gacattgtgc tcaccagtc tccaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60
gtcacctgca aggccagtca gaatgtgggt actaatgtgg cctggtttct acagaaacca 120
gggcaatctc ctaaagcact tatttactcg gcacccctacc ggtacagtgg agtccctgat 180
cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcaa cgtgcagtct 240
gaagacttgg cagagtattt ctgt 264

5
<210> 23
<211> 30
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

10 <400> 23
gctcgaagtt cctacggggc aatggactac 30

15 <210> 24
<211> 27
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

20 <400> 24
cagcaatata acaacttcc gtacacg 27

25 <210> 25
<211> 16
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

30 <400> 25
Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe Arg
1 5 10 15

35 <210> 26
<211> 21
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

40 <400> 26
Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys
1 5 10 15
Asp Cys His Cys Ile
20

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo monoclonal capaz de unirse a GDF-15 humano, o una porción de unión a antígeno del mismo capaz de unirse a GDF-15 humano, en el que:
- 5 i) el dominio variable de cadena pesada comprende una región CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 o una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 90% a la misma, y en el que el dominio variable de cadena ligera comprende una región CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 85% a la misma, y en el que el anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo es capaz de inhibir el crecimiento del cáncer en un mamífero,
- 10 o
- 15 ii) la unión es una unión a un epítipo discontinuo o conformacional en GDF-15 humano que se compone de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26, y en el que el anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo es capaz de inhibir el crecimiento del cáncer en un mamífero.
2. Anticuerpo monoclonal o porción de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1, en el que el mamífero es un paciente humano.
3. Anticuerpo monoclonal o porción de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1 ó 2, en el que el anticuerpo es el anticuerpo contra GDF-15 humano que puede obtenerse a partir de la línea celular B1-23 depositada ante la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares GmbH (DMSZ) con el n.º de registro DSM ACC3142 o una porción de unión a antígeno del mismo.
- 25 4. Anticuerpo monoclonal o porción de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el GDF-15 humano es GDF-15 humano recombinante que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 8.
- 30 5. Anticuerpo monoclonal o porción de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1 i), y en el que la unión es una unión a un epítipo discontinuo o conformacional en GDF-15 humano.
- 35 6. Anticuerpo monoclonal o porción de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 5, en el que el anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1 i), y en el que la unión a un epítipo discontinuo o conformacional en GDF-15 humano es la unión a un epítipo discontinuo o conformacional que se compone de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26.
- 40 7. Anticuerpo monoclonal o porción de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo tiene una constante de disociación en equilibrio para GDF-15 humano que es igual o menor de 5 nM tal como se mide mediante mediciones de resonancia de plasmón superficial.
- 45 8. Anticuerpo monoclonal o porción de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo tiene una constante de disociación en equilibrio para GDF-15 humano que es igual o menor de 2 nM tal como se mide mediante mediciones de resonancia de plasmón superficial.
- 50 9. Anticuerpo monoclonal o porción de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 7 u 8, en el que la constante de disociación en equilibrio es tal como se mide mediante mediciones de resonancia de plasmón superficial según el ejemplo 1.
- 55 10. Composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 60 11. Anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o composición farmacéutica según la reivindicación 10, para su uso en un método para tratar cáncer en un mamífero, comprendiendo el método administrar el anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo o la composición farmacéutica a dicho mamífero.
- 65 12. Anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo o composición farmacéutica según la reivindicación 11 para el uso según la reivindicación 11, en el que el mamífero es un paciente humano.

13. Anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo o composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 12 para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 12, en el que el método comprende inhibir el crecimiento del cáncer.
- 5 14. Anticuerpo o porción de unión a antígeno del mismo o composición farmacéutica según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13 para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13, en el que el método comprende inducir la destrucción de células cancerosas mediante linfocitos citolíticos naturales y células T CD8+ en el paciente humano.
- 10 15. Kit que comprende la composición farmacéutica según la reivindicación 10.
16. Kit según la reivindicación 15, para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14.
- 15 17. Vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para el anticuerpo o la porción de unión a antígeno del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1-9.
18. Línea celular capaz de producir un anticuerpo o una porción de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
- 20 19. Línea celular según la reivindicación 18, en la que la línea celular es la línea celular B1-23 depositada ante la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares GmbH (DMSZ) con el n.º de registro DSM ACC3142.

Figura 1

Expresión de NKG2D en linfocitos citolíticos naturales

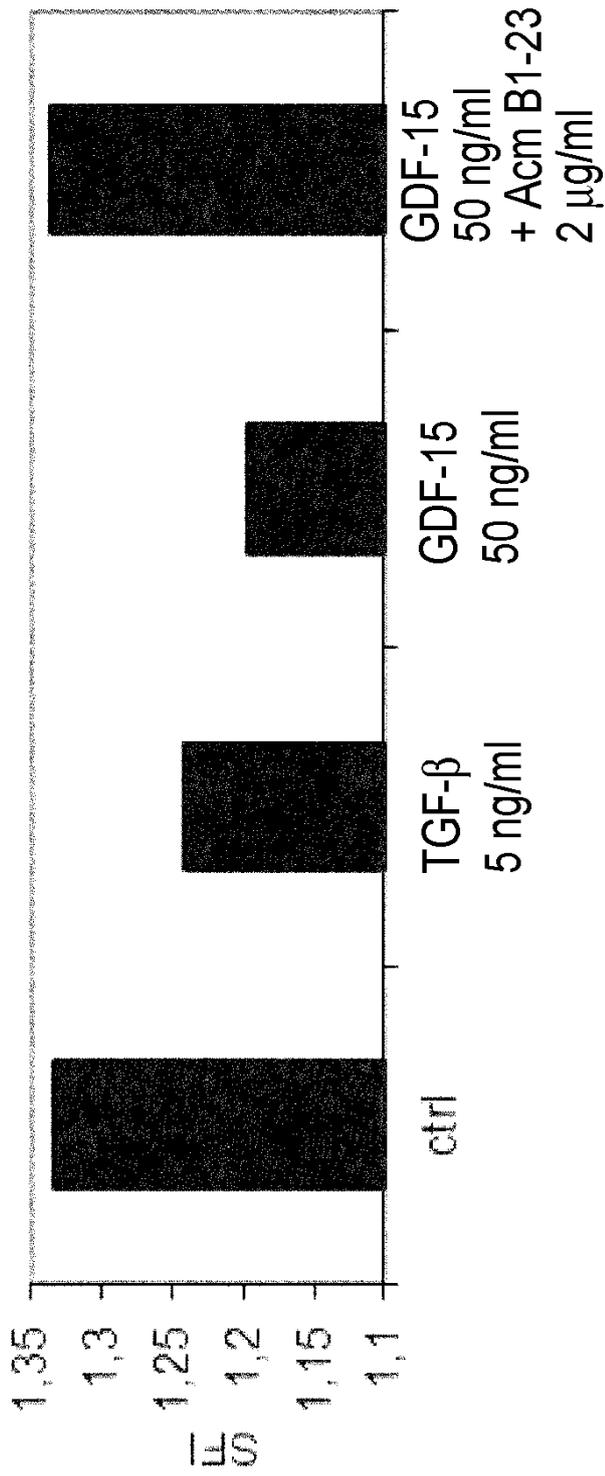


Figura 2

Fosforilación de AKT en la línea celular de
cáncer de ovario SKOV-3

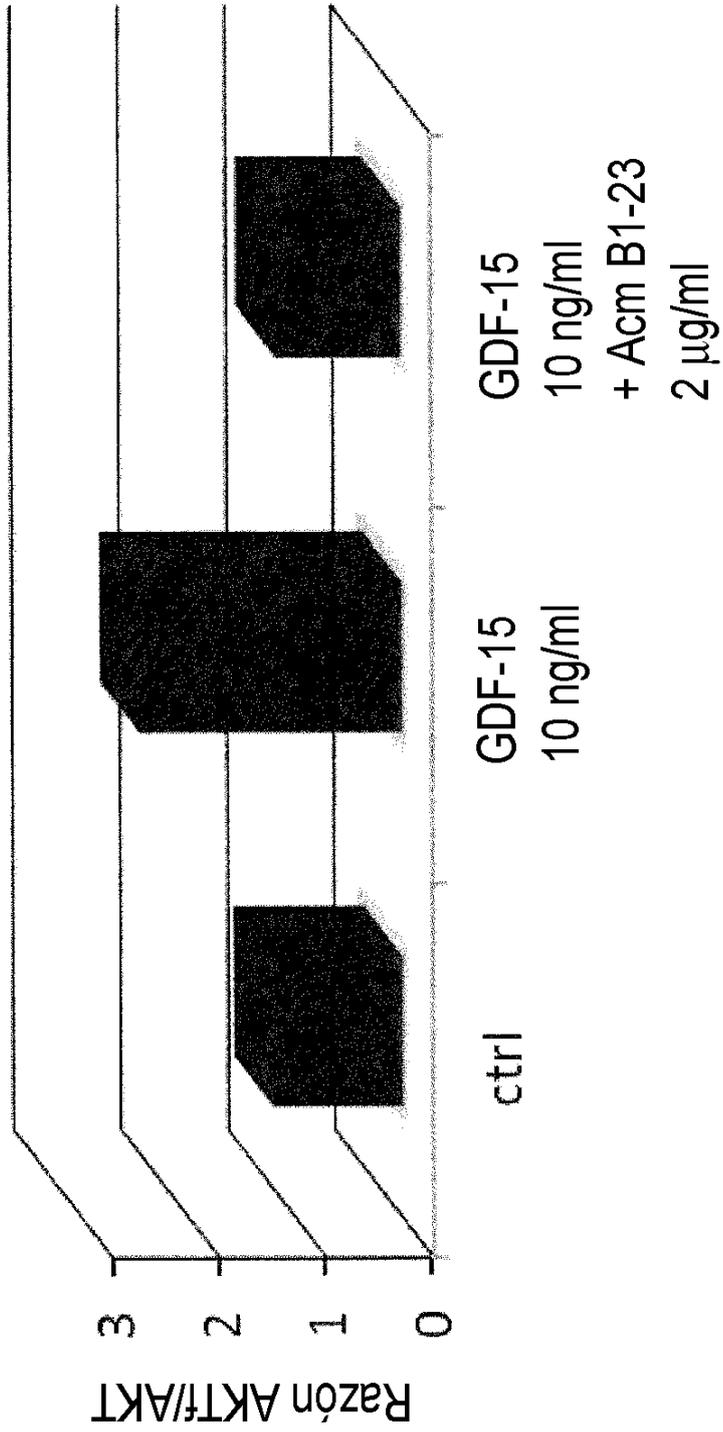


Figura 3

Fosforilación de JNK1/2 en células inmunitarias

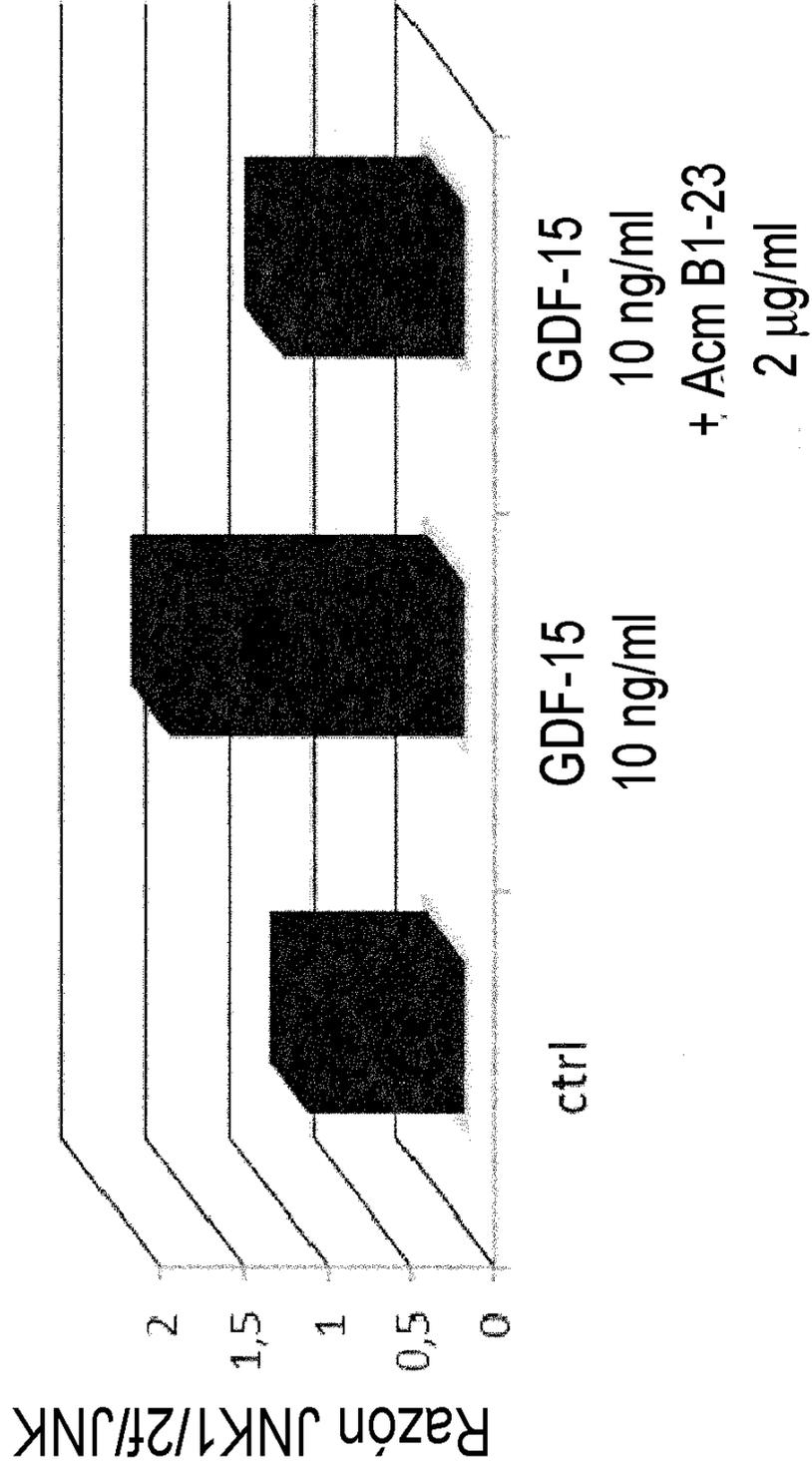


Figura 4

