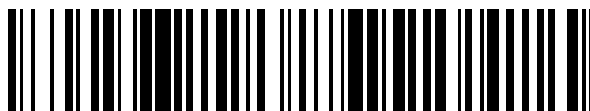


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 778 100**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C12N 5/12 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.10.2014 PCT/AU2014/000999**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.04.2016 WO16061608**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.10.2014 E 14904438 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019 EP 3209686**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales anti-gpc-1 y usos de los mismos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.08.2020

73 Titular/es:

**GLYP HOLDINGS PTY LIMITED (100.0%)
Suite 2, Ground Floor, 75 Talavera Road
Macquarie Park NSW 2113, AU**

72 Inventor/es:

**CAMPBELL, DOUGLAS;
JUSTINIANO FUENMAYOR, IRENE;
NOCON, ALINE;
SOON, JULIE;
TRUONG, QUACH;
WALSH, BRADLEY y
WISSMUELLER, SANDRA**

74 Agente/Representante:

VIDAL GONZÁLEZ, Maria Ester

ES 2 778 100 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 anti-gpc-1 y usos de los mismos

5 **Campo técnico**

La presente invención en general se refiere al campo de la inmunología y la medicina. Más específicamente, la presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales y usos de los mismos.

10 **Antecedentes**

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo, donde el cáncer de pulmón, mama, colorrectal, estómago y próstata provocan la mayoría de las muertes. El cáncer de próstata es el tumor más frecuente en los hombres y es el segundo en mortalidad solo después del cáncer de pulmón. El tratamiento con cirugía y/o radioterapia es exitoso en muchos pacientes si el cáncer de próstata se diagnostica temprano. Sin embargo, muchos pacientes con enfermedad avanzada y una proporción considerable de todos los pacientes con cáncer de próstata eventualmente desarrollan enfermedad metastásica después de la terapia localizada.

Los anticuerpos (Ab) son un instrumento principal en el campo de la terapia dirigida y el diagnóstico debido a su especificidad/afinidad de unión y potencial para las propiedades efectoras tras la interacción con sus antígenos afines. Se ha aprobado un número creciente de Ab para uso médico y muchos están bajo evaluación clínica. Los anticuerpos pueden ser medios de diagnóstico eficaces para identificar individuos con una predisposición a enfermedades tal como el cáncer de próstata y/o para diagnosticar tales enfermedades. Además, se ha demostrado que el uso terapéutico de algunos anticuerpos reduce el tamaño del tumor y extiende la supervivencia de los pacientes afectados.

La patente de Estados Unidos núm. 5,622,836 de Walker y otros divulga un anticuerpo llamado BLCA-38 (BLCA - "cáncer de vejiga"). El documento enseña que BLCA-38 es un anticuerpo monoclonal específico para un antígeno desconocido expresado por las células de carcinoma de vejiga. También se ha demostrado que BLCA-38 muestra especificidad para las líneas celulares de cáncer de ovario y colon de ser humano, así como algunas líneas celulares de melanoma, pero no para líneas linfoides (linfoides T o linfoides B) y leucémicas.

Posteriormente, Russell y otros. (2004) (Russell y otros, "Cytotoxic properties of immunoconjugates containing melittin-like peptide 101 against prostate cancer: in vitro & in vivo studies". Cancer Immunol Immunother 2004: 53(5): 411-421) publicaron un estudio en el que BLCA-38 se usó para dirigir un péptido citotóxico a las células de cáncer de próstata. Los autores indican que BLCA-38 es un anticuerpo monoclonal murino producido contra la línea celular humana de cáncer de vejiga UCRU-BL-17CL.

Una publicación adicional de Russell y otros en 2004 (Russell y otros, "Immunohistochemical characterization of the monoclonal antibody, BLCA38, for the detection of prostate cancer". Cancer Immunol Immunother 2004: 53: 995-1004) también enseñan que BLCA-38 es un anticuerpo monoclonal murino producido contra una línea celular humana de vejiga que es capaz de unirse a células de carcinoma de vejiga, células de cáncer de próstata y células epidermoides vulvares, pero no a células de cáncer de mama. El artículo indica que BLCA-38 es específico para un antígeno de aproximadamente 30 kDa de tamaño que es difícil de caracterizar o identificar.

Carter y otros. (2004) (Carter y otros, "Biodistributions of intact monoclonal antibodies and fragments of BLCA38, a new prostate cancer directed antibody". Cancer Immunol Immunother 2004: 53:533-542) analizaron el momento y la dosificación para dirigir agentes terapéuticos a células de cáncer de próstata con el uso de BLCA-38, también indicando que es un anticuerpo monoclonal murino que se dirige a un antígeno de alrededor de 30 kDa expresado en la superficie celular y en el citoplasma. Los autores afirman que la naturaleza del antígeno es elusiva e indican que se expresa en las células de cáncer de vejiga y próstata.

Un artículo de Khatri y otros publicado en 2010 (Khatri y otros, "Promise of BLCA38 as a Targeting Antibody for Tissue-Specific Gene Delivery to Prostate Cancer". Austral-Asian J. Cancer 2010: 9(3): 195-203) reiteró que BLCA-38 es un anticuerpo monoclonal murino específico para células de cáncer de próstata. Los autores revelan que aunque BLCA-38 no se internaliza cuando se une a su antígeno, la conjugación con un virus facilita la internalización del anticuerpo, lo que da como resultado una mayor expresión del gen reportero.

El documento WO 2016/168885 se refiere al hallazgo de que el anticuerpo BLCA-38 es una combinación de dos anticuerpos monoclonales distintos en una población mixta. Se ha determinado que solo una de estas especies de anticuerpos es capaz de unirse fuertemente al antígeno diana relevante presente en las células de cáncer de próstata, mientras que la segunda especie no puede.

A pesar de que los anticuerpos son prometedores como agentes de diagnósticos y terapéuticos, sigue existiendo la necesidad de agentes más eficaces para diagnosticar y/o tratar diversas formas de cáncer, incluido el cáncer de próstata.

Sumario de la invención

Los presentes inventores han identificado sorprendentemente que el anticuerpo BLCA-38 al que se hace referencia y usado en la técnica anterior mencionada anteriormente no es un anticuerpo monoclonal discreto como se indica, sino más bien una combinación de dos anticuerpos monoclonales distintos en una población mixta. Los presentes inventores han determinado que el hibridoma usado para generar el anticuerpo BLCA-38, una muestra representativa del cual fue depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipos de Tejidos con el número de acceso HB11785, es una población mixta de células de hibridoma, que produce al menos dos especies de anticuerpos discretos. Solo una de estas especies de anticuerpos es capaz de unirse al antígeno diana relevante presente en algunas formas de células cancerosas, mientras que la segunda especie no puede.

La determinación inesperada de que BLCA-38, como se hace referencia en la técnica anterior, representa una población mixta de hibridomas/anticuerpos, ha facilitado la generación de un hibridoma monoclonal capaz de producir una única población de anticuerpos monoclonales con especificidad de unión por el antígeno diana en diversas formas de células cancerosas. Además de evitar la producción y aplicación innecesarias de un anticuerpo ineficaz, los datos proporcionados en los Ejemplos de la presente descripción indican que el uso del hibridoma monoclonal/anticuerpo monoclonal único de acuerdo con la presente invención puede permitir la generación de una señal más fuerte en comparación con la población mixta de la técnica anterior cuando se aplican cantidades equivalentes de anticuerpo.

La invención se dirige, por ejemplo, a una población de anticuerpos monoclonales aislados que comprende:

primeros anticuerpos y/o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, en la que los primeros anticuerpos y/o fragmentos de unión al antígeno de los mismos comprenden:

(a) una región variable de la cadena pesada que comprende:

una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 50-54 de la **SEQ ID NO: 3**;

una región determinante de complementariedad 2 (CDR2) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 69-85 de la **SEQ ID NO: 3**;

una región determinante de complementariedad 3 (CDR3) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 118-126 de la **SEQ ID NO: 3**; y

(b) una región variable de la cadena ligera que comprende:

una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 44-54 de la **SEQ ID NO: 4**;

una región determinante de complementariedad 2 (CDR2) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 70-76 de la **SEQ ID NO: 4**;

una región determinante de complementariedad 3 (CDR3) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 109-117 de la **SEQ ID NO: 4**;

y en la que la población de anticuerpos no contiene segundos anticuerpos que comprenden una región variable de la cadena ligera que comprende:

una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 48-58 de la **SEQ ID NO: 6**;

una región determinante de complementariedad 2 (CDR2) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 74-80 de la **SEQ ID NO: 6**;

una región determinante de complementariedad 3 (CDR3) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 113-121 de la **SEQ ID NO: 6**.

En una primera realización se divulga un anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo que comprende una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en el que: (a) la región variable de la cadena pesada comprende: una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 50-54 de la **SEQ ID NO: 3**; una región determinante de complementariedad 2 (CDR2) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 69-85 de la **SEQ ID NO: 3**; una región determinante de complementariedad 3 (CDR3) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 118-126 de la **SEQ ID NO: 3**; y (b) la región variable de la cadena ligera comprende: una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 44-54 de la **SEQ ID NO: 4**; una región determinante de complementariedad 2 (CDR2) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 70-76 de la **SEQ ID NO: 4**; una región determinante de complementariedad 3 (CDR3) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 109-117 de la **SEQ ID NO: 4**.

- 5 El anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo puede comprender además: (a) una o más regiones variables de la cadena pesada FR (regiones marco) como se definen por una secuencia seleccionada de cualquiera o más de: residuos 20-49 de la **SEQ ID NO: 3**, los residuos 55-68 de la **SEQ ID NO: 3**, los residuos 86-117 de la **SEQ ID NO: 3**, y/o los residuos 127-137 de la **SEQ ID NO: 3**; y/o (b) una o más regiones variables de la cadena ligera FR (regiones marco) como se definen por una secuencia seleccionada de cualquiera o más de: los residuos 21-43 de la **SEQ ID NO: 4**, los residuos 55-69 de la **SEQ ID NO: 4**, los residuos 77-108 de la **SEQ ID NO: 4**, y/o los residuos 118-127 de la **SEQ ID NO: 4**.
- 10 El anticuerpo monoclonal aislado o fragmento de unión al antígeno del mismo puede comprender además cualquiera o más de: (a) una secuencia de dominio constante de la cadena pesada tal como se define por las posiciones 138-461 de la **SEQ ID NO: 3**; (b) una secuencia de dominio constante de la cadena ligera tal como se define por las posiciones 128-234 de la **SEQ ID NO: 4**; (c) una región de bisagra.
- 15 El anticuerpo monoclonal aislado o el fragmento de unión al antígeno del mismo puede tener especificidad de unión por un epítipo presente en el proteoglicano sulfato de heparán glicano-1 (GPC-1).
- 20 El anticuerpo monoclonal puede ser un anticuerpo de isotipo IgG. El anticuerpo monoclonal puede ser un anticuerpo de isotipo IgG1. El anticuerpo monoclonal o el fragmento de unión al antígeno puede comprender un marcador detectable.
- El marcador detectable puede ser uno o más de un marcador fluorescente, un radiomarcador, biotina o avidina.
- 25 El anticuerpo monoclonal puede ser cualquiera o más de un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo multimérico y/o un anticuerpo sintético.
- 30 El anticuerpo puede ser un anticuerpo biespecífico, un avicuerpo, un diacuerpo, una tricuerpo un tetracuerpo, un nanocuerpo, un anticuerpo de dominio único, un dominio VHH, un anticuerpo humano, un anticuerpo completamente humanizado, un anticuerpo parcialmente humanizado, anticalina, adnectina o un afficuerpo.
- 35 El anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en el que: (a) la región variable de la cadena pesada comprende: una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 50-54 de la **SEQ ID NO: 9**; una región determinante de complementariedad 2 (CDR2) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 69-85 de la **SEQ ID NO: 9**; una región determinante de complementariedad 3 (CDR3) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 118-126 de la **SEQ ID NO: 9**; y (b) la región variable de la cadena ligera comprende: una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 44-54 de la **SEQ ID NO: 10**; una región determinante de complementariedad 2 (CDR2) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 70-76 de la **SEQ ID NO: 10**; una región determinante de complementariedad 3 (CDR3) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 109-117 de la **SEQ ID NO: 10**.
- 40 El anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en el que: (a) la región variable de la cadena pesada comprende: una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % de homología de secuencia con una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 50-54 de la **SEQ ID NO: 9**; una región determinante de complementariedad 2 (CDR2) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % de homología de secuencia con una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 69-85 de la **SEQ ID NO: 9**; una región determinante de complementariedad 3 (CDR3) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % de homología de secuencia con una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 118-126 de la **SEQ ID NO: 9**; y (b) la región variable de la cadena ligera comprende: una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % de homología de secuencia con una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 44-54 de la **SEQ ID NO: 10**; una región determinante de complementariedad 2 (CDR2) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % de homología de secuencia con una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 70-76 de la **SEQ ID NO: 10**; una región determinante de complementariedad 3 (CDR3) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % de homología de secuencia con una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 109-117 de la **SEQ ID NO: 10**.
- 45 El anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico que comprende: (a) una cadena pesada que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos como se define en los residuos 20-467 de la **SEQ ID NO: 9**; y (b) una cadena ligera que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos como se define en los residuos 21-234 de la **SEQ ID NO: 10**.
- 50
- 55
- 60
- 65

5 El anticuerpo puede ser un anticuerpo quimérico que comprende: (a) una cadena pesada que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % de homología de secuencia con una secuencia de aminoácidos como se define en los residuos 20-467 de la **SEQ ID NO: 9**; y (b) una cadena ligera que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % de homología de secuencia con una secuencia de aminoácidos como se define en los residuos 21-234 de la **SEQ ID NO: 10**.

10 El anticuerpo quimérico puede comprender un marcador detectable. El marcador detectable puede ser uno o más de un marcador fluorescente, un radiomarcador, biotina o avidina.

15 El fragmento de unión al antígeno puede ser uno o más de un fragmento variable de cadena sencilla (scFv), un fragmento de dominio variable (Fv), un fragmento de unión al antígeno (Fab), un fragmento F(ab)₂, un péptido o un fragmento proteolítico que contiene una región de unión al epítipo.

20 El anticuerpo puede comprender o consistir en una secuencia de cadena pesada tal como se define por las posiciones 20-461 de la **SEQ ID NO: 3** y una secuencia de cadena ligera como se define por las posiciones 21-234 de la **SEQ ID NO: 4**.

25 En una segunda realización se divulga una variante o derivado de unión al antígeno aislado de un anticuerpo monoclonal como se define en la primera realización, en la que la variante o derivado y el anticuerpo como se define en la primera realización son capaces de unirse específicamente al mismo antígeno.

30 Cualquiera o más secuencia de aminoácidos de CDR1, CDR2 y/o CDR3 de la cadena pesada de la variante o derivado, y/o cualquiera o más secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y/o CDR3 de la cadena ligera de la variante o derivado, pueden comprender una, dos, tres, cuatro o cinco deleciones, inserciones, y/o sustituciones de aminoácidos en comparación con una secuencia de aminoácidos del CDR correspondiente presente en un anticuerpo como se define en la primera realización.

35 La variante o derivado aislado puede comprender una región variable de cadena pesada y una región variable de la cadena ligera, en donde: (a) la región variable de la cadena pesada comprende: una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % de homología de secuencia con una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 50-54 de la **SEQ ID NO: 3**; una región determinante de complementariedad 2 (CDR2) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % de homología de secuencia con una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 69-85 de la **SEQ ID NO: 3**; una región determinante de complementariedad 3 (CDR3) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % de homología de secuencia con una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 118-126 de la **SEQ ID NO: 3**; y (b) la región variable de la cadena ligera comprende: una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % de homología de secuencia con una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 44-54 de la **SEQ ID NO: 4**; una región determinante de complementariedad 2 (CDR2) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % de homología con una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 70-76 de la **SEQ ID NO: 4**; una región determinante de complementariedad 3 (CDR3) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % de homología de secuencia con una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 109-117 de la **SEQ ID NO: 4**.

45 La variante o derivado puede comprender: (a) al menos una región variable de cadena pesada FR (región marco) seleccionada de una región variable de cadena pesada FR que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos: que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, o al menos 95 % de homología de secuencia con los residuos 20-49 de la **SEQ ID NO: 3**, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % de homología de secuencia con los residuos 55-68 de la **SEQ ID NO: 3**, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % de homología de secuencia con los residuos 86-117 de la **SEQ ID NO: 3**, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % de homología de secuencia con los residuos 127-137 de la **SEQ ID NO: 3**; y/o (b) al menos una región variable de la cadena ligera FR (región marco) seleccionada de una región variable de la cadena ligera FR que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos: que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, o al menos 95 % de homología de secuencia con los residuos 21-43 de la **SEQ ID NO: 4**, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % de homología de secuencia con los residuos 55-69 de la **SEQ ID NO: 4**, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % de homología de secuencia con los residuos 77-108 de la **SEQ ID NO: 4**, y/o al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, o al menos 95 % de homología de secuencia con los residuos 118-127 de la **SEQ ID NO: 4**.

60 La variante o derivado puede comprender uno o más de: (a) una secuencia de dominio constante de la cadena pesada que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % de homología con una secuencia de aminoácidos como se define por las posiciones 138-461 de la

SEQ ID NO: 3; (b) una secuencia de dominio constante de la cadena ligera que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 % o al menos un 95 % de homología con una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 128-234 de la **SEQ ID NO: 4;** (c) una región de bisagra.

5 La variante o derivado puede tener especificidad de unión por un epítipo presente en el proteoglicano heparán sulfato glipicano-1 (GPC-1).

10 La variante o derivado puede ser un anticuerpo de isotipo IgG. La variante o derivado de anticuerpo aislado puede ser un anticuerpo de isotipo IgG1.

La variante o derivado puede comprender un marcador detectable.

15 El marcador detectable puede ser uno o más de un marcador fluorescente, un radiomarcador, biotina o avidina.

La variante o derivado del anticuerpo monoclonal puede ser cualquiera o más de un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo multimérico y/o un anticuerpo sintético.

20 En una tercera realización se divulgan células de hibridoma capaces de producir un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo como se define en la primera realización, o una variante o derivado de unión al antígeno del anticuerpo monoclonal como se define en la segunda realización.

25 Las células de hibridoma pueden ser las depositadas en Cellbank Australia el 22 de Agosto de 2014 y número de acceso asignado CBA20140026.

30 En una cuarta realización se divulga un cultivo celular que comprende una sola especie de células de hibridoma capaces de producir una única especie monoclonal de anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo como se define en la primera realización, o una especie única de una variante de unión al antígeno o derivado de la monoclonal anticuerpo como se define en la segunda realización.

Las células de hibridoma pueden depositarse en Cellbank Australia con el número de acceso CBA20140026.

35 En una quinta realización se divulga un cultivo celular que comprende múltiples especies de células de hibridoma, en el que: (a) el cultivo celular comprende células de hibridoma como se define en la tercera realización; y (b) el cultivo celular no comprende células de hibridoma que producen un anticuerpo que comprende: una región variable de la cadena ligera que comprende uno o más de:

- 40 una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 48-58 de la **SEQ ID NO: 6;**
- una región determinante de complementariedad 2 (CDR2) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 74-80 de la **SEQ ID NO: 6;**
- una región determinante de complementariedad 3 (CDR3) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 113-121 de la **SEQ ID NO: 6.**

45 El cultivo celular puede no comprender células de hibridoma que producen un anticuerpo que comprende una o más regiones variables de la cadena ligera FR (regiones marco) como se define por una secuencia seleccionada de uno o más de: los residuos 25-47 de la **SEQ ID NO: 6,** los residuos 59-73 de la **SEQ ID NO: 6,** los residuos 81-112 de la **SEQ ID NO: 6,** los residuos 122-131 de la **SEQ ID NO: 6.**

50 Las múltiples especies de células de hibridoma en el cultivo celular pueden ser capaces de producir una sola especie de anticuerpo monoclonal o fragmento de unión al antígeno del mismo como se define en la primera realización, o una sola especie de una variante o derivado de unión al antígeno como se define en la segunda realización.

55 En una sexta realización se divulga una composición que comprende una sola especie de anticuerpo monoclonal o fragmento de unión al antígeno del mismo como se define en la primera realización, o una especie única de una variante o derivado de unión al antígeno como se define en la segunda realización.

60 En una séptima realización se divulga una composición que comprende una mezcla de diferentes especies de anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, en el que: (a) la composición comprende una especie única de anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo como se define en la primera realización, o una especie única de una variante o derivado de unión al antígeno como se define en la segunda realización; y (b) la composición no comprende un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena ligera que comprende uno o más de:

65 una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 48-58 de la **SEQ ID NO: 6;**

una región determinante de complementariedad 2 (CDR2) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 74-80 de la **SEQ ID NO: 6**;
 una región determinante de complementariedad 3 (CDR3) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 113-121 de la **SEQ ID NO: 6**.

- 5 La mezcla de diferentes especies de anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos puede tener especificidad de unión por un epítipo presente en el proteoglicano heparán sulfato glipicano-1 (GPC-1).
- 10 En una octava realización se divulga una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo como se define en la primera realización, o una variante o derivado de unión al antígeno como se define en la segunda realización.
- La molécula de ácido nucleico puede comprender o consistir en una secuencia como se define en la **SEQ ID NO: 1**.
- 15 La molécula de ácido nucleico puede comprender o consistir en una secuencia como se define en la **SEQ ID NO: 2**.
- El anticuerpo monoclonal o el fragmento de unión al antígeno del mismo, o la variante o derivado de unión al antígeno, pueden tener especificidad de unión por un epítipo presente en el proteoglicano sulfato de heparán glipicano-1 (GPC-1).
- 20 En una novena realización se divulga un vector que comprende una molécula de ácido nucleico como se define en la octava realización.
- En una décima realización se divulga una célula huésped que comprende un vector como se define en la novena realización.
- 25 En una undécima realización se divulga un procedimiento de producción de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo como se define en la primera realización, o una variante o derivado de unión al antígeno como se define en la segunda realización, en el que el procedimiento comprende cultivar células de hibridoma como se define en la tercera realización, o una célula huésped como se define en la décima realización, en un medio de cultivo en condiciones adecuadas para producir de ese modo el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, o la variante o derivado de unión al antígeno.
- 30 El procedimiento puede comprender además aislar el anticuerpo monoclonal o el fragmento de unión al antígeno del mismo, o la variante o derivado de unión al antígeno, del cultivo.
- 35 El anticuerpo monoclonal o el fragmento de unión al antígeno del mismo, o la variante o derivado de unión al antígeno, pueden tener especificidad de unión por un epítipo presente en el proteoglicano sulfato de heparán glipicano-1 (GPC-1).
- 40 En una duodécima realización se divulga un procedimiento de producción de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo como se define en la primera realización, o una variante o derivado de unión al antígeno como se define en la segunda realización, en el que el procedimiento comprende cultivar un cultivo celular como se define en la cuarta o quinta realización en condiciones adecuadas para producir de ese modo el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, o la variante o derivado de unión al antígeno.
- 45 El procedimiento puede comprender además aislar el anticuerpo monoclonal o el fragmento de unión al antígeno del mismo, o la variante o derivado de unión al antígeno, del cultivo.
- 50 El anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno del mismo, o la variante o derivado de unión al antígeno, pueden tener especificidad de unión por un epítipo presente en el proteoglicano sulfato de heparán glipicano-1 (GPC-1).
- En una decimotercera realización se divulga un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión al antígeno del mismo, o una variante o derivado de unión al antígeno, obtenido u obtenible de un procedimiento como se define en la undécima o duodécima realización.
- 55 El anticuerpo monoclonal o el fragmento de unión al antígeno del mismo, o la variante o derivado de unión al antígeno, puede comprender un marcador detectable.
- 60 El marcador detectable puede ser uno o más de un marcador fluorescente, un radiomarcador, biotina o avidina.
- En una decimocuarta realización se divulga un procedimiento para la obtención de células de hibridoma como se define en la tercera realización a partir de una población mixta de hibridomas, el procedimiento que comprende aislar al menos una porción de las células de hibridoma de la población mixta de hibridomas.
- 65

El aislamiento puede comprender la clonación de células de hibridoma individuales de la población mixta de hibridomas, y determinar que la descendencia clonal es capaz de producir un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo como se define en la primera realización, o una variante o derivado de unión al antígeno como se define en la segunda realización.

5

La población mixta de hibridomas puede depositarse en la Colección Americana de Cultivos Tipo de Tejidos (ATCC) con el número de acceso HB11785.

10

En una decimoquinta realización se divulga un kit que comprende cualquiera o más de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo, variante o derivado de unión al antígeno, anticuerpo quimérico o células de hibridoma de acuerdo con la presente invención.

Las células de hibridoma pueden depositarse en Cellbank Australia con el número de acceso CBA20140026.

15

El kit puede ser un kit fragmentado o un kit combinado. El kit puede comprender además uno o más componentes adicionales seleccionados de reactivos para cultivo celular, muestras de referencia, tampones, marcadores e instrucciones escritas para realizar un ensayo con el uso de los componentes del kit.

20

En una decimosexta realización se divulga una composición que comprende cualquiera o más anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, variante o derivado de unión al antígeno, anticuerpo quimérico o células de hibridoma de acuerdo con la presente invención.

25

La composición puede ser una composición farmacéutica. La composición farmacéutica puede comprender además un diluyente, un excipiente y/o un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30

En una decimoséptima realización se divulga un procedimiento para detectar y/o cuantificar la expresión de GPC-1 en un sujeto, el procedimiento que comprende (a) obtener células, una muestra de tejido y/o una muestra de fluido corporal del sujeto; (b) poner en contacto las células, la muestra de tejido y/o la muestra de fluido corporal con un anticuerpo, variante de anticuerpo, fragmento de anticuerpo, variante de anticuerpo, derivado de anticuerpo o anticuerpo quimérico, de acuerdo con la presente invención, y (c) determinar y/o cuantificar la unión de dicho anticuerpo, variante de anticuerpo, fragmento de anticuerpo, derivado de anticuerpo o anticuerpo quimérico a las células, muestra de tejido o muestra de fluido corporal del sujeto.

35

El nivel de expresión de GPC-1 detectado en las muestras de células, tejidos y/o fluidos corporales obtenidos del sujeto puede compararse con una muestra de control de células o una población de muestras de referencia de los niveles de expresión de GPC-1. En algunas realizaciones, una determinación del aumento de la expresión de GPC-1 en el sujeto en comparación con el control o la referencia puede ser el diagnóstico de una enfermedad, o, una mayor probabilidad de desarrollar una enfermedad, en el sujeto. La enfermedad puede ser cáncer de próstata.

40

El GPC-1 para detección puede estar presente en la superficie de las células y/o expresarse internamente. El fluido corporal puede ser orina, sangre o componentes de la misma (por ejemplo, suero o plasma). Las células o la muestra de tejido pueden ser células prostáticas o tejido prostático.

45

El anticuerpo, la variante de anticuerpo, el fragmento de anticuerpo, el derivado de anticuerpo o el anticuerpo quimérico pueden ser producidos por células de hibridoma de acuerdo con la presente invención. Las células de hibridoma pueden depositarse en Cellbank Australia con el número de acceso CBA20140026.

50

En una decimoctava realización se divulga una solución que comprende una única especie de anticuerpo monoclonal, variante de anticuerpo, fragmento de anticuerpo, derivado de anticuerpo o anticuerpo quimérico, capaz de unirse específicamente a GPC-1 que puede aplicarse a las células, muestra de tejido o fluido corporal muestra que potencialmente puede contener GPC-1. La especie individual puede ser producida por células de hibridoma depositadas en Cellbank Australia con el número de acceso CBA20140026.

55

En una decimonovena realización se divulga una solución que comprende múltiples especies de anticuerpo, variante de anticuerpo, fragmento de anticuerpo, derivado de anticuerpo o anticuerpo quimérico que puede aplicarse a las células, muestra de tejido o muestra de fluido corporal que potencialmente puede contener GPC-1, en el que al menos una especie de la especie múltiple en la solución es capaz de unirse específicamente a GPC-1. La especie capaz de unirse específicamente a GPC-1 puede ser producida por células de hibridoma depositadas en Cellbank Australia con el número de acceso CBA20140026. La solución que comprende múltiples especies puede no comprender un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena ligera que comprende uno o más de:

60

una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 48-58 de la **SEQ ID NO: 6**;

65

una región determinante de complementariedad 2 (CDR2) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 74-80 de la **SEQ ID NO: 6**;

una región determinante de complementariedad 3 (CDR3) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 113-121 de la **SEQ ID NO: 6**.

Las siguientes realizaciones también se divulgan:

5 Realización 1: Una población aislada de anticuerpos monoclonales que comprende:

primeros anticuerpos y/o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, en la que los primeros anticuerpos y/o fragmentos de unión al antígeno de los mismos comprenden:

10 (a) un región variable de la cadena pesada que comprende:

15 una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 50-54 de la **SEQ ID NO: 3**;
 una región determinante de complementariedad 2 (CDR2) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 69-85 de la **SEQ ID NO: 3**;
 una región determinante de complementariedad 3 (CDR3) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 118-126 de la **SEQ ID NO: 3**; y

20 (b) una región variable de la cadena ligera que comprende:

25 una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 44-54 de la **SEQ ID NO: 4**;
 una región determinante de complementariedad 2 (CDR2) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 70-76 de la **SEQ ID NO: 4**;
 una región determinante de complementariedad 3 (CDR3) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 109-117 de la **SEQ ID NO: 4**;

30 y en la que la población de anticuerpos no contiene segundos anticuerpos, que comprenden una región variable de la cadena ligera que comprenden:

35 una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 48-58 de la **SEQ ID NO: 6**;
 una región determinante de complementariedad 2 (CDR2) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 74-80 de la **SEQ ID NO: 6**;
 una región determinante de complementariedad 3 (CDR3) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 113-121 de la **SEQ ID NO: 6**.

40 Realización 2: La población de anticuerpos de acuerdo con la realización 1, en la que la población de anticuerpos no contiene fragmentos de unión al antígeno de dichos segundos anticuerpos.

Realización 3: La población de anticuerpos de acuerdo con la realización 1 o la realización 2, en la que los primeros anticuerpos y/o fragmentos de unión al antígeno de los mismos tienen especificidad de unión por un epítipo presente en el proteoglicano sulfato de heparán glicano-1 (GPC-1).

45 Realización 4: La población de anticuerpos de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 3, en la que los primeros anticuerpos y/o fragmentos de unión al antígeno de los mismos son de isotipo IgG1.

Realización 5: La población de anticuerpos de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 4, en la que los primeros anticuerpos y/o fragmentos de unión al antígeno de los mismos son uno o más de anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos multiméricos y/o anticuerpos sintéticos.

50 Realización 6: La población de anticuerpos de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 5, en la que los fragmentos de unión al antígeno son uno o más fragmentos variables de cadena sencilla (scFv), fragmentos de dominio variable (Fv), fragmentos de unión al antígeno (Fab), fragmentos F(ab)₂, péptidos o fragmentos proteolíticos que contienen una región de unión al epítipo.

Realización 7: La población de anticuerpos de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 6, en la que los primeros anticuerpos y/o fragmentos de unión al antígeno de los mismos comprenden además:

55 (a) una o más regiones variables de la cadena pesada FR (regiones marco) como se define por una secuencia seleccionada de uno cualquiera o más de: los residuos 20-49 de la **SEQ ID NO: 3**, los residuos 55-68 de la **SEQ ID NO: 3**, los residuos 86-117 de la **SEQ ID NO: 3**, los residuos 127-137 de la **SEQ ID NO: 3**; y/o

60 (b) una o más regiones variables de la cadena ligera FR (regiones marco) como se define por una secuencia seleccionada de uno o más de: los residuos 21-43 de la **SEQ ID NO: 4**, los residuos 55-69 de la **SEQ ID NO: 4**, los residuos 77-108 de la **SEQ ID NO: 4**, los residuos 118-127 de la **SEQ ID NO: 4**.

Realización 8: La población de anticuerpos de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 7, en la que los primeros anticuerpos y/o fragmentos de unión al antígeno de los mismos comprenden además cualquiera o más de:

65

- (a) una secuencia de dominio constante de la cadena pesada tal como se define por las posiciones 138-461 de la **SEQ ID NO: 3**;
 (b) una secuencia de dominio constante de la cadena ligera tal como se define por las posiciones 128-234 de la **SEQ ID NO: 4**;
 (c) una región de bisagra.

Realización 9: La población de anticuerpos de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 8 en la que los primeros anticuerpos comprenden o consisten de una secuencia de cadena pesada como se define por las posiciones 20-461 de la **SEQ ID NO: 3** y una secuencia de cadena ligera como se define por las posiciones 21-234 de la **SEQ ID NO: 4**.

Realización 10: Células de hibridoma capaces de producir la población de anticuerpos de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 9.

Realización 11: Un cultivo celular que comprende una única especie de células de hibridoma capaces de producir una población de anticuerpos de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 9, en el que la población de anticuerpos contiene solo una especie de anticuerpo y/o fragmentos de unión al antígeno del mismo.

Realización 12: Las células de hibridoma de acuerdo con la realización 9, o el cultivo celular de acuerdo con la realización 10, en el que las células de hibridoma se depositan en Cellbank Australia con el número de acceso CBA20140026.

Realización 13: Un cultivo celular que comprende múltiples especies de células de hibridoma, en el que:

- (a) el cultivo celular comprende las células de hibridoma de acuerdo con la realización 10 o la realización 12; y
 (b) el cultivo celular no comprende células de hibridoma que producen un anticuerpo que comprende:

una región variable de la cadena ligera que comprende uno o más de:

una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 48-58 de la **SEQ ID NO: 6**;

una región determinante de complementariedad 2 (CDR2) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 74-80 de la **SEQ ID NO: 6**;

una región determinante de complementariedad 3 (CDR3) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 113-121 de la **SEQ ID NO: 6**.

Realización 14: El cultivo celular de acuerdo con la realización 13, en el que el cultivo celular no comprende células de hibridoma que producen un anticuerpo que comprende una o más regiones variables de la cadena ligera FR (regiones marco) como se define por una secuencia seleccionada de uno o más de: los residuos 25-47 de la **SEQ ID NO: 6**, los residuos 59-73 de la **SEQ ID NO: 6**, los residuos 81-112 de la **SEQ ID NO: 6**, los residuos 122-131 de la **SEQ ID NO: 6**.

Realización 15: Una composición que comprende una población de anticuerpos de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 9, en la que la población de anticuerpos contiene solo una especie de anticuerpo y/o fragmentos de unión al antígeno del mismo.

Realización 16: Una composición que comprende una población de anticuerpos de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 9, en la que la población de anticuerpos contiene múltiples especies de anticuerpos y/o fragmentos de unión al antígeno de los mismos.

Realización 17: La composición de acuerdo con la realización 16, en la que las múltiples especies de anticuerpos y/o fragmentos de unión al antígeno de los mismos tienen especificidad de unión por un epítipo presente en el proteoglicano sulfato de heparán glicano-1 (GPC-1).

Realización 18: Una molécula de ácido nucleico que codifica al menos uno de los primeros anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 9.

Realización 19: La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la realización 18, en la que la molécula de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia como se define en la **SEQ ID NO: 1**.

Realización 20: La molécula de ácido nucleico de acuerdo con la realización 18 o la realización 19, en la que la molécula de ácido nucleico comprende o consiste en una secuencia como se define en la **SEQ ID NO: 2**.

Realización 21: Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 18 a 20.

Realización 22: Una célula huésped que comprende el vector de acuerdo con la realización 21.

Realización 23: Un procedimiento de producción de anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, en el que el procedimiento comprende cultivar las células de hibridoma de acuerdo con la realización 10 o la realización 12, o la célula huésped de acuerdo con la realización 22, en un medio de cultivo en condiciones adecuadas para producir de ese modo el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo.

Realización 24: Un procedimiento de producción de anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, en el que el procedimiento comprende cultivar el cultivo celular de cualquiera de las realizaciones 11 a 14 en condiciones adecuadas para producir de ese modo los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos.

Realización 25: El procedimiento de acuerdo con la realización 23 o la realización 24, que comprende además aislar los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos del cultivo.

Realización 26: Los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos obtenidos o que pueden obtenerse a partir del procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 23 a 25.

Realización 27: Un procedimiento para obtener células de hibridoma de acuerdo con la realización 10 o la realización 12 de una población mixta de hibridomas, el procedimiento que comprende aislar al menos una porción de las células de hibridoma de la población mixta de hibridomas.

Realización 28: El procedimiento de acuerdo con la realización 27, en el que el aislamiento comprende clonar células de hibridoma individuales de la población mixta de hibridomas, y determinar que la descendencia clonal es capaz de producir la población de anticuerpos de acuerdo con cualquiera de las realizaciones 1 a 9.

Realización 29: El procedimiento de acuerdo con la realización 27 o la realización 28, en el que la población mixta de hibridomas se deposita en la Colección Americana de Cultivo Tipo de Tejido (ATCC) con el número de acceso HB11785.

Realización 30: La población de anticuerpos de acuerdo con la realización 5, en la que los primeros anticuerpos y/o fragmentos de unión al antígeno de los mismos son quiméricos.

Realización 31: La población de anticuerpos de acuerdo con la realización 5 o la realización 30, en la que los primeros anticuerpos y/o fragmentos de unión al antígeno de los mismos son anticuerpos quiméricos que comprenden:

(a) una región constante de la cadena pesada que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos como se define en los residuos 138-467 de la **SEQ ID NO: 9**; y

(b) una región constante de la cadena ligera que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos como se define en los residuos de 128-234 de la **SEQ ID NO: 10**.

Realización 32: La población de anticuerpos de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 1 a 9, en la que los primeros anticuerpos y/o fragmentos de los mismos comprenden un marcador detectable.

Realización 33: La población de anticuerpos de acuerdo con las realizaciones 32, en la que el marcador detectable es uno o más de un marcador fluorescente, un radiomarcador, biotina o avidina.

Breve descripción de los dibujos

Las realizaciones preferentes de la presente invención se describirán ahora, a modo de ejemplo solamente, con referencia a las figuras adjuntas en las que:

La **Figura 1** muestra los resultados de análisis de transferencia Western con el uso de anticuerpos MIL-38 de diversas fuentes en extractos de líneas celulares DU-145, C3 y CA-HPV-10. Las puntas de flecha indican la reactividad equivalente de las diferentes preparaciones de anticuerpos con el antígeno MIL-38. Las flechas indican las bandas dobles para la cadena pesada y las cadenas ligeras en cada una de las tres preparaciones. Abreviaturas: 37A = preparación de anticuerpos MIL-38 internos; "original" (1-O) = preparación de anticuerpos MIL-38 a partir de células de hibridoma de ATCC (HB11785); 40A = preparación de anticuerpos MIL-38 a partir de células de hibridoma internas; Sypro = tinción en gel de proteínas Sypro® Ruby. Carriles: 1 (marcador de MW); 2 (DU145 MPEK 16/7/12); 3 (C3 MPEK 20/4/12); 4 (CA-HPV-10 MPEK 28/3/12); 5 (-); 6 (marcador de MW); 7 (DU145 MPEK 16/7/12); 8 (C3 MPEK 20/4/12); 9 (CA-HPV-10 MPEK 28/3/12); 10 (marcador de MW); 11 (DU145 MPEK 16/7/12); 12 (C3 MPEK 20/4/12); 13 (CA-HPV-10 MPEK 28/3/12); 14 (-); 15 (preparación 1 de MIL-38 "original"); 16 (preparación 40A de MIL-38); 17 (preparación 37A de MIL-38); 18 (marcador de MW);

La **Figura 2** muestra una comparación de las preparaciones de anticuerpos MIL-38 procedentes de reservas de hibridoma internas (clon 1 de células de hibridoma AusMab) o células re-clonadas de la reserva de hibridoma HB11785 original de ATCC (líneas de hibridoma AusMab 3, 4 y 5) con la preparación 33A de anticuerpos MIL-38 internos. La **Figura 2A** muestra la segregación de los componentes de la cadena pesada y ligera en cada preparación de anticuerpos por electroforesis SDS-PAGE; Carriles: 1 (Magic Marker); 2 (AusMab 1); 3 (AusMab 3); 4 (AusMab 4); 5 (AusMab 5); 6 (preparación 33A de MIL-38); 7 (véase Blue Plus2); la **Figura 2B** muestra los resultados del análisis de transferencia Western con el uso de anticuerpos MIL-38 de diversas preparaciones en extractos de las líneas celulares DU-145 y C3;

La **Figura 3** muestra una comparación de varias preparaciones de anticuerpos MIL-38 generadas y almacenadas internamente (16A, 16B, 16C, 17B, 23A-1, 23A-2, 24A, 25A, 25B, 26B, 30A, 31A, 31B, 31C, 31D, 32B, 32C, 33A, 33B, 33C, 33D, 34A, 34B, 35A, 35C, 35D, 40A, 40B, AM-3, AM-4). La **Figura 3A** muestra la segregación de componentes de la cadena pesada y ligera en cada preparación de anticuerpos MIL-38 por electroforesis SDS-PAGE. La **Figura 3B** muestra los resultados del análisis de transferencia Western con el uso de anticuerpos MIL-38 de cada preparación en extractos de células DU-145;

La **Figura 4** muestra los resultados de análisis de población de anticuerpos MIL-38. La **Figura 4A** muestra los resultados de los análisis de transferencia Western con el uso de preparaciones de anticuerpos MIL-38 IIA original, Alfio I, Alfio II, 36A y AusMab 4 (AM-4) en extractos de células DU-145 y C3. La **Figura 4B** muestra un Syrogel reductor que demuestra la segregación de los componentes de la cadena pesada y ligera de las preparaciones de anticuerpos MIL-38 (IIA original, Alfio I, Alfio II, 36A y AusMab 4 (AM-4)) por electroforesis SDS-PAGE. IIA original = preparación interna derivada de las reservas del número de acceso de ATCC HB11785 (hibridoma murino BLCA-38); Alfio I = población mixta de anticuerpos MIL-38 derivada del número de acceso de ATCC HB11785; Alfio II = población de anticuerpos únicos derivada de la población mixta del número de acceso de ATCC HB11785.

La **Figura 5** muestra las imágenes de ensayos de inmunofluorescencia con el uso de varias preparaciones de anticuerpos MIL-38. Específicamente, la **Figura 5A** muestra imágenes de ensayos de inmunofluorescencia con el

uso de varias preparaciones de anticuerpos MIL-38 en células DU-145. Las **Partes A, D, G, J y M** muestran imágenes de campo brillante de las células teñidas; las **Partes B (AM-4) E (Alfio I), H (Alfio II), y K (IIA original)** muestran la unión de preparaciones de anticuerpos MIL-38 a células DU145; la **Parte N** muestra el control de anticuerpos secundarios para células DU-145; las **Partes C, F, I, L y O** muestran la tinción DAPI de las células. La **Figura 5B** muestra imágenes de ensayos de inmunofluorescencia con el uso de varias preparaciones de IA anticuerpos MIL-38 en células C3. Las **Partes A, D, G, J y M** muestran imágenes de campo brillante de las células teñidas; las **Partes B (AM-4) E (Alfio I), H (Alfio II), y K (original IIA)** muestran la unión de preparaciones de anticuerpos MIL-38 a células C3; la **Parte N** muestra el control de anticuerpos secundarios para células C3; las **Partes C, F, I, L y O** muestran la tinción DAPI de las células;

La **Figura 6** muestra los resultados de los ELISA tipo sándwich comparativos realizados con el uso de diferentes preparaciones de anticuerpos como anticuerpos de captura. La **Figura 6A** muestra los ELISA tipo sándwich comparativos con el uso de AM-3 y AM-4 como anticuerpos de captura. La **Figura 6B** muestra los ELISA tipo sándwich comparativos con el uso de una preparación mixta (34A) o una población clonal (AM-4 1F5) como anticuerpos de captura.

La **Figura 7** muestra la SDS-PAGE (**Figura 7A**) y el análisis de transferencia Western (**Figura 7B**) de un anticuerpo MIL-38 quimérico. Carril M = marcador de proteínas; Carril 1 = condiciones reductoras; Carril 2 = condiciones no reductoras; Carril P = IgG1 humana, Kappa (Sigma, núm. de Catálogo 15154) como control positivo.

La **Figura 8** muestra imágenes de ensayos de inmunofluorescencia con el uso de anticuerpos MIL-38 quiméricos y controles en células DU-145. La **Figura 8A-D** muestra imágenes combinadas de campo brillante y DAPI de las células teñidas. La **Figura 8E-H** muestra la tinción de células DU-145 con la preparación 33A de MIL-38 (**8E**, control positivo), MIL-38 quimérico (**8F**), Cetuximab (**8G**, control positivo para IgG1k humana) y control negativo (**8H**, anticuerpo no 1°);

La **Figura 9** muestra el análisis de transferencia western del anticuerpo MIL-38 quimérico. La **Figura 9A** muestra la reactividad de MIL-38 murino con extracto de MPEK DU-145, extracto de MPEK C3 y antígeno GPC-1 recombinante producido por NSO. La **Figura 9B** muestra la reactividad de MIL-38 quimérico con extracto de MPEK DU-145, extracto de MPEK C3 y antígeno GPC-1 recombinante producido por NSO. La **Figura 9C** muestra la reactividad de MIL-38 murino con extracto de MPEK DU-145, extracto de MPEK C3 y antígeno GPC-1 recombinante producido por NSO en condiciones equivalentes a la **Figura 9B**.

30 Definiciones

Como se usa en la presente solicitud, la forma singular "un", "una" y "el/la" incluye las referencias al plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la frase "un anticuerpo" también incluye múltiples anticuerpos.

35 Como se usa en la presente memoria, el término "que comprende" significa "que incluye". Las variaciones de la palabra "que comprende", como "comprenden" y "comprende", tienen significados correspondientemente variables. Así, por ejemplo, una muestra que "comprende" el anticuerpo A puede consistir exclusivamente en el anticuerpo A o puede incluir uno o más componentes adicionales (por ejemplo, el anticuerpo B).

40 Como se usa en la presente memoria, el término "múltiple" significa más de uno. En ciertos aspectos o realizaciones específicas, múltiple puede significar 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51 o más, y cualquier número entero derivable del mismo, y cualquier intervalo derivable del mismo.

45 Tal como se usa en la presente memoria, los términos "anticuerpo" y "anticuerpos" incluyen IgG (que incluye IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), IgA (que incluye IgA1 e IgA2), IgD, IgE, IgM e IgY, anticuerpos completos, que incluyen anticuerpos completos de cadena sencilla, y fragmentos de unión al antígeno de los mismos. Los fragmentos de anticuerpos de unión al antígeno incluyen, pero no se limitan a, Fv, Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fvs de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, Fvs unidos por disulfuro (sdFv) y fragmentos que comprenden un dominio VL o VH. Los anticuerpos pueden ser de cualquier origen animal o huésped de producción apropiado. Los fragmentos de anticuerpos de unión al antígeno, incluidos los anticuerpos de cadena sencilla, pueden comprender la(s) región(ones) variable(s) sola(s) o en combinación con la totalidad o una porción de los siguientes: región de bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3. También se incluye cualquier combinación de región(ones) variable(s) y de región de bisagra, dominios CHI, CH2 y CH3. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales, policlonales, quiméricos, multiespecíficos, humanizados, y monoclonales y policlonales humanos que se unen específicamente a la molécula biológica. El anticuerpo puede ser un anticuerpo biespecífico, un avicuerpo, un diacuerpo, un tricuerpo, un tetracuerpo, un nanocuerpo, un anticuerpo de dominio único, un dominio VHH, un anticuerpo humano, un anticuerpo completamente humanizado, un anticuerpo parcialmente humanizado, anticalina, adnectina o un afficuerpo.

60 Como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que reconoce un único epítipo antigénico, y que se obtiene de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos que se unen específicamente al mismo epítipo antigénico, y son idénticos con la posible excepción de la ocurrencia de mutación(ciones) natural(es) que puede(n) estar presente(s) en cantidades menores.

65 Como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo humanizado" se refiere a formas de anticuerpos que contienen secuencias de anticuerpos humanos, así como anticuerpos no humanos (por ejemplo, anticuerpos murinos).

5 Por ejemplo, un anticuerpo humanizado puede comprender sustancialmente todo de al menos uno y típicamente dos dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los lazos hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todos o sustancialmente todos los residuos de la región FR son los de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también puede comprender al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), que puede ser típicamente la de una inmunoglobulina humana.

10 Como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que exhibe una actividad biológica deseada, y en el que una porción de la cadena ligera y/o cadena pesada es idéntica u homóloga con las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie específica, mientras que las cadenas restantes son idénticas u homólogas con las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies diferentes. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede comprender regiones variables que se derivan de una primera especie y comprender regiones constantes que se derivan de una segunda especie. Los anticuerpos quiméricos pueden construirse, por ejemplo, mediante ingeniería genética a partir de segmentos génicos de inmunoglobulina pertenecientes a diferentes especies.

15 Como se usa en la presente memoria, el término "hibridoma" se refiere a una célula producida por la fusión de una célula inmortal (por ejemplo, una célula de mieloma múltiple) y una célula productora de anticuerpos (por ejemplo, un linfocito B), que es capaz de producir anticuerpos monoclonales de una especificidad de unión única.

20 Como se usa en la presente memoria, las expresiones "unirse específicamente" y "se une específicamente" en referencia a un anticuerpo, variante de anticuerpo, derivado de anticuerpo, fragmento de unión al antígeno, y similares se refiere a su capacidad para unirse a una molécula diana dada preferentemente sobre otras moléculas diana. Por ejemplo, si el anticuerpo, variante de anticuerpo, derivado de anticuerpo o fragmento de unión al antígeno ("molécula A") es capaz de "unirse específicamente" o "se une específicamente" a una molécula diana dada ("molécula B"), la molécula A tiene la capacidad de discriminar entre la molécula B y cualquier otro número de posibles parejas de unión alternativas. Por consiguiente, cuando se expone a una pluralidad de moléculas diferentes pero igualmente accesibles como posibles parejas de unión, la molécula A se unirá selectivamente a la molécula B y otras posibles parejas de unión alternativas permanecerán sustancialmente no unidas por la molécula A. En general, la molécula A se unirá preferentemente a la molécula B al menos 10 veces, preferentemente 50 veces, más preferentemente 100 veces, y con la máxima preferencia más de 100 veces con mayor frecuencia que otras posibles parejas de unión. La molécula A puede ser capaz de unirse a moléculas que no son la molécula B a un nivel débil pero detectable. Esto se conoce comúnmente como unión de fondo y se puede distinguir fácilmente de la unión específica de la molécula B, por ejemplo, mediante el uso de un control apropiado.

30 Como se usa en la presente memoria, el término "sujeto" incluye cualquier animal de importancia económica, social o de investigación, incluidas las especies bovina, equina, ovina, primate, aviar y roedor. Por lo tanto, un "sujeto" puede ser un mamífero tal como, por ejemplo, un mamífero humano o no humano.

35 Como se usa en la presente memoria, el término "aislado" en referencia a una molécula biológica (por ejemplo, un anticuerpo) es una molécula biológica que está libre de al menos algunos de los componentes con los que se produce naturalmente.

40 Como se usa en la presente memoria, los términos "proteína" y "polipéptido" se refieren cada uno a un polímero compuesto de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos y se usan indistintamente. Para los fines de la presente invención, un "polipéptido" puede constituir una proteína de longitud completa o una porción de una proteína de longitud completa.

45 Como se usa en la presente memoria, el término "polinucleótido" se refiere a un polímero monocatenario o bicatenario de bases de desoxirribonucleótidos, bases de ribonucleótidos, análogos conocidos o nucleótidos naturales, o mezclas de los mismos.

50 Como se usa en la presente memoria, el término "kit" se refiere a cualquier sistema de suministro para suministrar materiales. Tales sistemas de suministro incluyen sistemas que permiten el almacenamiento, transporte o suministro de reactivos de reacción (por ejemplo, marcadores, muestras de referencia, material de soporte, etc. en los contenedores apropiados) y/o materiales de soporte (por ejemplo, tampones, instrucciones escritas para realizar un ensayo, etc.) de un lugar a otro. Por ejemplo, los kits pueden incluir uno o más recipientes, como cajas, que contienen los reactivos de reacción y/o materiales de soporte relevantes. El término "kit" incluye kits fragmentados y combinados. Un "kit fragmentado" se refiere a un sistema de suministro que comprende dos o más recipientes separados que contienen cada uno una sub porción del total de componentes del kit. Los contenedores pueden ser suministrados al destinatario previsto juntos o por separado. Cualquier sistema de suministro que comprenda dos o más recipientes separados que contengan cada uno una sub porción del total de componentes del kit se incluye dentro del significado del término "kit fragmentado". Un "kit combinado" se refiere a un sistema de suministro que contiene todos los componentes de un ensayo de reacción en un único recipiente (por ejemplo, en una sola caja que contiene cada uno de los componentes deseados).

65

Se entenderá que el uso del término "entre" en la presente memoria, cuando se refiere a un intervalo de valores numéricos, abarca los valores numéricos en cada punto final del intervalo. Por ejemplo, un polipéptido de entre 10 residuos y 20 residuos de longitud incluye un polipéptido de 10 residuos de longitud y un polipéptido de 20 residuos de longitud.

Cualquier descripción de documentos de la técnica anterior en la presente memoria, o declaraciones en la presente memoria derivadas o basadas en dichos documentos, no es una admisión de que los documentos o declaraciones derivadas son parte del conocimiento general común de la técnica relevante. A los fines de la descripción, todos los documentos a los que se hace referencia en la presente memoria se incorporan por referencia en su totalidad a menos que se indique lo contrario.

Descripción detallada

Sigue existiendo la necesidad de procedimientos y agentes más eficaces para diagnosticar y/o tratar diversas formas de cáncer, tal como el cáncer de próstata. Los anticuerpos son agentes de diagnóstico y terapéuticos útiles para el cáncer, ya que se han convertido en un instrumento exitoso e importante para diagnosticar y tratar pacientes con neoplasias hematológicas y tumores sólidos. La identificación de nuevos anticuerpos relevantes dirigidos a antígenos específicos de tumor ofrece un posible medio para mejorar los resultados de diagnóstico y/o terapéuticos para pacientes con cáncer. Otro medio por el cual estos resultados pueden mejorarse es a través de la mejora de los diagnósticos y/o terapias basados en anticuerpos existentes.

El "anticuerpo BLCA-38" ha sido objeto de investigaciones previas en el diagnóstico y/o tratamiento del cáncer, incluido el cáncer de vejiga y de próstata. En la técnica anterior, el "anticuerpo BLCA-38" se denomina de manera persistente un anticuerpo monoclonal murino dirigido a un antígeno desconocido de aproximadamente 30 kDa de tamaño¹⁻⁵. Los presentes inventores han identificado sorprendentemente que el anticuerpo BLCA-38 divulgado y usado en la técnica anterior no es una única población de anticuerpos monoclonales como se indicó anteriormente, sino una combinación de dos anticuerpos monoclonales distintos en una población mixta. Esto se deriva de la determinación del presente inventor de que el hibridoma usado para generar el anticuerpo BLCA-38, una muestra representativa de la cual se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo de Tejidos con el número de acceso HB11785, es una población biconal (en lugar de monoclonal) de células de hibridoma, que produce una mezcla de dos especies de anticuerpos discretos. Solo una de estas especies de anticuerpos es capaz de unirse al antígeno relevante en las células de cáncer de próstata, mientras que la segunda especie no puede. Además, el antígeno unido por este anticuerpo es significativamente mayor que los 30 kDa indicados en la técnica anterior³⁻⁴.

Estos hallazgos inesperados han facilitado la generación de un hibridoma monoclonal capaz de producir una única población de anticuerpos con especificidad de unión solo por el antígeno diana. Además de evitar la producción y aplicación innecesarias de un anticuerpo ineficaz (es decir, la segunda población de anticuerpos monoclonales presente en la población mixta de la técnica anterior), el uso del hibridoma monoclonal/anticuerpo único de acuerdo con la presente invención proporciona una señal más fuerte en comparación con la mezcla población de la técnica anterior cuando se utilizan cantidades equivalentes de anticuerpo.

Por consiguiente, ciertas realizaciones de la presente invención se refieren a la provisión de una población de anticuerpos monoclonales derivados de células de hibridoma clonal, cada miembro de la población de anticuerpos es capaz de unirse específicamente a un antígeno presente en ciertas células cancerosas (por ejemplo, células de cáncer de vejiga y próstata). La presente invención también proporciona fragmentos de unión al antígeno de estos anticuerpos, así como derivados y variantes de los anticuerpos que mantienen la misma especificidad de unión.

También se proporcionan hibridomas capaces de producir anticuerpos de la presente invención. Un ejemplo de tal hibridoma fue depositado bajo los términos del Tratado de Budapest en Cellbank Australia en 214 Hawkesbury Road, Westmead, NSW 2145, Australia el 22 de agosto de 2014 con el número de acceso CBA20140026.

Además se proporcionan procedimientos de producción y/o aislamiento de anticuerpos de la presente invención, y métodos de detección/diagnóstico que utilizan los anticuerpos.

Anticuerpos monoclonales

La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales, derivados de tales anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos.

Los anticuerpos monoclonales, variantes, derivados y fragmentos de unión al antígeno son capaces de unirse específicamente a un epítipo antigénico presente en el proteoglicano sulfato de heparán glicano-1 (GPC-1). La proteína GPC-1 puede ser una proteína glicano-1 humana (por ejemplo, como se define mediante una secuencia establecida en cualquiera de: secuencia de referencia NCBI núm. de acceso NP_002072.2, núm. de acceso de GenBank AAH51279.1, núm. de acceso de GenBank AAA98132.1, número de acceso de GenBank EAW71184.1, o número de acceso de UniProtKB/Swiss-Prot P35052.2). En algunas realizaciones, la proteína GPC-1 puede no incluir un péptido señal y/o un propéptido. Adicionalmente o en variante, los anticuerpos monoclonales, derivados y fragmentos de

unión al antígeno pueden ser capaces de unirse específicamente a un epítipo antigénico presente en una variante GPC-1 (por ejemplo, una isoforma GPC-1, variante de empalme o alotipo).

5 A modo de ejemplo no limitante, los anticuerpos monoclonales, variantes, derivados y fragmentos de unión al antígeno pueden comprender una cadena pesada y/o una cadena ligera, combinaciones de las mismas, o componentes de las mismas.

10 La cadena pesada o componentes de la misma pueden comprender una región variable de la cadena pesada que comprende una, dos o tres regiones determinantes de complementariedad (CDR1, CDR2 y/o CDR3), también conocidas en la técnica como regiones hipervariables (HV) de la cadena pesada. La CDR1 de la cadena pesada puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos como se define por los residuos 50-54 de la **SEQ ID NO: 3**. La CDR2 de la cadena pesada puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos como se define por los residuos 69-85 de la **SEQ ID NO: 3**. La CDR3 de la cadena pesada puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos como se define por los residuos 118-126 de la **SEQ ID NO: 3**.

15 Adicionalmente o en variante, la región variable de la cadena pesada puede comprender una, dos, tres o cuatro regiones marco (FR1, FR2, FR3 y/o FR4). La FR1 de la cadena pesada puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos como se define por los residuos 20-49 de la **SEQ ID NO: 3**. La FR2 de la cadena pesada puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos como se define por los residuos 55-68 de la **SEQ ID NO: 3**. La FR3 de la cadena pesada puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos como se define por los residuos 86-117 de la **SEQ ID NO: 3**. La FR4 de la cadena pesada puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos como se define por los residuos 127-137 de la **SEQ ID NO: 3**.

20 Adicionalmente o en variante, la región variable de la cadena pesada puede comprender una secuencia líder. La secuencia líder de la cadena pesada puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos como se define por los residuos 1-19 de la **SEQ ID NO: 3**. El experto reconocerá que la secuencia líder es una secuencia señal que facilita el transporte de una cadena pesada recién sintetizada al retículo endoplásmico, y generalmente no está presente en la cadena pesada de la forma ensamblada final del anticuerpo monoclonal.

25 Adicionalmente o en variante, la cadena ligera o los componentes del mismo pueden comprender una región variable de la cadena ligera que comprende una, dos o tres regiones determinantes de complementariedad (CDR1, CDR2, CDR3) también conocidas en la técnica como regiones hipervariables (HV) de la cadena ligera. La CDR1 de la cadena ligera puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos como se define por los residuos 44-54 de la **SEQ ID NO: 4**. La CDR2 de la cadena ligera puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos como se define por los residuos 70-76 de la **SEQ ID NO: 4**. La CDR3 de la cadena ligera puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos como se define por los residuos 109-117 de la **SEQ ID NO: 4**.

30 Adicionalmente o en variante, la región variable de la cadena ligera puede comprender una, dos, tres o cuatro regiones marco (FR1, FR2, FR3, FR4). La FR1 de la cadena ligera puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos como se define por los residuos 21-43 de la **SEQ ID NO: 4**. La FR2 de la cadena ligera puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos como se define por los residuos 55-69 de la **SEQ ID NO: 4**. La FR3 de la cadena ligera puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos como se define por los residuos 77-108 de la **SEQ ID NO: 4**. La FR4 de la cadena ligera puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos como se define por los residuos 118-127 de la **SEQ ID NO: 4**.

35 Adicionalmente o en variante, la región variable de la cadena ligera puede comprender una secuencia líder. La secuencia líder de la cadena ligera puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos como se define por los residuos 1-20 de la **SEQ ID NO: 4**. El experto reconocerá que la secuencia líder es una secuencia señal que facilita el transporte de una cadena ligera recién sintetizada al retículo endoplásmico, y generalmente no está presente en la cadena ligera de la forma ensamblada final del anticuerpo monoclonal.

40 Adicionalmente o en variante, la cadena pesada puede comprender una, dos o tres regiones constantes de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos como se define por los residuos 138-461 de la **SEQ ID NO: 3**.

45 Adicionalmente o en variante, la cadena ligera puede comprender una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos como se define por los residuos 128-234 de la **SEQ ID NO: 4**.

50 En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales, variantes, derivados y fragmentos de unión al antígeno de acuerdo con la presente invención pueden comprender una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos como se define por los residuos 20-137 de la **SEQ ID NO: 3**. Los anticuerpos monoclonales, variantes, derivados y fragmentos de unión al antígeno pueden comprender una o dos de las regiones variables de la cadena pesada.

65

5 En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales, variantes, derivados y fragmentos de unión al antígeno de acuerdo con la presente invención pueden comprender una región variable de la cadena ligera que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos como se define por los residuos 21-127 de la **SEQ ID NO: 4**. Los anticuerpos monoclonales, variantes, derivados y fragmentos de unión al antígeno pueden comprender una o dos de las regiones variables de la cadena ligera.

10 En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales, variantes, derivados y fragmentos de unión al antígeno de acuerdo con la presente invención pueden comprender una región variable de cadena pesada que comprende o consiste en los residuos 20-137 de la **SEQ ID NO: 3**, y una región variable de la cadena ligera que comprende o consiste en los residuos 21-127 de la **SEQ ID NO: 4**. Los anticuerpos monoclonales, variantes, derivados y fragmentos de unión al antígeno pueden comprender una combinación de dos de las regiones variables de la cadena pesada y dos de las regiones variables de la cadena ligera.

15 En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales, variantes, derivados y fragmentos de unión al antígeno de acuerdo con la presente invención pueden comprender una cadena pesada que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos como se define por los residuos 20-461 de la **SEQ ID NO: 3**. Los anticuerpos monoclonales, variantes, derivados y fragmentos de unión al antígeno pueden comprender una o dos de las cadenas pesadas.

20 En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales, variantes, derivados y fragmentos de unión al antígeno de acuerdo con la presente invención pueden comprender una cadena ligera que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos como se define por los residuos 21-234 de la **SEQ ID NO: 4**. Los anticuerpos monoclonales, variantes, derivados y fragmentos de unión al antígeno pueden comprender una o dos de las cadenas ligeras.

25 En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales, variantes, derivados y fragmentos de unión al antígeno de acuerdo con la presente invención pueden comprender una cadena pesada que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos como se define por los residuos 20-461 de la **SEQ ID NO: 3**, y una cadena ligera que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos como se define por los residuos 21-234 de la **SEQ ID NO: 4**. Los anticuerpos monoclonales, variantes, derivados y fragmentos de unión al antígeno pueden comprender o consistir en una combinación de dos de las cadenas pesadas y dos de las cadenas ligeras.

30 Los anticuerpos monoclonales, variantes y derivados de dichos anticuerpos, y los fragmentos de unión al antígeno de los mismos de acuerdo con la presente invención no están restringidos a ningún isotipo particular, y por lo tanto pueden ser IgA (IgA1 o IgA2), IgD, IgE, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) o isotipo IgM. En algunas realizaciones, son del isotipo IgG1.

35 Se incluyen dentro del ámbito de la presente invención los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma sometidas bajo los términos del Tratado de Budapest en Cellbank Australia en 214 Hawkesbury Road, Westmead NSW 2145, Australia el 22 de agosto de 2014 con el número de acceso CBA20140026. El hibridoma es una población clonal que produce una única especie de anticuerpo que tiene una unión específica para un epítipo existente en el proteoglicano sulfato de heparán glicoproteico-1 (GPC-1).

Fragmentos de anticuerpos, derivados y variantes.

45 Se incluyen dentro del ámbito de la presente invención los "fragmentos" de los anticuerpos descritos en la presente memoria. En general, los fragmentos son "fragmentos de unión al antígeno" en el sentido de que son capaces de unirse específicamente al mismo antígeno/epítipo (por ejemplo, GPC-1) que el anticuerpo original del que se obtienen o en el que se basan. Típicamente, un fragmento de unión al antígeno retiene al menos el 10 % de la capacidad de unión al antígeno/epítipo del anticuerpo original o, al menos, 25 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 % (o más) de la capacidad de unión al antígeno/epítipo del anticuerpo original. También se contempla que un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo descrito en la presente memoria puede incluir sustituciones conservadoras de aminoácidos que no alteren sustancialmente su especificidad/capacidad de unión al antígeno/epítipo (por ejemplo, al menos 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 % (o más) de su especificidad/capacidad de unión al antígeno/epítipo puede ser retenida).

55 Los ejemplos no limitantes de fragmentos de unión al antígeno incluyen porciones de un anticuerpo de longitud completa, péptidos y derivados de los mismos que incluyen, por ejemplo, Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂, F(ab)₃, Fv, Fv de cadena sencilla (scFv), dsFv, fragmentos Fd, fragmentos dAB Fse, VH, VL, VhH y dominios V-NAR, paratopos, regiones CDR, moléculas de anticuerpos de cadena sencilla (por ejemplo, Sc-Fv), minicuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, cuerpos kappa, anticuerpos lineales, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos de dominio formados a partir de fragmentos de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos y cualquier porción o secuencia peptídica del anticuerpo que sea capaz de unirse específicamente al antígeno relevante/epítipo (por ejemplo, GPC-1).

65 También se incluyen dentro del ámbito de la presente invención los "derivados" de los anticuerpos descritos en la presente memoria. Un "derivado" de un anticuerpo de la presente invención se refiere a un anticuerpo descrito en la presente memoria que se modifica para incorporar componentes adicionales o que tiene componentes alterados, pero

que todavía es capaz de unirse específicamente al mismo antígeno/epítipo (por ejemplo, GPC-1) como el anticuerpo original del que se obtiene. Típicamente, un derivado de anticuerpo como se contempla en la presente memoria retiene al menos el 10 % de la capacidad de unión al antígeno/epítipo del anticuerpo original, o, al menos 25 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 % (o más) de la capacidad de unión al antígeno/epítipo del anticuerpo original.

Los ejemplos no limitantes de modificaciones adecuadas para formar derivados de anticuerpos incluyen amidación, glicosilación, fosforilación, pegilación, unión a un ligando celular u otra proteína, derivación por grupos protectores/bloqueadores conocidos, acetilación y similares. Adicionalmente o en variante, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Los derivados de anticuerpos pueden incluir anticuerpos marcados tales como, por ejemplo, anticuerpos monoclonales marcados con yodo radioactivo, indio, azufre, carbono, tritio o similares; anticuerpos monoclonales conjugados con avidina o biotina, anticuerpos monoclonales conjugados con enzimas (p. ej., rábano picante, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, glucosa oxidasa, beta-D-galactosidasa, fosfatasa alcalina, glucoamilasa, acetilcolina esterasa, anhidrasa de ácido carboxílico, malato deshidrogenasa pero lisozima peroxidasa, peroxidasa) y anticuerpos monoclonales conjugados con agentes quimioluminiscentes (por ejemplo, ésteres de acridina), agentes bioluminiscentes (por ejemplo, luciferasa) o agentes fluorescentes (por ejemplo, ficobiliproteínas). Otros ejemplos de derivados de anticuerpos incluyen anticuerpos bifuncionales, tales como anticuerpos biespecíficos generados mediante la combinación de partes de dos anticuerpos separados que reconocen dos grupos antigénicos diferentes (por ejemplo, mediante técnicas recombinantes o reticulación).

Los derivados de anticuerpos pueden formarse a partir de la modificación covalente de los anticuerpos descritos en la presente memoria, por ejemplo, haciendo reaccionar residuos de aminoácidos específicos del anticuerpo con un agente capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o residuos terminales. Por ejemplo, la derivatización con agentes bifuncionales es un medio útil para reticular un anticuerpo o fragmento del mismo con vehículos macromoleculares tales como matrices de soporte insolubles en agua. Los derivados de anticuerpos como se contemplan en la presente memoria pueden tener un agente unido a un anticuerpo base o un fragmento del mismo capaz de aumentar su vida media *in vivo* (por ejemplo, extender el período de tiempo antes de la eliminación del flujo sanguíneo). Un ejemplo no limitante de tal técnica incluye la adición de restos de PEG.

En ciertas realizaciones, el derivado de anticuerpo puede ser un multímero, tal como, por ejemplo, un dímero, que comprende uno o más monómeros, donde cada monómero incluye (i) una región de unión al antígeno de un anticuerpo anti-GPC-1 como se describe en la presente memoria, o una región polipeptídica derivada de la misma (como, por ejemplo, por sustitución conservadora de uno o más aminoácidos), y (ii) una región polipeptídica multimerizante (por ejemplo, dimerizante), de modo que el derivado de anticuerpo forme multímeros (por ejemplo, homodímeros) que se unen específicamente a GPC-1. Por ejemplo, una región de unión al antígeno de un anticuerpo anti-GPC-1 como se describe en la presente memoria, o una región de polipéptido derivada del mismo, puede fusionarse recombinante o químicamente con una proteína heteróloga, en el que la proteína heteróloga comprende un dominio de dimerización o multimerización. El derivado puede estar sujeto a condiciones que permitan la formación de un homodímero o heterodímero. El heterodímero puede comprender dominios de dimerización idénticos pero diferentes regiones de unión al antígeno anti-GPC-1, regiones de unión al antígeno anti-GPC-1 idénticas pero diferentes dominios de dimerización, o diferentes regiones de unión al antígeno anti-GPC-1 y diferentes dominios de dimerización. Los dominios de dimerización adecuados incluyen aquellos que se originan a partir de factores de transcripción (por ejemplo, una cremallera de leucina de región básica), una proteína hélice-lazo-hélice de región básica y una región constante de inmunoglobulina (por ejemplo, una región constante de la cadena pesada o un dominio de la misma como un dominio CH1, un dominio CH2 o un dominio CH3).

En otras realizaciones, el derivado de anticuerpo puede ser un anticuerpo anti-GPC1 como se describe en la presente memoria conjugado con un segundo anticuerpo (un "heteroconjugado de anticuerpo").

También se contemplan en la presente memoria los derivados humanizados de los anticuerpos descritos en la presente memoria. Un anticuerpo "humanizado" como se contempla en la presente memoria es un anticuerpo quimérico de ser humano/no humano que contiene una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado puede ser una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en la que los residuos de la región(ones) CDR del receptor se reemplazan por residuos de una región CDR de una especie no humana (anticuerpo donante) (por ejemplo, un ratón, rata, conejo o primate no humano que tiene la especificidad y afinidad deseadas por un antígeno/epítipo GPC-1). Los residuos de la región marco (FR) de la inmunoglobulina humana también pueden (opcionalmente) ser reemplazados por los residuos no humanos correspondientes, y en algunos casos los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos no presentes en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donador para mejorar el rendimiento del anticuerpo.

En la presente memoria se contempla además un anticuerpo "quimérico" en el que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica con u homóloga a una secuencia correspondiente en los anticuerpos derivados a partir de una especie particular o pertenecientes a una clase o subclase particular de anticuerpo, mientras que el resto de la cadena(s) es(son) idéntica(s) u homóloga(s) a una secuencia correspondiente en los anticuerpos derivados a partir de otras especies o pertenecientes a otra clase o subclase de anticuerpos. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico como se

contempla en la presente memoria puede comprender regiones variables derivadas de un anticuerpo monoclonal anti-GPC-1 como se describe en la presente memoria, y regiones constantes derivadas de una segunda especie. Los anticuerpos quiméricos pueden generarse, por ejemplo, mediante ingeniería genética, a partir de segmentos génicos de

5

A modo de ejemplo no limitante, un anticuerpo quimérico de acuerdo con la presente invención puede comprender una secuencia quimérica de cadena CH1-CH3 humana de ratón y una secuencia de cadena CH1-CH3 humana de VH de ratón (cadena pesada) y/o una secuencia de cadena Kappa humana de ratón, una secuencia de CK humana-VK de ratón y una secuencia VK de ratón de MIL-38 (cadena ligera). La cadena pesada del anticuerpo quimérico puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos como se establece en los residuos 20-467 de la **SEQ ID NO: 9**. La cadena ligera del anticuerpo quimérico puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos como se establece en los residuos 21-234 de la **SEQ ID NO: 10**. La región variable de la cadena pesada puede comprender: una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 50-54 de la **SEQ ID NO: 9**; y/o una región determinante de complementariedad 2 (CDR2) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 69-85 de la **SEQ ID NO: 9**; y/o una región determinante de complementariedad 3 (CDR3) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 118-126 de la **SEQ ID NO: 9**. Adicionalmente o en variante, la región variable de la cadena ligera puede comprender: una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 44-54 de la **SEQ ID NO: 10**; y/o una región determinante de complementariedad 2 (CDR2) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 70-76 de la **SEQ ID NO: 10**; y/o una región determinante de complementariedad 3 (CDR3) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 109-117 de la **SEQ ID NO: 10**. Un anticuerpo quimérico de acuerdo con la presente invención puede ser una "variante" de este anticuerpo quimérico.

10

15

20

25

Se incluyen dentro del ámbito de la presente invención las "variantes" de los anticuerpos descritos en la presente memoria. Un anticuerpo "variante" se refiere a un anticuerpo que difiere en la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-GPC-1 "original" en virtud de la adición, eliminación y/o sustitución de uno o más residuos de aminoácidos en la secuencia de anticuerpos original. Por ejemplo, el anticuerpo variante puede comprender una o más sustituciones de aminoácidos en una o más CDR y/o región (ones) marco del anticuerpo original (por ejemplo, entre 1 y 10, entre 2 y 5, o 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones en una o más CDR de cadena pesada y/o ligera y/o regiones marco del anticuerpo original). La variante de anticuerpo puede comprender una secuencia de aminoácidos de secuencia de dominio variable de cadena pesada y/o una secuencia de aminoácidos de secuencia de dominio variable de cadena ligera que tiene al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, a al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 98 % de homología de secuencia de aminoácidos (es decir, identidad de secuencia) con el correspondiente dominio variable del anticuerpo original.

30

35

La identidad u homología de secuencia entre dos secuencias se define en la presente memoria como el porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia del candidato que son idénticos a los residuos del anticuerpo original, después de alinear las secuencias e introducir interrupciones, si es necesario, para lograr el por ciento máximo de identidad de secuencia. Si las dos secuencias que se van a comparar entre sí difieren en longitud, la identidad de la secuencia se relaciona con el porcentaje de residuos de aminoácidos de la secuencia más corta que son idénticos a los residuos de aminoácidos de la secuencia más larga. La identidad de secuencia puede determinarse convencionalmente con el uso de programas de computadora tal como el programa Bestfit (Paquete de análisis de secuencia de Wisconsin, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive Madison, Wis. 53711) y/o el programa "fasta20u66" (versión 2.0u66, septiembre de 1998 por William R. Pearson y la Universidad de Virginia; véase también W. R. Pearson (1990), *Methods in Enzymology* 183, 63-98).

40

45

En algunas realizaciones, un anticuerpo variante como se describe en la presente memoria puede diferir de un anticuerpo original por medio de cambio(s) conservador(es) de aminoácidos en la secuencia del anticuerpo variable. Un "cambio conservador" se refiere a una alteración que es sustancialmente antigénica o conformacionalmente neutra, que produce cambios mínimos en la estructura terciaria del anticuerpo variante, o que produce cambios mínimos en los determinantes antigénicos del anticuerpo variante, en comparación con el anticuerpo original, y una que hace que el derivado no pueda unirse al mismo epítipo en GPC-1 que el anticuerpo original. Los ejemplos no limitantes de cambios conservadores de aminoácidos incluyen la sustitución de aminoácidos hidrófobos y la sustitución de aminoácidos fisicoquímicamente similares. Las personas con experiencia en la técnica pueden evaluar de manera rutinaria y sin dificultad si puede realizarse una sustitución de aminoácidos dada mientras se mantiene la neutralidad conformacional y antigénica (véase, por ejemplo, Berzofsky, (1985) *Science* 229:932-940; Bowie y otros. (1990) *Science* 247:1306-1310). Pueden lograr alteraciones en la conformación de proteínas con el uso de ensayos bien conocidos que incluyen, entre otros, procedimientos de fijación de microcomplemento (véase Wasserman y otros (1961) *J. Immunol.* 87:290-295; Levine y otros (1967) *Meth. Enzymol.* 11:928-936) y mediante estudios de unión con anticuerpos monoclonales dependientes de la conformación (véase Lewis y otros (1983) *Biochem.* 22:948-954). Los cambios conservadores de aminoácidos pueden ocurrir en una o más CDR y/o región(ones) marco del anticuerpo original (por ejemplo, entre 1 y 10, entre 2 y 5, o 1, 2, 3, 4, o 5 sustituciones conservadoras en una o más regiones CDR y/o marco del anticuerpo original).

50

55

60

65

En general, los anticuerpos humanizados, quiméricos, derivados, de fragmentos y variantes que se contemplan en la presente memoria todavía pueden unirse específicamente al mismo antígeno/epítipo (por ejemplo, GPC-1) que el anticuerpo original del que derivan o del que contienen componentes. Típicamente, pueden retener al menos el 10 % de la capacidad de unión al antígeno/epítipo del anticuerpo original o, al menos, el 25 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o 100 % (o más) de la capacidad de unión al antígeno/epítipo del anticuerpo original. Por ejemplo, pueden tener una mayor afinidad de unión y/o especificidad de unión en comparación con el anticuerpo original.

La capacidad de un fragmento de anticuerpo, derivado o variante para unirse específicamente a un antígeno/epítipo al que se dirige el anticuerpo original (es decir, un antígeno/epítipo GPC-1) puede probarse con el uso de procedimientos conocidos en la técnica que incluyen, por ejemplo, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos con el uso de técnicas tales como transferencias de Western, radioinmunoensayos, ensayo de inmunosorción enzimática (ELISA), ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos "sándwich", ensayos de inmunodifusión, reacciones de precipitina, inmunoensayos de proteína A, inmunoensayos fluorescentes, reacciones de precipitina de difusión de gel, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, ensayos de aglutinación y similares (véase, por ejemplo, Ausubel y otros, Eds., Short Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 4ª ed. 1999); Harlow & Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1999)).

Se divulgan específicamente variantes de cualquier anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo descrito en la presente memoria, que incluye, pero no se limita a, anticuerpos (incluidos anticuerpos quiméricos) y fragmentos de unión al antígeno definidos por secuencias específicas en la presente memoria, y anticuerpos producidos por hibridomas descritos en la presente memoria, incluido el hibridoma presentado bajo el términos del Tratado de Budapest en Cellbank Australia en 214 Hawkesbury Road, Westmead NSW 2145, Australia el 22 de agosto de 2014 con el número de acceso CBA20140026.

25 **Hibridomas**

La presente invención proporciona células de hibridoma capaces de producir anticuerpos monoclonales, derivados y variantes de dichos anticuerpos, y fragmentos de unión al antígeno de los mismos.

30 En algunas realizaciones, los hibridomas producen anticuerpos monoclonales y/o fragmentos de unión al antígeno de los mismos como se establece en la sección anterior titulada "*Anticuerpos monoclonales*".

En algunas realizaciones, los hibridomas producen fragmentos, derivados y/o variantes de los anticuerpos monoclonales descritos en la presente memoria como se establece en la sección anterior titulada "*Fragmentos de anticuerpos, derivados y variantes*".

Las técnicas para la producción de células de hibridoma capaces de producir anticuerpos monoclonales son bien conocidas en la técnica. Los ejemplos no limitantes incluyen el procedimiento del hibridoma (véase Kohler y Milstein, (1975) Nature, 256:495-497; Coligan y otros sección 2.5.1-2.6.7 en Methods In Molecular Biology (Humana Press 1992); y Harlow and Lane Antibodies: A Laboratory Manual, página 726 (Cold Spring Harbor Pub. 1988)), el procedimiento del hibridoma EBV de producción de anticuerpos monoclonales humanos (véase Cole y otros 1985, en Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., págs. 77-96), la técnica del hibridoma de células B humanas (véase Kozbor y otros 1983, Immunology Today 4:72), y la técnica del trioma.

En resumen, los anticuerpos monoclonales de la presente invención pueden prepararse administrando el inmunógeno (antígeno) de interés (es decir, GPC-1), por ejemplo, mediante inyección intraperitoneal, a ratones de tipo endogámico o salvaje (por ejemplo, ratones BALB/c o C57BL/6), conejos, ratas u otras especies animales, o ratones transgénicos capaces de producir anticuerpos nativos o humanos. Para inducir una respuesta inmune, el inmunógeno puede, por ejemplo, mezclarse con un adyuvante, administrarse solo, expresarse por un vector, administrarse como ADN o administrarse como una proteína de fusión. El animal puede estimularse, por ejemplo, al menos dos veces, y las células del bazo pueden cosecharse del animal inmunizado. Los hibridomas pueden generarse fusionando células del bazo sensibilizadas con una línea celular de mieloma (por ejemplo, células de mieloma SP2/O murinas con el uso de, por ejemplo, la metodología establecida en Kohler y Milstein y Harlow y Lane).

Una construcción antigénica GPC-1 de acuerdo con la presente invención (por ejemplo, una composición de vacuna que comprende la construcción antigénica GPC-1 en una forma farmacéuticamente aceptable) puede administrarse a un animal apropiado en dosificaciones repetidas (por ejemplo, entre 1-15 dosis, entre 2-10 dosis, entre 3-7 dosis, entre 4-6 dosis), durante un intervalo de tiempo apropiado (por ejemplo, entre 1-10 semanas, entre 1-6 semanas, entre 1-4 semanas o entre 2-3 semanas). La respuesta inmune del animal puede controlarse tomando muestras de suero en un momento adecuado después del refuerzo (por ejemplo, entre 3-10 días después del refuerzo, entre 4-8 días después del refuerzo, entre 5-6 días después del refuerzo), y después determinando el inmunogenicidad de la construcción antigénica con el uso de técnicas conocidas (por ejemplo, mediante ELISA). La inmunización de esta manera puede conducir a una respuesta inmune en los animales. Los animales con títulos terapéuticos son generalmente aquellos que proporcionan un resultado positivo mediante ELISA en una dilución apropiada (por ejemplo, entre 1:4.000 y 1:6.000, entre 1:4.500 y 1:5.500, o 1:5.000). Aquellos con títulos terapéuticos pueden seleccionarse para la fusión de sus células productoras de anticuerpos (linfocitos B) con una línea celular inmortal/de reproducción continua (por ejemplo, una línea

celular de mieloma). Puede inducirse la fusión de las células con el uso de un agente apropiado tal como polietilenglicol. Las células híbridas resultantes pueden clonarse entonces de una manera convencional (por ejemplo, con el uso de dilución limitante) y los clones generados se prueban para determinar la capacidad de producir los anticuerpos monoclonales anti-GPC-1 deseados en cultivo. Los hibridomas pueden seleccionarse químicamente colocando las células en un medio de selección que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT). Los hibridomas pueden seleccionarse para determinar la capacidad de producir anticuerpos monoclonales y los hibridomas positivos pueden clonarse, expandirse y almacenarse.

En realizaciones preferentes de la presente invención, el hibridoma es una población de células monoclonales capaz de producir una única especie de anticuerpo capaz de unirse específicamente a GPC-1. Ejemplos no limitantes de tales anticuerpos monoclonales se exponen en las secciones anteriores tituladas "*Anticuerpos monoclonales*" y "*Fragmentos de anticuerpos, derivados y variantes*".

En algunas realizaciones, un hibridoma de acuerdo con la presente invención puede ser el hibridoma presentado bajo los términos del Tratado de Budapest en Cellbank Australia en 214 Hawkesbury Road Westmead NSW 2145 Australia el 22 de agosto de 2014 con el número de acceso CBA20140026. Los procedimientos para el cultivo y la propagación de estas células de hibridoma para producir anticuerpos monoclonales de acuerdo con la presente invención son bien conocidos por los expertos en la técnica.

También se contemplan en la presente memoria cultivos celulares que comprenden células de hibridoma de la presente invención.

En algunas realizaciones, los cultivos celulares comprenden una especie individual (monoclonal) de células de hibridoma capaces de producir una sola especie de anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a GPC-1. Ejemplos no limitantes de tales anticuerpos monoclonales se exponen en las secciones anteriores tituladas "*Anticuerpos monoclonales*" y "*Fragmentos de anticuerpos, derivados y variantes*". Las especies individuales (monoclonales) de células de hibridoma pueden depositarse bajo los términos del Tratado de Budapest en Cellbank Australia con el número de acceso CBA20140026.

En algunas realizaciones, los cultivos celulares comprenden múltiples especies de células de hibridoma (es decir, poblaciones de células de hibridoma mixtas). La población mixta de células de hibridoma puede comprender una sola especie (monoclonal) de células de hibridoma capaces de producir una sola especie de anticuerpo que se une específicamente a GPC-1. Ejemplos no limitantes de tales anticuerpos monoclonales se exponen en las secciones anteriores tituladas "*Anticuerpos monoclonales*" y "*Fragmentos de anticuerpos, derivados y variantes*". Las especies individuales (monoclonales) de células de hibridoma pueden depositarse bajo los términos del Tratado de Budapest en Cellbank Australia con el número de acceso CBA20140026. La población mixta de células de hibridoma puede no comprender células de hibridoma depositadas en ATCC con el número de acceso HB11785 y/o células de hibridoma capaces de producir un anticuerpo que comprende;

una región variable de la cadena ligera que comprende uno o más de:

- una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 48-58 de la **SEQ ID NO: 6**;
- una región determinante de complementariedad 2 (CDR2) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 74-80 de la **SEQ ID NO: 6**;

una región determinante de complementariedad 3 (CDR3) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 113-121 de la **SEQ ID NO: 6**;

y/o una o más regiones variables de la cadena ligera FR (regiones marco) como se define por una secuencia seleccionada de uno cualquiera o más de: residuos 25-47 de la **SEQ ID NO: 6**, los residuos 59-73 de la **SEQ ID NO: 6**, los residuos 81-112 de la **SEQ ID NO: 6**, los residuos 122-131 de la **SEQ ID NO: 6**.

Procedimientos de producción de anticuerpos

Los procedimientos para la preparación de los anticuerpos monoclonales, derivados y variantes de los mismos, y fragmentos de unión al antígeno de los mismos están fácilmente disponibles y pueden ser realizados sin dificultad por expertos en la técnica.

Aparte del procedimiento de hibridoma de Kohler y otros (1975) y descrito anteriormente en la sección titulada "*Hibridomas*", otro procedimiento no limitante que puede utilizarse es la tecnología de ADN recombinante (véase, por ejemplo, patente de los Estados Unidos núm. 4816567). Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales, derivados y variantes de los mismos, y los fragmentos de unión al antígeno de los mismos, pueden producirse de forma recombinante en cualquier sistema de expresión bien establecido que incluye, pero no se limita a, baculovirus, levadura (por ejemplo *Pichia* sp., *Saccharomyces* sp.) *E. coli*, células de mamíferos, plantas o animales transgénicos (véase Breitling y Dubel, 1999, Recombinant Antibodies, John Wiley & Sons, Inc., NY, págs. 119-132).

En algunas realizaciones, las secuencias de ácido nucleico que codifican anticuerpos monoclonales, derivados y variantes de los mismos, y fragmentos de unión al antígeno de los mismos de acuerdo con la presente invención pueden usarse en procedimientos de producción basados en tecnologías de ADN recombinante. Los ejemplos no limitantes incluyen una secuencia de polinucleótidos de cadena pesada como se define en la **SEQ ID NO: 1** o una variante o fragmento de la misma, y/o una secuencia de polinucleótidos de cadena ligera como se define en la **SEQ ID NO: 2** o una variante o fragmento de la misma.

Un polinucleótido "variante" se refiere en la presente memoria a un polinucleótido que difiere en secuencia de un polinucleótido original o de referencia. La divergencia de la secuencia de polinucleótidos puede resultar de cambios mutacionales tales como deleciones, sustituciones o adiciones de uno o más nucleótidos. Cada uno de estos cambios puede producirse solo o en combinación, una o más veces en una secuencia dada. Un polinucleótido "variante" se refiere a un polinucleótido que tiene una secuencia sustancialmente similar a un polinucleótido original o de referencia. En general, dos secuencias son "sustancialmente similares" si las dos secuencias tienen un porcentaje especificado de nucleótidos que son iguales (porcentaje de "homología" de secuencia o "identidad" de secuencia). La homología o identidad de secuencia entre dos secuencias de polinucleótidos se define en la presente memoria como el porcentaje de nucleótidos en la secuencia candidata ("variante") que son idénticos a los de la secuencia de polinucleótidos original/de referencia, después de alinear las secuencias e introducir espacios, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad de secuencia. Si las dos secuencias que se van a comparar entre sí difieren en longitud, la identidad de la secuencia se relaciona con el porcentaje de nucleótidos de la secuencia más corta que son idénticos a los nucleótidos de la secuencia más larga. La identidad de secuencia puede determinarse convencionalmente con el uso de programas de computadora como el programa Bestfit (Paquete de análisis de secuencia de Wisconsin, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive Madison, Wis. 53711) y/o el programa "fasta20u66" (versión 2.0u66, septiembre de 1998 por William R. Pearson y la Universidad de Virginia; véase también WR Pearson (1990), *Methods in Enzymology* 183, 63-98). El grado de homología/identidad de secuencia entre el polinucleótido variante y el polinucleótido de referencia/original puede ser, por ejemplo, al menos 75 %, 80 %, 83 %, 85 %, 88 %, 90 %, 93 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %.

Un "fragmento" polinucleotídico es una molécula polinucleotídica que codifica un constituyente o es un constituyente de un polinucleótido original/de referencia grande. En general, el fragmento codificará un fragmento de un anticuerpo de la presente invención, siendo el fragmento capaz de unirse específicamente a GPC-1.

Los anticuerpos monoclonales, derivados y variantes de los mismos, y los fragmentos de unión al antígeno de los mismos producidos de acuerdo con la presente invención pueden aislarse de diversas fuentes con el uso de procedimientos apropiados que incluyen, pero no se limitan a, moléculas de unión a inmunoglobulina (por ejemplo, proteínas A, L, G o H), etiquetas unidas operativamente al anticuerpo o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, etiqueta His, etiqueta c-myc), cromatografía de afinidad y similares.

Los anticuerpos monoclonales, derivados y variantes de los mismos, y los fragmentos de unión al antígeno de los mismos, como se describe en la presente memoria, pueden producirse mediante hibridomas y/o cultivos celulares que comprenden poblaciones únicas o mixtas de hibridomas que incluyen, por ejemplo, los descritos en la sección anterior titulada "*Hibridomas*", después aislados con el uso de técnicas conocidas. En algunas realizaciones, los anticuerpos monoclonales pueden producirse cultivando una sola especie (monoclonal) de células de hibridoma depositadas bajo los términos del Tratado de Budapest en Cellbank Australia con el número de acceso CBA20140026, y aisladas del cultivo.

Los procedimientos para la preparación y cultivo de las líneas celulares de hibridoma y el aislamiento del anticuerpo producido son bien conocidos por los expertos en la técnica y son procedimientos estándar.

Composiciones y kits

Los anticuerpos monoclonales, derivados y variantes de los mismos, y fragmentos de unión al antígeno de los mismos de acuerdo con la presente invención, incluidos los descritos en las secciones anteriores tituladas "*Anticuerpos monoclonales*" y "*Fragmentos de anticuerpos, derivados y variantes*", pueden incluirse como componentes de kits y/o composiciones (por ejemplo, composiciones farmacéuticas).

A modo de ejemplo no limitante, los kits de la presente invención pueden comprender cualquiera o más de un anticuerpo, variante de anticuerpo, fragmento de anticuerpo, derivado de anticuerpo, anticuerpo quimérico o células de hibridoma de acuerdo con la presente invención, en cualquier combinación. Las células de hibridoma pueden depositarse en Cellbank Australia con el número de acceso CBA20140026.

Los kits pueden incluir adicionalmente cualquier número de componentes adicionales que incluyen, por ejemplo, reactivos para cultivo celular, muestras de referencia, tampones, marcadores e instrucciones escritas para realizar un ensayo de detección con el uso de los componentes del kit.

Los kits pueden ser kits fragmentados o combinados.

La presente invención también proporciona composiciones que comprenden uno cualquiera o más de un anticuerpo, variante de anticuerpo, fragmento de anticuerpo, derivado de anticuerpo, anticuerpo quimérico o células de hibridoma de acuerdo con la presente invención.

5 A modo de ejemplo no limitante, las composiciones de acuerdo con la presente invención pueden comprender uno o más de un anticuerpo, variante de anticuerpo, fragmento de anticuerpo, derivado de anticuerpo, anticuerpo quimérico o células de hibridoma de acuerdo con la presente invención, en cualquier combinación. Las células de hibridoma pueden depositarse en Cellbank Australia con el número de acceso CBA20140026.

10 Las composiciones pueden ser composiciones farmacéuticas. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender un diluyente farmacéuticamente aceptable, excipiente y/o vehículo, como conocen los expertos en la técnica. Para preparar las composiciones farmacéuticas, los componentes que se incluirán pueden mezclarse con el diluyente, vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences y US Pharmacopeia: National Formulary, Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1984)). Las formulaciones de agentes terapéuticos y de diagnóstico pueden prepararse mezclando con vehículos, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables en forma de, por ejemplo, soluciones o suspensiones acuosas, polvos liofilizados, suspensiones (véase, Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, Nueva York, N.Y.; Weiner y Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y.; Avis y otros (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, y otros (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Hardman, y otros (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, Nueva York, N.Y.; Lieberman, y otros (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY).

Procedimientos de detección

25 La presente invención proporciona procedimientos para detectar y/o cuantificar la expresión de la proteína GPC-1 en un sujeto (por ejemplo, por células de un sujeto). Los procedimientos comprenden obtener células, una muestra de tejido y/o una muestra de fluido corporal del sujeto, poner en contacto las células, la muestra de tejido y/o fluido corporal con un anticuerpo, variante de anticuerpo, fragmento de anticuerpo, derivado de anticuerpo o anticuerpo quimérico, de acuerdo con a la presente invención (por ejemplo, las descritas en las secciones anteriores tituladas "*Anticuerpos monoclonales*" y "*Fragmentos de anticuerpos, derivados y variantes*") y determinar y/o cuantificar la unión de dicho anticuerpo, variante de anticuerpo, fragmento de anticuerpo, derivado de anticuerpo o anticuerpo quimérico a las células, muestra de tejido o muestra de fluido corporal del sujeto.

35 El GPC-1 para detección puede estar presente en la superficie de las células y/o expresarse internamente. El fluido corporal puede ser orina. Las células o la muestra de tejido pueden ser células prostáticas o tejido prostático. La detección y/o cuantificación de la expresión de GPC-1 puede llevarse a cabo con el uso de cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo, por ejemplo, citometría de flujo y/o ELISA.

40 En algunas realizaciones, los anticuerpos, variantes de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, derivados de anticuerpos o anticuerpos quiméricos, utilizados en los procedimientos, son producidos por un hibridoma de acuerdo con la presente invención (por ejemplo, un hibridoma descrito en la sección anterior titulada "*Hibridomas*"). En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal producido por células de hibridoma depositadas en Cellbank Australia con el número de acceso CBA20140026.

45 En algunas realizaciones, se aplica una solución que comprende una única especie de anticuerpos, variantes de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, derivados de anticuerpos o anticuerpos quiméricos, capaces de detectar GPC-1 a las células, tejidos y/o muestra de fluido corporal que potencialmente puede contener GPC-1. La especie única puede ser producida por células de hibridoma depositadas en Cellbank Australia con el número de acceso CBA20140026.

50 Alternativamente, una solución que comprende múltiples especies de anticuerpos, variantes de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, derivados de anticuerpos y/o anticuerpos quiméricos, puede aplicarse a las células, tejidos y/o muestras de fluidos corporales que pueden contener GPC-1, en el que al menos una especie en la solución es capaz de detectar GPC-1. La especie capaz de detectar GPC-1 puede ser producida por células de hibridoma depositadas en Cellbank Australia con el número de acceso CBA20140026. En tales realizaciones, la solución que comprende múltiples especies no comprende un anticuerpo producido por células de hibridoma depositadas en la Colección Americana de Cultivos Tipo de Tejidos (ATCC) con el número de acceso HB11785 y/o células de hibridoma capaces de producir un anticuerpo que comprende;

60 una región variable de la cadena ligera que comprende uno o más de:

una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 48-58 de la **SEQ ID NO: 6**;

una región determinante de complementariedad 2 (CDR2) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 74-80 de la **SEQ ID NO: 6**;

65 una región determinante de complementariedad 3 (CDR3) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 113-121 de la **SEQ ID NO: 6**;

y/o

una o más región variable de la cadena ligera FR (regiones marco) como se define por una secuencia seleccionada de uno cualquiera o más de: residuos 25-47 de la **SEQ ID NO: 6**, los residuos de 59-73 de la **SEQ ID NO: 6**, los residuos de 81-112 de la **SEQ ID NO: 6**, los residuos de 122-131 de la **SEQ ID NO: 6**.

En algunas realizaciones, el nivel de expresión de GPC-1 detectado en las células, la muestra de tejido y/o fluido corporal obtenida del sujeto puede compararse con una muestra de células de control o una población de muestras de referencia de niveles de expresión de GPC-1. En algunas realizaciones, una determinación del aumento de la expresión de GPC-1 en el sujeto en comparación con el control o la referencia puede ser diagnóstico de una enfermedad, o, una mayor probabilidad de desarrollar una enfermedad, en el sujeto. La enfermedad puede ser cáncer de próstata.

Los expertos en la técnica apreciarán que pueden realizarse numerosas variaciones y/o modificaciones a la presente invención como se divulgó en las realizaciones específicas sin apartarse del espíritu o ámbito de la presente invención como se describe ampliamente. Por lo tanto, las presentes realizaciones deben considerarse en todos los aspectos como ilustrativas y no restrictivas.

Ejemplos

La presente invención se describirá ahora con referencia a ejemplos específicos, que no deben interpretarse de ningún modo como limitantes.

Ejemplo 1: análisis de anticuerpos de poblaciones de hibridoma MIL-38

1.1 Materiales y procedimientos

- preparaciones de anticuerpos MIL-38

Las preparaciones de los hibridomas de anticuerpos MIL-38 se obtuvieron de las siguientes fuentes:

(i) Se usaron reservas de células internas del hibridoma BLCA-38 para generar una serie de preparaciones de anticuerpos MIL-38 designadas 16A, 16B, 16C, 17B, 23A-1, 23A-2, 24A, 25A, 25B, 26B, 30A, 31A, 31B, 31C, 31D, 32B, 32C, 33A, 33B, 33C, 33D, 34A, 34B, 35A, 35C, 35D, 40A, 40B.

(ii) Se usó un lote de células de las reservas internas para generar preparaciones de hibridoma MIL-38 AusMAb 1 y 2 (AM-1 y AM-2).

(iii) Se recuperó del ATCC un vial del depósito original del hibridoma BLCA-38 (número de acceso HB11785: hibridoma murino BLCA-38). Este se cultivó y se prepararon reservas de células internas. Las preparaciones de anticuerpos de esta reserva original se denominaron "Original" (1-O) y "Original IIA";

(iv) Se usó un vial de las células "Original" para generar la preparación de anticuerpos AusMAb 3 (AM-3) y posteriormente las preparaciones de anticuerpos AusMAb 4 y 5 (AM-4, AM-5). Las células usadas para generar AusMAb3 y las células usadas para generar AusMAb 4 y 5 se congelaron por separado en dos lotes.

(v) A partir de estas células congeladas, se generó una preparación denominada "Alfio I" a partir de la reserva celular usada para preparar AM-4 y AM-5, y se generó una preparación denominada "Alfio II" a partir de la reserva celular usada para generar AM -3.

(vi) Se usó un congelamiento de paso temprano (<6) de células del depósito original del hibridoma BLCA-38 (HB11785) para realizar la clonación de células individuales y proporcionar una serie de clones para caracterizar. El clon MIL-38 1F5 fue seleccionado y depositado en CellBank Australia con el número de depósito CBA20140026.

La reserva de hibridoma usada como base para generar las preparaciones descritas en (i) - (vi) anteriormente se preparó como se describe en la patente de los Estados Unidos núm. 5,622,8361 de Walker y otros, cuyo contenido completo se incorpora en la presente memoria por referencia cruzada.

Para la purificación del anticuerpo MIL-38, las reservas celulares congeladas se descongelaron rápidamente seguido de resuspensión en medio RPMI 1640 y se dejaron crecer a 37 °C con 5 % de CO₂ por 24 h. Las células se expandieron, dividieron y escalaron en un procedimiento secuencial. En cada paso, las células se resuspendieron en medio nuevo y se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂. Después del escalado, las células se transfirieron a medio estéril libre de suero y se cultivaron hasta el comienzo de la fase de muerte. El sobrenadante se cosechó para recoger el anticuerpo MIL-38 y se esterilizó por filtración. El sobrenadante de anticuerpo se almacenó a -80 °C hasta que se requirió. El anticuerpo se purificó con el uso de la proteína G de Pierce de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Las células usadas para generar los clones de AusMab AM-1-AM-5 se prepararon como sigue. Las células fueron revividas en DMEM + FCS al 10 %. Una vez que crecieron bien, fueron clonados (véase abajo), expandidos y congelados. A continuación, a las células se les extrajo el FCS y se transfirieron al medio libre de suero Gibco HSFM (la extracción típicamente tomó 5 días).

Antes de sembrar células en un biorreactor, se realizó una dilución en serie modificada para obtener células individuales por pocillo en placas de 96 pocillos. Se usó medio acondicionado para promover el crecimiento de células individuales. Se observaron pocillos individuales 3 días después de plaquear y se contó un número de 4-8 colonias de células por pozo. Solo los pocillos que contenían una sola colonia se seleccionaron para la expansión. La expresión del anticuerpo se confirmó antes de la expansión.

Después de la expansión, una parte de las células se transfirió a un biorreactor Integra de dos compartimientos mientras que las células restantes se congelaron. Las células se cultivaron en el biorreactor de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de la cosecha, el anticuerpo se purificó con el uso de técnicas estándar.

- transferencia Western y análisis en gel Sypro

Extracción de proteínas: Las células DU-145 (antígeno MIL-38 positivo) o C3 (antígeno MIL-38 negativo) se cultivaron de acuerdo con técnicas estándar de cultivo de tejido. Las proteínas de la membrana celular se enriquecieron con el uso del kit de extracción de proteínas de membrana nativa Merck Millipore ProteoExtract (MPEK) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Transferencia: Los geles se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante 10 minutos a 2,5 A y 25 V como máximo con el uso del sistema Transblot Turbo (Biorad).

Transferencia Western: Brevemente, después de la transferencia, las membranas se bloquearon con leche descremada al 5 % en PBS-Tween (0,1 %) durante 2 horas a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios (1 µg/ml en leche descremada al 5 % - PBS-Tween (0,1 %)) se aplicaron e incubaron durante la noche a 4 °C. Después del lavado (3x 10 min PBS-Tween (0,1 %)) las membranas se incubaron con anticuerpo secundario (1:2.000 de anti-ratón de cabra marcado con HRP en leche descremada al 5 % - PBS-Tween (0,1 %)). Después del lavado (3x 10 min PBS-Tween (0,1 %)) se detectó el antígeno con el uso del kit de detección ECL (Biorad) y la formación de imágenes con LAS4000 mini (GE Life Science).

Geles Sypro: Los geles se fijaron en solución de fijación (etanol al 10 %, ácido acético al 7 %) durante 2h antes de ser transferidos a la tinción de proteína Sypro®Ruby y se incubaron durante la noche a temperatura ambiente en la oscuridad. Antes de la formación de imágenes, los geles se enjuagaron y lavaron con una solución desteñidora (etanol al 10 %, ácido acético al 7 %) durante un mínimo de 2 h. Las imágenes se realizaron con un escáner Pharos X.

- Ensayo de Inmunofluorescencia (IFA)

IFA: Las células se cultivaron en cubreobjetos hasta un 75 % de confluencia y se colocaron en placas de 6 pocillos. Las células se lavaron con PBS seguido de fijación con acetona. Las células se lavaron nuevamente con PBS seguido de incubación con TBS y después se bloquearon con PBS que contenía leche descremada al 5 %. A continuación, las células se incubaron en la oscuridad con MIL-38, MIL-38 quimérico o Cetuximab, seguido de incubación con un anticuerpo anti-ratón de cabra o anti-humano de cabra marcado con FITC o Alexa488. Ambos anticuerpos se prepararon en PBS que contenía leche descremada al 1 %. El lavado con PBS se realizó entre las incubaciones de anticuerpos primarios y secundarios. Después de la incubación secundaria, las células se lavaron con PBS que contenía DAPI y se visualizaron para fluorescencia verde (MIL-38 positivo).

- Electroforesis SDS-PAGE

SDS-PAGE: Las muestras se mezclaron con tampón de muestra no reductor que contenía SDS y se cargaron en un gel de poliacrilamida prefabricado al 4-15 % (Criterio TGX; Biorad). Los geles se corrieron durante 10 minutos a 80 V y 50 minutos adicionales a 200 V en tampón de corrida Tris-Glycine.

1.2 Resultados

- transferencia Western

Las preparaciones de anticuerpos MIL-38 derivados de las siguientes fuentes se compararon una al lado de la otra:

- (i) células de hibridoma del ATCC (preparación 1-O, "original");
- (ii) dos preparaciones separadas de anticuerpos producidos a partir de células de hibridoma mantenidas por la empresa solicitante (preparaciones 37A y 40A);

Se observó reactividad en la transferencia Western equivalente para las tres preparaciones (**Figura 1**). Las tres preparaciones proporcionaron una doble banda para la cadena pesada y ligera, lo que sugiere una población no clonal.

- Ensayo de Inmunofluorescencia (IFA)

Las diferentes preparaciones de anticuerpos ("I-Original" (1-O), 40A y 37A) usadas en una variedad de líneas celulares proporcionaron una reactividad de IFA equivalente (**Tabla 1**).

Tabla 1: Reactividad de IFA de diferentes preparaciones de anticuerpos MIL-38 en diversas líneas celulares

Muestra	1° Ab (MIL-38)	2° Ab	Reacción	Comentarios
DU145	37A		3+	
	40A		3+	
	Original		4+	
	-		-	Fluorescencia amarilla.
PZHPV7	37A		2+	
	40A		2+	
	Original		2+	
	-		-	Fluorescencia amarilla
	37A	3+		
	40A	2+		

NB: - los anticuerpos de las preparaciones 1-O ("1 -Original"), 40A y 37A se usaron en IFA en un rango de líneas celulares - se observó una reactividad de IFA comparable para las tres preparaciones

- Análisis de diferentes preparaciones de anticuerpos MIL-38

El tamaño y la reactividad de las preparaciones de anticuerpos MIL-38 procedentes de las preparaciones AM-1-AM-5 (generadas por AusMab Pty Ltd) y la preparación de anticuerpos MIL-38 interna 33A se compararon mediante SDS-PAGE (**Figura 2A**) y transferencia Western (**Figura 2B**).

La preparación interna de anticuerpos MIL-38 exhibió una doble banda tanto para la cadena pesada como ligera, lo que sugiere una población no clonal (véase la **Figura 2A**). Las preparaciones de anticuerpos AusMab MIL-38 (AusMab 1, AusMab 3, AusMab 4, AusMab 5) mostraron bandas individuales para cadenas pesadas y ligeras. La preparación de anticuerpos MIL-38 33A mostró una doble banda tanto para la cadena pesada como ligera, lo que sugiere una población no clonal. En particular, las bandas AusMab 3 exhibieron un MW más alto que AusMab 1, AusMab 4, AusMab 5 y 33A, lo que sugiere la existencia de dos poblaciones clonales distintas en las reservas de 1-O fuente.

Los anticuerpos AusMab 3 (AM-3) tampoco reaccionaron con el antígeno MIL-38, mientras que los anticuerpos AusMab 1, AusMab 4, AusMab 5 y la preparación 33A sí lo hicieron (**Figura 2B**).

- Análisis de preparaciones internas de MIL-38 adicionales

La electroforesis SDS-PAGE se usó para analizar el MW de cadena ligera y pesada de varias otras preparaciones de anticuerpos MIL-38 generadas a partir de reservas de hibridoma BLCA-38 y almacenadas internamente. Se observaron bandas dobles para cadenas pesadas y ligeras en todas las preparaciones (**Figura 3A**). En contraste, la preparación de anticuerpos AusMab 4 (AM-4) mostró bandas individuales para cadenas pesadas y ligeras.

La reactividad de la transferencia Western de varias preparaciones de anticuerpos MIL-38 internas para el extracto de MPEK DU-145 fue consistente en todas las preparaciones. AusMab 4 (AM-4) reaccionó al extracto de DU-145 MPEK, mientras que AusMab 3 (AM-3) no reaccionó al extracto de DU-145 MPEK (**Figura 3B**).

1.2 Discusión

A partir de estos resultados, es evidente que las reservas de hibridoma MIL-38 de las reservas internas y de ATCC contenían una población mixta de células. La clonación de las dos poblaciones identificables (poblaciones de AusMab) dio dos anticuerpos de diferentes pesos moleculares. Una de estas dos especies de anticuerpos no es reactiva al antígeno MIL-38, mientras que la otra muestra una reactividad equivalente a MIL-38 producida a partir de la población mixta.

Ejemplo 2: análisis de poblaciones adicionales de anticuerpos MIL-38

2.1 Materiales y procedimientos

- Preparación de anticuerpos MIL-38

Se usaron preparaciones de poblaciones de células de hibridoma congeladas derivadas de AusMab 3 (AM-3) o AusMab 4 (AM-4) y AusMab 5 (AM-5). Las células usadas en la derivación de AM-3 se denominaron "Alfio II". Después de la detección que indica que AM-3 no era reactivo a los extractos de MPEK DU-145, se investigaron las reservas de pases anteriores para identificar un clon positivo. Estas células de paso temprano se usaron para obtener AM-4 y se denominaron "Alfio I". Ambas reservas de células se mantuvieron para su almacenamiento y para permitir la producción interna del anticuerpo MIL-38.

Para la producción por lotes MIL-38 de Original IIA, Alfio I y Alfio II, las existencias se descongelaron rápidamente seguido de resuspensión en medio RPMI 1640 y se dejó crecer a 37 ° C con 5 % de CO₂ por 24 h. Las células se expandieron, dividieron y escalaron en un procedimiento secuencial. En cada paso, las células se resuspendieron en medio nuevo y se incubaron a 37 ° C con 5 % de CO₂. Después de la ampliación, las células se transfirieron a medio estéril libre de suero y se cultivaron hasta el comienzo de la fase de muerte. El sobrenadante se recogió para recoger el anticuerpo MIL-38 y se esterilizó por filtración. El sobrenadante de anticuerpo se almacenó a -80 ° C hasta que se requirió. El anticuerpo se purificó con el uso de proteína G de Pierce de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

- transferencia Western y geles Sypro

El ensayo de la transferencia Western y la preparación de geles Sypro se realizaron esencialmente de acuerdo con los métodos establecidos en **Ejemplo 1** arriba (véase la sección 1.1)

El ensayo de transferencia Western se realizó bajo las siguientes condiciones:

4-12 % de gel Bis-Tris

Bloqueo: durante la noche

Régimen de la transferencia Western: Anticuerpo primario 1hr, 10 µg por pieza de membrana,

Lavados 3x 10 minutos,

Anticuerpo secundario 1 hora, anticuerpo secundario 1/2.000 Cabra-ratón HRP

Células: probadas contra extractos de MPEK DU-145 y C3

- Ensayos de Inmunofluorescencia

Los ensayos de inmunofluorescencia se realizaron esencialmente de acuerdo con los procedimientos establecidos en el **Ejemplo 1** anterior (véase la sección 1.1)

2.2 Resultados

- transferencias Western

La reactividad de la transferencia Western de Alfio I, Alfio II, 36A, AusMab y "original IIA" (una preparación MIL-38 preparada a partir de células de hibridoma de ATCC HB11785) se probó en extractos de células DU-145 y C3 MPEK.

La reactividad de la transferencia Western de Alfio II se parecía a la de la preparación AM-3 (**Figura 4A**). Original IIA y Alfio I se parecían a la preparación 36A (Biclonal interna) (**Figura 4A**).

- Análisis de gel Sypro

Las bandas dobles en las fracciones de cadena pesada separadas no eran tan claras como se observó anteriormente, mientras que las bandas duales en fracciones de cadena ligera separadas se podían distinguir claramente. Las fracciones separadas de la cadena ligera de las preparaciones originales de anticuerpos IIA, Alfio I y 36A MIL-38 contenían dos bandas. Por el contrario, la fracción de cadena ligera separada de Alfio II contenía una sola especie de cadena ligera, con un MW más alto (es decir, como la preparación del anticuerpo AM-3 MIL-38). Tenga en cuenta que se cargó más anticuerpo Alfio II en el gel que para los otros anticuerpos, lo que dio como resultado una banda más amplia para la especie de cadena ligera. Las fracciones de cadena pesada y ligera separadas del anticuerpo AM-4 MIL-38 fueron claramente distintas de las formas biclonales o similares a AM-3 (**Figura 4B**).

- Ensayo de Inmunofluorescencia

De acuerdo con los resultados de la transferencia Western, el análisis IFA de las células DU-145 mostró que AM-4, Alfio I y IIA original dieron buena reactividad IFA, mientras que Alfio II (equivalente a AM-3 en la transferencia western) no mostró reactividad en IFA (**Figura 5A**). No se observó reactividad de ninguna preparación con la línea celular de control negativo C3 (**Figura 5B**).

2.3 Discusión

Estos análisis indican que Alfio I es una población biclonal de anticuerpos MIL-38, mientras que Alfio II es una población de anticuerpos tipo AM-3 (monoclonal), y confirman además que la preparación de anticuerpos MIL-38 AM-4 es una población de anticuerpos monoclonales.

- 5 Por lo tanto, es evidente que las poblaciones de anticuerpos biconales MIL-38 como Alfio I contienen una mezcla de las distintas poblaciones de anticuerpos monoclonales AM-3 y AM-4.

Ejemplo 3: comparación de poblaciones de anticuerpos MIL-38 para el ensayo ELISA

10 3.1 Materiales y procedimientos

Placas de noventa y seis pocillos fueron revestidas con preparaciones AM-3 o AM-4 de MIL-38 (1 µg/pocillo) en tampón de carbonato pH 9,5 durante la noche. Las placas se bloquearon con PBS-Tween (0,1 %) que contenía leche descremada al 5 % a 37 ° C y se lavaron. Antígeno (GPC-1 recombinante humano producido a partir de células NS0) diluido en Tampón II (HEPES 20mM pH 7,5, EDTA 0,5mM, Tritón X-100 al 0,5 %) con la adición de NaCl 150mM e incubado durante la noche a 37 ° C. La detección se realizó con AM-4 biotinilado seguido de detección con avidina HRP (1 µg/ml). Se añadió TMB (Sigma núm. de cat. T0440) y se detuvo con solución de parada TMB (Sigma S5814). La absorbancia se leyó a 450 nm. Los resultados se muestran en la **Figura 6A**.

20 En un segundo experimento, se revistieron placas de noventa y seis pocillos con preparaciones MIL-38 34A o AM-4 (2,5 µg/pocillo) en PBS pH 7,2 durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se bloquearon con Blocker Casein (Thermo) en PBS-Tween (0,05 %) durante 1 hora a 37 ° C. Después del lavado, el antígeno (GPC-1 NS0) se diluyó en TBS pH 7,2 que contenía Tricina 50mM y NaCl 150mM y se incubó a 37 ° C durante 1 h. La detección se realizó con el clon 1F5 de AM-4 biotinilado seguido de la detección con avidina HRP (1 µg/ml). Se añadió TMB (Sigma núm. de cat. T0440) y se detuvo con solución de parada TMB (Sigma S5814). La absorbancia se leyó a 450 nm. Los resultados se muestran en la **Figura 6B**.

3.2.1 Resultados

30 El primer ELISA descrito anteriormente se desarrolló con el uso de MIL-38 para capturar GPC-1 recombinante producido por NS0 (es decir, antígeno MIL-38). Este experimento comparó el monoclonal AM-3 MIL-38 y el monoclonal AM-4 MIL-38 para la captura. AM-3 no funcionó como agente de captura en un ensayo ELISA tipo sándwich (**Figura 6A**).

35 El segundo ELISA descrito anteriormente comparó la señal de ELISA obtenida cuando se comparó una población mixta de MIL-38 (34A) con la obtenida de un clon monoclonal AM-4-1F5. El uso de AM-4 1F5 como agente de captura proporcionó una señal ELISA más alta que el uso de la población mixta de anticuerpos 34A (**Figura 6B**).

3.2.2 Discusión

40 Los resultados de ELISA en sándwich demuestran que solo las formas similares a AM-4 del anticuerpo monoclonal MIL-38 tienen utilidad para detectar el antígeno como reactivo de captura y que un agente de captura que contiene una población monoclonal proporciona una señal de ELISA superior a la que consiste en una mezcla población.

Ejemplo 4: análisis de secuencia de poblaciones de anticuerpos MIL-38

45 4.1 Materiales y procedimientos

- Secuenciación de cadenas pesadas y ligeras (ADN)

50 Se realizaron tres ejecuciones de secuenciación separadas. La primera prueba (codificada 224945) utilizó células de hibridoma bi-clonales de la preparación 1-O. La segunda corrida (codificada 449295-1) utilizó células de Alfio I, una muestra existente de hibridoma que se usó para generar AM-4. La tercera corrida (codificada 449295-5) utilizó células de Alfio II, una muestra existente de hibridoma que se usó para generar AM-3.

55 Para las secuencias 224945 (1-O) y 449295-1 (Alfio I), el ARN total se extrajo de las células de hibridoma congeladas y el ADNc se sintetizó a partir del ARN. A continuación se realizó la PCR para amplificar las regiones variables (cadenas pesadas y ligeras) y las regiones constantes del anticuerpo, que después se clonaron en un vector de clonación estándar por separado y se secuenciaron.

60 El ARN total se aisló de las células de hibridoma siguiendo el manual técnico del Sistema de purificación de ARN TRIzol® Plus. El ARN total se analizó por electroforesis en gel de agarosa.

65 El ARN total se transcribió inversamente en ADNc usando cebadores antisentido específicos de isotipo o cebadores universales siguiendo el manual técnico del Sistema de síntesis de primer filamento SuperScript™ III. Los fragmentos de anticuerpos de V_H, V_L, C_H y C_L se amplificaron de acuerdo con el procedimiento de operación estándar de RACE de GenScript.

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

5 Se realizó un examen de PCR de colonias para identificar clones con insertos de tamaños correctos. Se secuenciaron no menos de cinco colonias individuales con insertos de tamaños correctos para cada fragmento de anticuerpo.

10 Los plásmidos V_H y V_L codificaron la longitud completa de las regiones variables del anticuerpo y una parte de C_{H1} y C_L . El plásmido C_H codificó una parte de C_{H1} y la secuencia completa de C_{H2} y C_{H3} . El plásmido C_L codificó una parte de C_L . Para obtener regiones constantes de longitud completa o cadena pesada/ligera, la parte de las regiones constantes codificadas por los plásmidos V_H y V_L y la parte de regiones constantes codificadas por C_H y C_L los plásmidos se amplificaron por PCR por separado, y después se empleó la PCR de extensión solapada para obtener ADN de longitud completa. Cinco colonias individuales con correctos tamaños de inserto de V_H , V_L , C_H y C_L se enviaron para secuenciación.

15 La secuencia de ejecución 449295-5 (Alfio II) encontró dificultades para obtener la secuencia correspondiente a la secuencia esperada de la cadena pesada de IgG1. Se realizaron dos preparaciones de ARN. Para el 1er lote de células, se usaron el cebador oligo-dT y los cebadores CDS III para la transcripción inversa (RT). V_H/C_H y V_K/C_K se amplificaron por PCR con el uso de IgG1 y cebadores específicos de IgK , el gen parcial de β -actina de ratón se amplificó como control positivo. Se obtuvieron fácilmente bandas de cadena ligera normales mientras que solo V_H se pudo observar en
20 el gel débilmente. Cinco colonias individuales con tamaños de inserto de V_K y C_K correctos se enviaron para secuenciación. Se encontró que los genes de V_K y C_K de cinco clones diferentes eran casi idénticos. Las secuencias de consenso de la cadena ligera del hibridoma Alfio II se enumeran a continuación. Se obtuvo una secuencia de cadena pesada improductiva de ocho clones positivos de V_H secuenciados al azar, que se muestran a continuación. Se obtuvieron tres tipos de secuencias de la región constante de la cadena pesada de diez clones positivos de C_H
25 secuenciados al azar (una IgG_{1C_H} , una IgG_{2aC_H} y ocho IgG_{2bC_H}). Para evitar la influencia del cambio de clase potencial, para la amplificación de la C_H se utilizó un cebador específico de IgM, pero no se obtuvo un producto de PCR objetivo. Tampoco hubo un producto de PCR objetivo cuando la cadena pesada de longitud completa (V_H-C_H) se amplificó utilizando cebadores degenerados FR1 de cadena pesada.

30 Como no se pudo obtener una cadena pesada productiva después de varios intentos, se intentó aislar la secuencia de la cadena pesada del 2do vial de células Alfio II. Para el 2do vial de células, inicialmente se usó el cebador oligo-dT para la transcripción inversa. V_H se amplificó usando cebadores específicos de IgG1, IgG2b, IgM, IgA y cebador degenerado de IgG, respectivamente, y V_K se amplificó con el uso de cebadores específicos de IgK . Se obtuvieron la cadena ligera productiva y la cadena pesada no productiva, que eran idénticas a los resultados anteriores. La transcripción inversa
35 con el uso de cebadores de 6 mers aleatorios también se intentó sin éxito.

40 En sumario, se realizaron múltiples intentos para aislar la secuencia de la cadena ligera y la cadena pesada. Una secuencia de cadena ligera reordenada se obtuvo de manera consistente después de diferentes intentos en dos lotes de células. Sin embargo, solo productos débiles objetivos de PCR de V_H se observaron y la secuenciación no dio como resultado ninguna secuencia de cadena pesada consistente.

Resultados

- *Tabla sumario de secuencias*

45 **La Tabla 2** a continuación ofrece una descripción general de las secuencias de proteínas y ácido nucleico de cadena pesada y ligera de los anticuerpos estudiados, indicando las posiciones de varias regiones internas.

50

55

60

Tabla 2: Resumen de secuencias de anticuerpos y regiones internas

ADN Seq ID#	Líder	HFR1	HCDR1	HFR2	HCDR2	HFR3	HCDR3	HFR4	CH1-CH3	Bisagra
1	Pesada AM4	58-147	148-162	163-204	205-255	256-351	352-378	379-411	412-1383	703-741
7	Pesada Quimérico	58-147	148-162	163-204	205-255	256-351	352-378	379-411	412-1401	706-750
	Líder	LFR1	LCDR1	LFR2	LCDR2	LFR3	LCDR3	LFR4	CL	
2	Ligera AM4	61-129	130-162	163-207	208-228	229-324	325-351	352-381	382-702	
5	Ligera AM3	73-141	142-174	175-219	220-240	241-336	337-363	364-393	394-714	
8	Ligera Quimérico	61-129	130-162	163-207	208-228	229-324	325-351	352-381	382-702	
	Líder	HFR1	HCDR1	HFR2	HCDR2	HFR3	HCDR3	HFR4	CH	Bisagra
3	Pesada AM4	20-49	50-54	55-68	69-85	86-117	118-126	127-137	138-461	235-247
9	Pesada Quimérico	20-49	50-54	55-68	69-85	86-117	118-126	127-137	138-467	236-250
	Líder	LFR1	LCDR1	LFR2	LCDR2	LFR3	LCDR3	LFR4	CL	
4	Ligera AM4	21-43	44-54	55-69	70-76	77-108	109-117	118-127	128-234	
6	Ligera AM3	25-47	48-58	59-73	74-80	81-112	113-121	122-131	132-238	
10	Ligera Quimérico	21-43	44-54	55-69	70-76	77-108	109-117	118-127	128-234	

Notas: HFR = región marco de cadena pesada; HCDR = región determinante de complementariedad de cadena pesada;

CH = región constante de cadena pesada; LFR = región marco de cadena pesada; LCDR = región determinante de complementariedad de cadena ligera;

Celdas grises son indicativo de posiciones dentro de secuencia definida en columna I por SEQ ID NO

- Secuenciación (ADN)

El ARN total aislado de la muestra se procesó junto con un marcador de ADN (Marcador III - TIANGEN, núm. de catálogo: MD103) en un gel de agarosa/GelRed™ al 1,5 %.

Se corrieron cuatro microlitros de productos de PCR de cada muestra junto con el marcador de ADN (Marker III) en un gel de agarosa/GelRed™ al 1,5 %. Los productos de PCR se purificaron y almacenaron a -20 °C hasta su uso posterior.

Los genes de V_H, V_L, C_H y C_L de cinco clones diferentes eran casi idénticos. Se determinó que la secuencia de consenso, que se enumera a continuación, es la secuencia del anticuerpo producido por la población de hibridoma monoclonal (AM-4).

Secuencia consenso de ADN de la cadena pesada de IgG1 de ratón AM-4 MIL-38 (SEQ ID NO:1)

15 ATGGCTTGGGTGTGGACCTTGCTATTCCCTGATGGCTGCTGCCCAAAGTATCCAAGCA CAGATCCAGTTGGTG
 CAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTATGCCTTC
 ACAGACTATTCAATGAAC TGGGTGAAGCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTAAGGTGGATGGGCTGGATAAACACT
 20 GAGACTGGTGAGCCAACATATACAGATGACTTCAAGGGA CGGTTTGCCTTCTCTTTGAAACCTCTGCCAGC
 ACTGCCTTTTTGCAGATCAACAACCTCAGAAATGAAGACACGGCTACATATTTCTGTGCTAGA CACTATGAT
 TACGGGGGGTTTCCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAGCCAAAACGACACCCCATCT
 25 GTCTATCCACTGGCCCTGGATCTGCTGCCCAAATAACTCCATGGTGACCCTGGGATGCCTGGTCAAGGGC
 TATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACCTCTGGATCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTTCCCAGCT
 GTCCTGCAGTCTGACCTCTACACTCTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCTCCAGCACCTGGCCCAGCGAGACC
 30 GTCACCTGCAACGTTGCCACCCGGCCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCAGGGATTGTGGT
 TGTAAAGCCTTGCATATGTACAGTCCCAGAAGTATCATCTGTCTTCATCTTCCCCCAAAGCCCAAGGATGTG
 CTCACCATTACTCTGACTCCTAAGGTCACGTGTGTGTGGTAGACATCAGCAAGGATGATCCCGAGGTCCAG
 35 TTCAGCTGGTTGTAGATGATGTGGAGGTGCACACAGCTCAGACGCAACCCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGC
 ACTTTCCGCTCAGTCAGTGAACCTCCCATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTCAAATGCAGG
 GTCAACAGTGCAGCTTCCCTGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGCAGACCGAAGGCTCCA
 40 CAGGTGTACACCATCCACCTCCCAAGGAGCAGATGGCCAAGGATAAAGTCAGTCTGACCTGCATGATAACA
 GACTTCTTCCCTGAAGACATTACTGTGGAGTGGCAGTGGAAATGGGCAGCCAGCGGAGAACTACAAGAACACT
 CAGCCCATCATGGACACAGATGGCTCTTACTTCGTCTACAGCAAGCTCAATGTGCAGAAGAGCAACTGGGAG
 45 GCAGGAAATACTTTACCTGCTCTGTGTTACATGAGGGCTGCACAACCACCATCTGAGAAGAGCCTCTCC
 CACTCTCCGGTAAATGA

Las regiones individuales de la secuencia codificada de la cadena pesada de ratón se resaltan alternando texto sombreado/texto sin sombrear. Posiciones: 1-57 = secuencia líder; 58-147 = región marco (HFR1); 148-162 = región determinante de complementariedad (HCDR1); 163-204 = HFR2; 205-255 = HCDR2; 256-351 = HFR3; 352-378 = HCDR3; 379-411 = HFR4; 412-1383 = regiones constantes (CH1-CH3); 703-741 = región de bisagra (subrayado); 1384-1386 = codón de parada.

Secuencia consenso de ADN de cadena ligera Kappa de ratón AM-4 MIL-38 (SEQ ID NO:2)

60
65

ATGAGTGTGCTCACTCAGGTCCCTGGCGTTGCTGCTGCTGTGGCTTACAGGTGCCAGATGTGACATCCAGATG
 ACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGAGAAACTGTCACCATCACATGTGAGCAAGTGGGAAT
 5 GTTCACAATTATTTAGCATGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAAATCTCCTCAACTCCTGGTCTATACTGCAAAA
 ACCTTAGCAGATGGTGTGCCATCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGAACACAATATTCTCTCAAGATCAAT
 AGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGGGACTTATTACTGTCAACATTTTGGAGTAATCCGTGGACCTTCGGTGGAA
 10 GGCACCAAGCTGGAATCAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAGCAG
 TTAACATCTGGAGGTGCCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTTCTACCCCAAAGACATCAATGTCAAGTGG
 AAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTGAAACAGTTGGACTGATCAGGACAGCAAAGACAGCACC
 15 TACAGCATGAGCAGCACCCCTCACGTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCC
 ACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT TAG

Las regiones individuales de la secuencia codificada de la cadena ligera del ratón se resaltan alternando texto sombreado/texto sin sombrear. Posiciones: 1-60 = secuencia líder; 61-129 = región marco (LFR1); 130-162 = región determinante de complementariedad (LCDR1); 163-207 = LFR2; 208-228 = LCDR2; 229-324 = LFR3; 325-351 = LCDR3; 352-381 LFR4; 382-702 = regiones constantes (CK); 703-705 = codón de parada.

Las secuencias consenso de ADN de la cadena pesada AM-4 MIL-38 y ligera anteriores se traducen a las siguientes secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y la cadena ligera:

Secuencia consenso de aminoácidos de cadena pesada IgG1 de ratón AM-4 MIL-38 (SEQ ID NO:3)

MAWVWTLFLMLAAQSIQAQIQLVQSGPELKKPGETVKISKASGYAFTDYSMNWVKQAPGKGLRWMGWINT
 30 ETGEPTYTDDFKGRFAFSLETSASTAFLQINNLRNEDTATYFCARHYDYGFPYWGQGLVTVSAAKTTPPS
 VYPLAPGSAQAQNSMVTGLGLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSST
 VTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFFPKPKDVLITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQ
 35 FSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAP
 QVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVQKSNWE
 AGNTFTCSVLHEGLNHHTEKSLSHSPGK*

Las regiones individuales de la secuencia de cadena pesada de IgG1 de ratón se indican en la secuencia de aminoácidos anterior. Posiciones 1-19 = secuencia líder; 20-49 = región marco (HFR1); 50-54 = región determinante de complementariedad 1 (HCD1); 55-68 = HFR2; 69-85 = HCDR2; 86-117 = HFR3; 118-126 = HCDR3; 127-137 = HFR4 (también llamada región de unión o región J); 138-461 = regiones constantes de la cadena de IgG1 (CHI - CH3) y codón de parada (* *). Región de bisagra: está subrayada en la secuencia anterior.

Secuencia consenso de aminoácidos de cadena ligera AM-4 MIL-38 (SEQ ID NO:4)

MSVLTQVLALLLLWLTGARC DIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASGNVHNYLAWYQQKQKSPQLLVYTAK
 50 TLADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSIQPEDFGTYYCQHFWSNPWTFGGGKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQ
 LTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDYSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEA
 THKTSTSPIVKSFNRNEC*

Las regiones individuales de la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera se indican como marcadas: Posiciones 1-20 = secuencia líder; 21-43 = región marco (LFR1); 44-54 = región determinante de complementariedad 1 (LCDR1); 55-69 = LFR2; 70-76 = LCDR2; 77-108 = LFR3; 109-117 = LCDR3; 118-127 = LFR4; 128-234 = región constante kappa (CK) y codón de parada (*)

La comparación de la secuencia de consenso entre las secuencias de secuenciación 224945 (1-O) y 449295-1 (Alfio I) mostró que las secuencias para la cadena ligera y la cadena pesada eran idénticas (véase las alineaciones de secuencias a continuación). Como estas secuencias son consistentes entre la población biclonal (1-O) y la población de Alfio I tipo AM-4, se denominan "secuencias consenso de AM-4" como anteriormente.

1. Alineamiento de cadena ligera: alineamiento de BiclonaI vs AM-4 (Alfio I) vs AM-3 (Alfio II)

Resultados de alineamiento de cadena ligera de 224945 y 449295

Table showing sequence alignment for light chain. It includes three sections (Sección 1, Sección 2, Sección 3) with sequence coordinates and amino acid alignments for SEQ ID NO: 4 (original), SEQ ID NO: 4 (Alfio I), and SEQ ID NO: 6 (Alfio II).

2. Alineamiento de cadena pesada: BiclonaI vs AM-4 (Alfio I. No pudo determinarse la secuencia traducida de AM-3 (Alfio.2)

Resultados de alineamiento de cadena pesada de 224945 y 449295.apr

Table showing sequence alignment for heavy chain. It includes six sections (Sección 1 to Sección 6) with sequence coordinates and amino acid alignments for SEQ ID NO: 3 (original) and SEQ ID NO: 3 (Alfio I).

AM-3 secuencias consenso

No pudo obtenerse una secuencia de cadena pesada consistente de las células Alfio II de tipo AM-3. La secuencia de la cadena ligera obtenida de la ejecución de secuenciación 449295-5 (Alfio II) se obtuvo consistentemente y mostró diferencias claras tanto en las regiones marco como en las regiones determinantes de la complementariedad en comparación con la secuencia para las otras dos ejecuciones de secuenciación como se muestra en la alineación anterior (véase "1. Alineación de la cadena ligera" anterior).

Secuencia consenso de ADN de la cadena ligera AM-3 MIL-38 Kappa (SEQ ID NO:5)

ES 2 778 100 T3

ATGGGCATCAAGATGGAGTCACAGACTCAGGTCTTTGTATACATGTTGCTGTGGTTGCTGGTGTGATGGA
GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAGTTCATGTCCACATCAATAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGCAAG
5 GCCAGTCAGAATGTGGGTTCATGTAGCCTGGTTTCAGCAGAAACCAGGGCAATCTCTAAAGCACTGATT
TACTCGGCATCCTACCGGTACAGCGGAGTCACTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACT
CTCACCATCAACAATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGAGTATTTCTGTGAGCAATATAACAGTTTTCCATTCC
10 ACGTTTCGGTTCGGGGACAAAGTTGAAATAAAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTCCCACCA
TCCAGTGAGCAGTTAACATCTGGAGGTGCCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAACAACCTCTACCCCAAAGACATC
AATGTCAAGTGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTTGAACAGTTGGACTGATCAGGACAGC
15 AAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCTCACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGCTAT
ACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCAACCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGTAG

* Las regiones individuales de la secuencia codificada de la cadena ligera se resaltan alternando texto sombreado/texto sin sombrear. Posiciones: 1-72 = secuencia líder; 73-141 = región marco (LFR1); 142-174 = región determinante de complementariedad (LCDR1); 175-219 = LFR2; 220-240 = LCDR2; 241-336 = LFR3; 337-363 = LCDR3; 364-393 = LFR4; 394-714 = región constante (CK); 715-717 = codón de parada

Secuencia consenso de aminoácidos de cadena ligera AM-3 MIL-38 (SEQ ID NO: 6)

25 MGIKMESQTQVFVYMLLWLSGVDGDIVMTQSQKFMSTSIGDRVSVTCKASQNVGSHVAWFQQKPGQSPKALI
YSASYRYSGVTD RFTGSGSGTDFTLTINNVSQEDLAEYFCQQYNSFPFTFGSGTKLEIKRADAAPTVSIFPP
SSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSE RQNGV LNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSY
30 TCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC*

Las regiones individuales de la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera se indican como marcadas: Posiciones 1-24 = secuencia líder; 25-47 = región marco (LFR1); 48-58 = región determinante de complementariedad 1 (LCDR1); 59-73 = LFR2; 74-80 = LCDR2; 81-112 = LFR3; 113-121 = LCDR3; 122-131 = LFR4; 132-238 = región constante kappa (CK) y codón de parada (*)

Ejemplo 5: preparación y prueba de anticuerpos MIL-38 quiméricos

5.1 Materiales y procedimientos

- Preparación de anticuerpos quiméricos

Se desarrollaron dos secuencias de ADNc optimizadas para fines de clonación. Estos se basaron en las secuencias consenso de la cadena pesada y la cadena ligera AM-4 identificadas anteriormente en

Ejemplo 4.

La primera secuencia de ADNc optimizada se usó en la generación de una secuencia de cadena pesada quimérica humano-ratón:

Secuencia de ADNc optimizada con codón CHO #1 - cadena pesada quimérica humana de ratón 1.404 pb (SEQ ID NO:7)

ES 2 778 100 T3

ATGGCTTGGGTGTGGACTGCTGTTCCTGATGGCTGCTGCCAGAGTATTCAGGCTCAGATTCAGCTGGTC
 CAGAGCGGTCCCGAGCTGAAGAAGCCAGGCGAGACCGTGAAGATCTCTGCAAGGCCAGCGGTACGCTTTC
 5 ACAGACTATTCTATGAACTGGGTGAAGCAGGCCCCAGGCAAGGGCCTGAGGTGGATGGGCCTGGATCAATACC
 GAGACAGGCGAGCCCACCTACACAGACGATTTCAAGGGCCGGTTTCGCTTTTTCCCTGGAGACCTCTGCCTCC
 ACAGCTTTTCTGCAGATCAACAATCTGAGAAACGAGGACACCGCCACATACTTCTGCCTAGGCACCTACGAT
 10 TATGGCGGGCTTTCTTATTTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACAGTGTCCAGCCCTCTACCAAGGGCCATCC
 GTGTTTCCACTGGCTCCCTCTTCCAAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCTCTGGGCTGTCTGGTGAAGGAT
 TACTTCCCAGAGCCCCTGACAGTGTCTTGGAACTCCGGCGCCCTGACCTCCGGAGTGCATACATTTCCCGCT
 15 GTGCTGCAGAGCTCTGGCCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGTGACCGTGCCTTCTTCCAGCCTGGGCACCCAG
 ACATATATCTGCAACGTGAATCACAAGCCATCCAATACAAAGGTGGACAAGAAGGTGGAGCCCCAAGAGCTGT
 GATAAGACCCATACATGCCCCCTTGTCTGCTCCAGAGCTGCTGGGAGGACCTAGCGTGTTCCTGTTTCCA
 20 CCAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCTAGGACCCCCGAGGTGACATGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCAC
 GAGGATCCTGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCTAAGACCAAGCCTAGG
 GAGGAGCAGTACAACAGCACCTATCGGGTGGTGTCTGTGCTGACAGTGTGCACCAGGACTGGTGAACGGC
 25 AAGGAGTATAAGTGCAGGTGAGCAATAAGGCCCTGCCCGCTCTATCGAGAAGACCATCTCTAAGGCCAAG
 GGCCAGCCTCGGGAGCCACAGGTGTACACACTGCCTCCAAGCAGAGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCT
 CTGACATGTCTGGTGAAGGGCTTCTATCCTTCTGATATCGCTGTGGAGTGGGAGTCCAATGGCCAGCCAGAG
 30 AACAATTACAAGACCACCCCCCTGTGCTGGACAGCGATGGCTCTTTCTTCTGTATTTCCAAGCTGACCGTG
 GATAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTCTCCTGTAGCGTGATGCACGAGGCACTGCACAACCACACTAC
 35 ACTCAGAAATCCCTGTCCCTGTACCTGGCAAAATGA

Las regiones individuales de la secuencia codificada de la cadena pesada quimérica humana-ratón se resaltan alternando texto sombreado/texto sin sombrear. Posiciones: 1-57 = secuencia líder; 58-147 = región marco (FR1); 148-162 = región determinante de complementariedad (CDR1); 163-204 = FR2; 205-255 = CDR2; 256-351 = FR3; 352-378 = CDR3; 379-411 = FR4; 412-1401 = regiones constantes humanas (CH1-CH3); 706-750 = región de bisagra (subrayada); 1402-1405 = codón de parada.

La segunda secuencia de ADNc optimizada generada se usó en la generación de un cadena ligera quimérica humana-ratón secuencia:

Secuencia de ADNc optimizada con codón CHO #2 - cadena ligera quimérica humana de ratón 705 pb (SEQ ID NO:8)

ATGAGCGTGTGACCCAGGTGCTGGCCCTGCTGCTGCTGTGGCTGACCCGAGCCCGTTGCGACATCCAGATG
 50 ACCCAGTCCCCTGCCTCTCTGTCCGCCAGCGTGGGCGAGACCGTGACAATCACCTGCAGAGCCTCTGGCAAC
 GTGCACAATTACCTGGCTTGGTATCAGCAGAAGCAGGGCAAGTCCCCACAGCTGCTGGTGTACACAGCCAAG
 ACCCTGGCTGACGGCGTCCCAGCAGGTCTCTGGCTCCGGCAGCGGCACACAGTATAGCCTGAAGATCAAC
 55 TCTCTGCAGCCTGAGGATTTTGGCACCTACTATGTCAGCATTTCTGGTCTAATCCATGGACA TTTGGCGGC
 GGCACCAAGCTGGAGATCAAGAGGACAGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTCATCTTTCCCCCTAGCGACGAGCAG
 CTGAAGTCTGGCACCGCTTCCGTGGTGTGCCCTGCTGAACAATTTCTACCCCTCGGGAGGCCAAGGTGCAGTGG
 60 AAGGTGGATAACGCTCTGCAGTCTGGCAATTTCCAGGAGAGCGTGACAGAGCAGGACTCTAAGGATTCACC
 TATAGCCTGTCCAGCACACTGACCCCTGTCCAAGGCCACTACGAGAAGCACAAGGTGTATGCTTGTGAGGTC
 ACTCACCAGGGGCTGTCAAGTCCAGTCAACAAGTCTTCAATAGGGGGGAATGCTGA

Las regiones individuales de la secuencia codificada de la cadena ligera quimérica humana-ratón se resaltan alternando texto sombreado/texto sin sombrear. Posiciones: 1-60 = secuencia líder; 61-129 = región marco (LFR1); 130-162 =

región determinante de complementariedad (LCDR1); 163-207 = LFR2; 208-228 = LCDR2; 229-324 = LFR3; 325-351= LCDR3; 352-381 = LFR4; 382-702 = región constante humana (CK); 703-705 = codón de parada.

5 Las cadenas C_H1-C_H3 de MIL-38 quimérico ratón humano se expresaron transitoriamente en células CHO-3E7 en suspensión usando medio sin suero, seguido de una purificación en un solo paso.

10 Las células CHO-3E7 se cultivaron en medio de expresión FreeStyle™ CHO sin suero (Life Technologies, Carlsbad, CA, Estados Unidos). Las células se mantuvieron en matraces Erlenmeyer (Corning Inc., Acton, MA) a 37 °C con 5 % de CO₂ en un agitador orbital (VWR Scientific, Chester, PA). El día de la transfección, el ADN y la PEI (Polysciences, Eppelheim, Alemania) se mezclaron en una proporción óptima y después se añadieron al matraz con células listas para la transfección. El sobrenadante recogido el día 6 se usó para purificación adicional.

15 El caldo de cultivo celular se centrifugó y después se filtró. El sobrenadante filtrado se cargó en una columna CIP de proteína A de 5 ml (GenScript, núm. de cat. L00433) a 3,0 ml/min. Después de lavar y eluir con tampón apropiado, las fracciones se recogieron y neutralizaron con Tris-HCl 1M, pH 9,0. La proteína purificada se analizó por SDS-PAGE, la transferencia Western usando protocolos estándar para mediciones de peso molecular, rendimiento y pureza.

- *Ensayos de anticuerpos MIL-38 quiméricos (inmunofluorescencia de diapositivas)*

20 El anticuerpo MIL-38 quimérico se usó en ensayos de inmunofluorescencia con células DU-145. La preparación 33A de MIL-38 murino se usó como control positivo para la tinción de antígeno GPC-1, mientras que Cetuximab (un anticuerpo quimérico dirigido al EGFR) se usó como control positivo para la tinción de regiones constantes de IgG humana. Se usó una placa sin anticuerpo primario como control negativo. La tinción se realizó esencialmente como se describe en la Sección 1.1, con la excepción de que los anticuerpos secundarios se marcaron con Alexafluor 488 y que los anticuerpos antihumanos se usaron para teñir las muestras quiméricas y cetuximab.

- *transferencias Western de MIL-38 quimérico*

30 La reactividad del MIL-38 quimérico y el MIL-38 murino frente a los extractos de MPEK DU-145 y C3, así como al antígeno GPC-1 recombinante producido por NSO, se ensayó mediante transferencia Western. Los ensayos de la transferencia Western se sondearon con MIL-38 murino o MIL-38 quimérico. El MIL-38 quimérico fue detectado por un anticuerpo secundario antihumano de cabra seguido por un anticuerpo HRP de oveja anti-cabra. Como control, el MIL-38 murino fue detectado por un anticuerpo secundario anti-ratón de cabra seguido de un anticuerpo HRP de oveja anti-cabra. Se observaron reactividades equivalentes para MIL-38 quimérico y MIL-38 murino cuando se detectaron en condiciones equivalentes. **La Figura 9A** muestra una transferencia Western sondeada con MIL-38 murino, seguido de anticuerpo secundario anti-HRP de ratón. **La Figura 9B** muestra una transferencia Western sondeada con MIL-38 quimérico, seguido de anticuerpo secundario antihumano de cabra. El complejo se detectó usando un anticuerpo HRP de oveja anti-cabra. **La Figura 9C** muestra una transferencia Western sondeada con MIL-38 murino, seguido de anticuerpo de ratón antihumano de cabra. El complejo se detectó usando un anticuerpo HRP de oveja anti-ratón.

40

5.2 Resultados

- *Expresión de secuencias de anticuerpos quiméricos*

45 Los plásmidos recombinantes que codifican la cadena pesada y la cadena ligera de la cadena CH1-CH3 humana de MIL-38 quimérico de ratón se transfectaron transitoriamente en cultivos de células en suspensión CHO-3E7. La proteína diana se capturó del sobrenadante del cultivo celular mediante una columna de 5 ml de Proteína A CIP y se siguió con el intercambio de tampón. La proteína purificada se analizó por SDS-PAGE y la transferencia Western como se muestra en las **Figuras 7A y 7B**. Se cargaron 3 µg de muestra en SDS-PAGE y se cargaron 0,3 µg de proteína total en la transferencia Western. El anticuerpo primario para la transferencia Western fue IgG-HRP anti-humano de cabra (GenScript, núm. de cat. A00166).

50

- *Secuencias de anticuerpos quiméricos*

55 La secuencia optimizada de ADNc #1 (**SEQ ID NO:7**) se usó para generar una cadena pesada de anticuerpo MIL-38 quimérico con la siguiente secuencia de aminoácidos:

Secuencia quimérica de cadena CH1-CH3 humana de MIL-38 de ratón y una secuencia de cadena CH1-CH3 humana de VH de ratón (cadena pesada) (SEQ ID NO:9)

60

65

MAVWVWTLFLMAAAQSIQAQIQILVQSGPELKKPGETVKISCKASGYAFTDYSMNWVKQAPGKGLRWMGWINT
 ETGEPTYTDDFKGRFAFSLSETSASTAFLQINNLRNEDTATYFCARHYDYGGFPYWGQGLTVTVSSASTKGPS
 VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ
 TYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMIISRTPEVTCVVVDVSH
 EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
 GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*

5
10

Las regiones individuales de la secuencia de cadena pesada quimérica humana-ratón se indican en la secuencia de aminoácidos anterior: Posiciones 1-19 = secuencia líder; 20-49 = región marco (HFR1); 50-54 = región determinante de complementariedad 1 (HCD1); 55-68 = HFR2; 69-85 = HCDR2; 86-117 = HFR3; 118-126 = HCDR3; 127-137 = HFR4 (también llamada región de unión o región J); 138-467 = regiones constantes de cadena IgG1 (CH1-CH3), y codón de parada (*). Secuencia de bisagras: la secuencia de bisagra de cadena pesada de IgG1 humana se subraya anteriormente.

15

Secuencia optimizada de ADNc #2 (SEQ ID NO:8) se usó para generar una cadena ligera de anticuerpos MIL-38 quiméricos con la siguiente secuencia de aminoácidos:

Secuencia quimérica de cadena ligera Kappa de ratón humano MIL-38: Secuencia VK-CK humana de ratón (SEQ ID NO:10)

MSVLTQVLALLLLWLTVGARC^{DI}QMTQSPASLSASVGETVTITCRASGNVHNYLAWYQQKQKSPQLLVY^{TAK}
 TLADGVPSRFGSGSGTQYSLKINSLQPEDFGTYIC^{QHF}WSNFWT^{FG}GGTKLEIKRTVAAPS^{VFI}PPSDE^Q
 LKSGTASVCLLN^{NFY}PREAKVQ^{WK}VDNALQSGNSQ^{ES}VTEDQ^{SK}DSTYSL^{SST}LTLSKADY^{EKH}KVYACE^V
 THQGLSSPVT^{KSF}NRGEC*

25
30

Las regiones individuales de la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera quimérica humana-ratón se indican como se marca: Posiciones 1-20 = secuencia líder; 21-43 = región marco (LFR1); 44-54 = región determinante de complementariedad 1 (LCDR1); 55-69 = LFR2; 70-76 = LCDR2; 77-108 = LFR3; 109-117 = LCDR3; 118-127 = LFR4; 128-234 = región constante kappa (CK) y codón de parada (*)

35

- Ensayos de anticuerpos MIL-38 quiméricos (inmunofluorescencia de diapositivas)

Las Figuras 8A-D muestran imágenes de campo brillante de células. La Figura 8E muestra la tinción del control positivo 33A. La Figura 8F muestra la tinción del anticuerpo MIL-38 quimérico. La Figura 8G muestra la tinción de un control positivo de anticuerpo monoclonal quimérico (ratón/humano) (Cetuximab) comercial, y la Figura 8H muestra la tinción de control negativo de anticuerpo no primario. Se observó una fuerte tinción en las Figuras 8E, F y G y no se observó tinción en Figura 8H. Estos resultados demuestran que el anticuerpo MIL-38 quimérico se une con éxito a las células DU-145 en IFA, lo que indica que se ha mantenido la especificidad de unión del anticuerpo MIL-38 murino parental.

45

- Ensayos de anticuerpos quiméricos MIL-38 (transferencia Western)

La Figura 9A muestra una transferencia Western sondeada con MIL-38 murino, seguido de anticuerpo secundario anti-HRP de ratón. El tiempo de exposición para la transferencia Western mostrada en la Figura 9A fue de 30 segundos. La Figura 9B muestra una transferencia Western sondeada con MIL-38 quimérico, seguido de anticuerpo secundario antihumano de cabra. El complejo se detectó con el uso de un anticuerpo HRP de oveja y cabra. El tiempo de exposición para la transferencia Western mostrada en la Figura 9B fue de 30 minutos. La Figura 9C muestra una transferencia Western sondeada con MIL-38 murino, seguido de anticuerpo anti-ratón de cabra. El complejo se detectó con el uso de un anticuerpo HRP de oveja y cabra. El tiempo de exposición para la transferencia western mostrada en la Figura 9C fue de 30 minutos.

55

El anti-ratón MIL-38 murino reconoce el antígeno en los lisados DU-145 y GPC-1 NS0 recombinante. No se observó reactividad en los lisados C3 como se esperaba (Figura 9A).

60

Se requirió un procedimiento de detección de tres anticuerpos para evaluar la reactividad del MIL-38 quimérico con extractos DU-145 y C3, así como NS0 GPC-1 recombinante (Figura 9B). También se realizó una transferencia western de control usando un procedimiento de detección de tres anticuerpos con MIL-38 murino (Figura 9C). Cuando se usó un procedimiento de detección de tres anticuerpos, la detección fue mucho menos sensible que usar el procedimiento

65

estándar de dos anticuerpos (para las transferencias western que se muestran en **Figuras 9A y C**, el tiempo de exposición usado para la **Figura 9A** fue de 30 segundos, mientras que el usado para la **Figura 9C** fue de 30 minutos).

5 Como se muestra en la **Figura 9B** el MIL-38 quimérico reconoce el antígeno NS0 GPC-1 recombinante y muestra una reactividad comparable al MIL-38 murino cuando se detecta con el uso de este procedimiento (comparar las **Figuras 9B y C**).

5.3 Discusión

10 El anticuerpo MIL-38 quimérico se expresó con éxito y se purificó en células CHO-3E7 en suspensión. Las cadenas H y L del anticuerpo objetivo se detectaron con pesos moleculares estimados de ~55 kDa (Cal.MW ~52 kDa) y 28 kDa (Cal.MW ~26 kDa) basado en SDS-PAGE y análisis de transferencia Western.

15 Se observó reactividad equivalente entre el MIL-38 quimérico y el progenitor murino en IFA y la transferencia Western, lo que indica que la especificidad de unión se ha mantenido en la construcción del anticuerpo quimérico.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Minomic International Ltd
- 20 <120> Anticuerpos monoclonales anti-GPC-1 y usos de los mismos
- <130> P107105C
- <160> 10
- <170> Patente en la versión 3.5
- <210> 1
- 25 <211> 1386
- <212> ADN
- <213> Mus musculus
- <400> 1

30	atggcttggg	tgtggacctt	gctattcctg	atggctgctg	cccaaagtat	ccaagcacag	60
	atccagttgg	tgcagttctg	acctgagctg	aagaagcctg	gagagacagt	caagatctcc	120
	tgcaaggctt	ctggttatgc	cttcacagac	tattcaatga	actgggtgaa	gcaggctcca	180
	ggaaaagggtt	taagggtgat	gggctggata	aacctgaga	ctggtgagcc	aacatataca	240
	gatgacttca	agggacggtt	tgccttctct	ttggaaacct	ctgccagcac	tgcctttttg	300
	cagatcaaca	acctcagaaa	tgaagacacg	gctacatatt	tctgtgctag	acactatgat	360
35	tacgggggggt	ttccttactg	gggccaaggg	actctggtea	ctgtctctgc	agccaaaacg	420
	acacccccat	ctgtctatcc	actggcccct	ggatctgctg	cccaaactaa	ctccatggtg	480
	accttgggat	gcctgggtcaa	gggctatttc	cctgagccag	tgacagtgac	ctggaactct	540
	ggatccctgt	ccagcgggtg	gcacaccttc	ccagctgtcc	tgcagtctga	cctctacact	600
	ctgagcagct	cagtgactgt	ccccccagc	acctggccca	gagagaccgt	cacctgcaac	660
40	gttgccacc	cggccagcag	caccaagggtg	gacaagaaaa	ttgtgccag	ggattgtggt	720
	tgtaagcctt	gcatatgtac	agtcccagaa	gtatcatctg	tcttcatctt	cccccaaag	780
	cccaaggatg	tgetcaccat	tactctgact	cctaaggtea	cgtgtgttgt	ggtagacatc	840
	agcaaggatg	atccccaggt	ccagttcagc	tggttttag	atgatgtgga	ggtgcacaca	900
	gctcagacgc	aacccccgga	ggagcagttc	aacagcactt	tccgctcagt	cagtgaactt	960
45	cccacatgc	accaggactg	gctcaatggc	aaggagtcca	aatgcagggt	caacagtgca	1020
	gctttccctg	cccccatcga	gaaaaccatc	tccaaaacca	aaggcagacc	gaaggctcca	1080
	caggtgtaca	ccattccacc	tcccaggag	cagatggcca	aggataaagt	cagtctgacc	1140
	tgcatgataa	cagacttctt	ccctgaagac	attactgtgg	agtggcagtg	gaatgggag	1200
	ccagcggaga	actacaagaa	cactcagccc	atcatggaca	cagatggctc	ttacttctgc	1260
	tacagcaagc	tcaatgtgca	gaagagcaac	tgggaggcag	gaaatacttt	cacctgctct	1320
50	gtgttacatg	agggcctgca	caaccaccat	actgagaaga	gcctctccca	ctctcctggt	1380
	aatga						1386

- <210> 2
- 55 <211> 705
- <212> ADN
- <213> Mus musculus
- <400> 2

60

65

ES 2 778 100 T3

	atgagtgtgc	tcactcaggt	cctggcgttg	ctgctgctgt	ggcttacagg	tgccagatgt	60
	gacatccaga	tgactcagtc	tccagcctcc	ctatctgcat	ctgtgggaga	aactgtcacc	120
	atcacatgtc	gagcaagtgg	gaatgttcac	aattatitag	catggtatca	gcagaaacag	180
	ggaaaatctc	ctcaactcct	ggtctatact	gcaaaaacct	tagcagatgg	tgtgccatca	240
5	aggttcagtg	gcagtggatc	aggaacacaa	tattctctca	agatcaatag	cctgcagcct	300
	gaagatdddg	ggacttatta	ctgtcaacat	ttttggagta	atccgtggac	gttcgggtgga	360
	ggcaccaagc	tggaaatcaa	acgggctgat	gctgcaccaa	ctgtatccat	cttcccacca	420
	tccagtgagc	agttaacatc	tggaggtgcc	tcagtctgtg	gcttcttgaa	caacttctac	480
	cccaaagaca	tcaatgtcaa	gtggaagatt	gatggcagtg	aacgacaaaa	tggcgtcctg	540
10	aacagttgga	ctgatcagga	cagcaaagac	agcacctaca	gcatgagcag	caccctcacg	600
	ttgaccaagg	acgagtatga	acgacataac	agctatacct	gtgaggccac	tcacaagaca	660
	tcaacttcac	ccattgtcaa	gagcttcaac	aggaatgagt	gttag		705

15	<210> 3
	<211> 461
	<212> PRT
	<213> Mus musculus
	<400> 3

ES 2 778 100 T3

5 Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
 1 5 10 15
 Ile Gln Ala Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys
 20 25 30
 Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe
 35 40 45
 Thr Asp Tyr Ser Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 10 Arg Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Thr
 65 70 75 80
 Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser
 85 90 95
 Thr Ala Phe Leu Gln Ile Asn Asn Leu Arg Asn Glu Asp Thr Ala Thr
 100 105 110
 15 Tyr Phe Cys Ala Arg His Tyr Asp Tyr Gly Gly Phe Pro Tyr Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Pro Pro Ser
 130 135 140
 20 Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val
 145 150 155 160
 Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 165 170 175
 Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 180 185 190
 25 Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro
 195 200 205
 Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro
 210 215 220
 Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly
 225 230 235 240
 30 Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile
 245 250 255
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys
 260 265 270
 35 Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln
 275 280 285
 Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln
 290 295 300
 Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu
 305 310 315 320
 40 Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg
 325 330 335
 Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 340 345 350
 45 Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro
 355 360 365
 Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr
 370 375 380
 Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln
 385 390 395 400
 50 Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly
 405 410 415
 Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu
 420 425 430
 Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn
 435 440 445
 55 His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 450 455 460

<210> 4
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 4

65

ES 2 778 100 T3

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15
 Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser
 20 25 30
 5 Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn
 35 40 45
 Val His Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro
 50 55 60
 Gln Leu Leu Val Tyr Thr Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80
 10 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn
 85 90 95
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp
 100 105 110
 15 Ser Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 115 120 125
 Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln
 130 135 140
 Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160
 20 Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln
 165 170 175
 Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190
 Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg
 195 200 205
 25 His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro
 210 215 220
 Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 225 230

30
 <210> 5
 <211> 717
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 35 <400> 5

atgggcatca agatggagtc acagactcag gtctttgtat acatgttgct gtggttgtct 60
 ggtgttgatg gagacattgt gatgaccag tctcaaaagt tcatgtccac atcaatagga 120
 gacagggtca gcgtcacctg caaggccagt cagaatgtgg gttctcatgt agcctggttt 180
 40 cagcagaaac cagggcaatc tcctaaagca ctgatttact cggcatccta ccggtacagc 240
 ggagtcactg atcgcttcac aggcagtgga tctgggacag atttcaactct caccatcaac 300
 aatgtgcagt ctgaagactt ggcagagtat ttctgtcagc aatataacag ttttccattc 360
 acgttcgggtt cggggacaaa gttggaaata aaacgggctg atgetgcacc aactgtatcc 420
 atcttcccac catccagtga gcagttaaca tctggaggtg cctcagtcgt gtgcttcttg 480
 aacaacttct accocaaaga catcaatgtc aagtggaaga ttgatggcag tgaacgacaa 540
 45 aatggcgtcc tgaacagttg gactgatcag gacagcaaag acagcaccta cagcatgagc 600
 agcaccctca cgttgaccaa ggacgagtat gaacgacata acagctatac ctgtgaggcc 660
 actcacaaga catcaacttc acccattgtc aagagcttca acaggaatga gtggttag 717

50 <210> 6
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 6

55
 60
 65

ES 2 778 100 T3

		Met	Gly	Ile	Lys	Met	Glu	Ser	Gln	Thr	Gln	Val	Phe	Val	Tyr	Met	Leu
	1					5					10				15		
	Leu	Trp	Leu	Ser	Gly	Val	Asp	Gly	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Gln	
			20					25					30				
5	Lys	Phe	Met	Ser	Thr	Ser	Ile	Gly	Asp	Arg	Val	Ser	Val	Thr	Cys	Lys	
		35						40					45				
	Ala	Ser	Gln	Asn	Val	Gly	Ser	His	Val	Ala	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	
		50					55					60					
	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Ala	Leu	Ile	Tyr	Ser	Ala	Ser	Tyr	Arg	Tyr	Ser	
10		65			70						75					80	
	Gly	Val	Thr	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	
				85						90					95		
	Leu	Thr	Ile	Asn	Asn	Val	Gln	Ser	Glu	Asp	Leu	Ala	Glu	Tyr	Phe	Cys	
				100					105						110		
	Gln	Gln	Tyr	Asn	Ser	Phe	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu	
15			115					120						125			
	Glu	Ile	Lys	Arg	Ala	Asp	Ala	Ala	Pro	Thr	Val	Ser	Ile	Phe	Pro	Pro	
			130				135					140					
	Ser	Ser	Glu	Gln	Leu	Thr	Ser	Gly	Gly	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Phe	Leu	
20			145				150				155					160	
	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Lys	Asp	Ile	Asn	Val	Lys	Trp	Lys	Ile	Asp	Gly	
				165						170					175		
	Ser	Glu	Arg	Gln	Asn	Gly	Val	Leu	Asn	Ser	Trp	Thr	Asp	Gln	Asp	Ser	
				180					185						190		
	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Met	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Lys	Asp	
25			195					200						205			
	Glu	Tyr	Glu	Arg	His	Asn	Ser	Tyr	Thr	Cys	Glu	Ala	Thr	His	Lys	Thr	
			210				215					220					
	Ser	Thr	Ser	Pro	Ile	Val	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Asn	Glu	Cys			
				225			230					235					

30
 <210> 7
 <211> 1404
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de Anticuerpo Quimérico
 <400> 7

	atggcttggg	tgtggacact	gctgttctctg	atggctgctg	cccagagtat	tcaggctcag		60
40	attcagctgg	tccagagcgg	tcccgagctg	aagaagccag	gcgagaccgt	gaagatctcc		120
	tgcaaggcca	gcggtctacgc	tttcacagac	tattctatga	actgggtgaa	gcaggcccca		180
	ggcaagggcc	tgaggtgat	gggtggatc	aataccgaga	caggogagcc	cacctacaca		240
	gacgatttca	agggccggtt	cgctttttcc	ctggagacct	ctgcctccac	agctttttctg		300
	cagatcaaca	atctgagaaa	cgaggacacc	gccacatact	tctgcgctag	gcactacgat		360
	tatggcggct	ttccttatg	gggccagggc	accctggta	cagtgctccag	cgctctacc		420
45	aagggccat	ccgtgtttcc	actggctccc	tcttccaaga	gcacctctgg	cggcacagcc		480
	gctctgggct	gtctggtgaa	ggattacttc	ccagagcccg	tgacagtgtc	ttggaactcc		540
	ggcgccctga	cctccggagt	gcatacattt	cccgctgtgc	tgacagctc	tgccctgtac		600
	agcctgtcca	gcgtggtgac	cgtgccttct	tccagcctgg	gcaccagac	atatatctgc		660
	aacgtgaate	acaagccatc	caatacaaag	gtggacaaga	aggtggagcc	caagagctgt		720
50	gataagacco	atacatgccc	cccttgtcct	gctccagagc	tgctgggagg	acctagcgtg		780
	ttcctgtttc	cacccaagcc	taaggacacc	ctgatgatct	ctaggacccc	cgaggtgaca		840
	tgctgggtgg	tgacgtgtc	ccacgaggat	cctgaggtga	agttcaactg	gtacgtggat		900
	ggcgtggagg	tgcataatgc	taagaccaag	cctagggagg	agcagtacaa	cagcacctat		960
	cggtgggtgt	ctgtgctgac	agtgtgtcac	caggactggc	tgaacggcaa	ggagtataag		1020
55	tgcaagggtga	gcaataaggc	cctgcccgtc	cctatcgaga	agaccatctc	taaggccaag		1080
	ggccagcctc	gggagccaca	ggtgtacaca	ctgcctccaa	gcagagacga	gctgaccaag		1140
	aaccaggtgt	ctctgacatg	tctggtgaag	ggcttctatc	cttctgatat	cgctgtggag		1200
	tgggagtcca	atggccagcc	agagaacaat	tacaagacca	cacccctgtg	gctggacagc		1260
	gatggctctt	tctttctgta	ttccaagctg	accgtggata	agagcaggtg	gcagcagggc		1320
60	aacgtgttct	cctgtagcgt	gatgcacgag	gcactgcaca	accactacac	tcagaaatcc		1380
	ctgtccctgt	cacctggcaa	atga					1404

65
 <210> 8
 <211> 705
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 778 100 T3

<220>

<223> Secuencia de Anticuerpo Quimérico

<400> 8

5	atgagcgtgc	tgacccaggt	getggccctg	ctgtctgtgt	ggctgaccgg	agcccgttgc	60
	gacatccaga	tgacccagtc	ccctgcctct	ctgtccgcca	gcgtgggcca	gaccgtgaca	120
	atcacctgca	gagcctctgg	caacgtgcac	aattacctgg	cttgggtatca	gcagaagcag	180
	ggcaagtccc	cacagctgct	gggttacaca	gccaagacc	tggtgacgg	cgtgccccagc	240
	aggttctctg	gctccggcag	cggcacacag	tatagcctga	agatcaactc	tctgcagcct	300
10	gaggatcttg	gcacctacta	ttgccagcat	ttctgggtcta	atccatggac	atttggcggc	360
	ggcaccaagc	tggagatcaa	gaggacagtg	gccgctccct	ccgtgttcat	ctttccccct	420
	agcgacgagc	agctgaagtc	tggcaccgct	tccgtgggtg	gcctgctgaa	caatttctac	480
	cctcggggagg	ccaaggtgca	gtggaaggtg	gataacgctc	tgagctctgg	caattcccag	540
	gagagcgtga	cagagcagga	ctctaaggat	tccacctata	gcctgtccag	cacactgacc	600
	ctgtccaagg	ccgactacga	gaagcacaag	gtgtatgctt	gtgaggtcac	tcaccagggg	660
15	ctgtcaagtc	cagtcacaaa	gtccttcaat	agggggggaat	gctga		705

<210> 9

<211> 467

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de Anticuerpo Quimérico

<400> 9

25	Met	Ala	Trp	Val	Trp	Thr	Leu	Leu	Phe	Leu	Met	Ala	Ala	Ala	Gln	Ser
	1				5					10					15	
	Ile	Gln	Ala	Gln	Ile	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Lys	Lys
				20					25					30		
	Pro	Gly	Glu	Thr	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ala	Phe
		35						40					45			
30	Thr	Asp	Tyr	Ser	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu
	50					55						60				
	Arg	Trp	Met	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Glu	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Thr
	65					70					75				80	
	Asp	Asp	Phe	Lys	Gly	Arg	Phe	Ala	Phe	Ser	Leu	Glu	Thr	Ser	Ala	Ser
35				85						90				95		
	Thr	Ala	Phe	Leu	Gln	Ile	Asn	Asn	Leu	Arg	Asn	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr
				100					105					110		
	Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	His	Tyr	Asp	Tyr	Gly	Gly	Phe	Pro	Tyr	Trp	Gly
			115					120					125			
40	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser
				130			135						140			
	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala
	145					150					155				160	
	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val
				165						170				175		
45	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala
			180						185					190		
	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val
			195				200						205			
50	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His
		210				215						220				
	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys
	225				230						235					240

55

60

65

ES 2 778 100 T3

5 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 245 250 255
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 275 280 285
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 290 295 300
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 340 345 350
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360 365
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 385 390 395 400
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 405 410 415
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 420 425 430
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 435 440 445
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 450 455 460
 Pro Gly Lys
 465

30

<210> 10
 <211> 234
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia de Anticuerpo Quimérico
 <400> 10

35

40

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15
 Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser
 20 25 30
 Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn
 35 40 45
 Val His Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro
 50 55 60
 Gln Leu Leu Val Tyr Thr Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn
 85 90 95
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp
 100 105 110
 Ser Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 115 120 125
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 130 135 140
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 165 170 175

60

65

ES 2 778 100 T3

5

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 195 200 205
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 210 215 220
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

REIVINDICACIONES

1. Una población de anticuerpos monoclonales aislada que comprende:
- 5 primeros anticuerpos y/o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, en la que los primeros anticuerpos y/o fragmentos de unión al antígeno de los mismos comprenden:
- (a) una región variable de la cadena pesada que comprende:
- 10 una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 50-54 de la **SEQ ID NO: 3**;
- una región determinante de complementariedad 2 (CDR2) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 69-85 de la **SEQ ID NO: 3**;
- 15 una región determinante de complementariedad 3 (CDR3) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 118-126 de la **SEQ ID NO: 3**; y
- (b) una región variable de la cadena ligera que comprende:
- 20 una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 44-54 de la **SEQ ID NO: 4**;
- una región determinante de complementariedad 2 (CDR2) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 70-76 de la **SEQ ID NO: 4**;
- 25 una región determinante de complementariedad 3 (CDR3) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 109-117 de la **SEQ ID NO: 4**;
- y en la que la población de anticuerpos no contiene segundos anticuerpos que comprenden una región variable de la cadena ligera que comprende:
- 30 una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 48-58 de la **SEQ ID NO: 6**;
- una región determinante de complementariedad 2 (CDR2) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 74-80 de la **SEQ ID NO: 6**;
- 35 una región determinante de complementariedad 3 (CDR3) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 113-121 de la **SEQ ID NO: 6**.
2. La población de anticuerpos de acuerdo con la reivindicación 1, en la que los primeros anticuerpos y/o fragmentos de unión al antígeno de los mismos son de isotipo IgG1.
3. La población de anticuerpos según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que los primeros anticuerpos y/o fragmentos de unión al antígeno de los mismos son uno o más de anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos multiméricos y/o anticuerpos sintéticos.
4. La población de anticuerpos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que los fragmentos de unión al antígeno son uno o más de fragmentos variables de cadena sencilla (scFv), fragmentos de dominio variable (Fv), fragmentos de unión al antígeno de fragmento (Fab), F (ab) 2 fragmentos, péptidos o fragmentos proteolíticos que contienen una región de unión al epítipo.
- 45 5. La población de anticuerpos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que los primeros anticuerpos y/o fragmentos de unión al antígeno de los mismos comprenden además:
- 50 (a) una o más regiones variables de la cadena pesada FR (regiones marco) como se define por una secuencia seleccionada de uno o más de: los residuos 20-49 de **SEQ ID NO: 3**, los residuos 55-68 de la **SEQ ID NO: 3**, los residuos 86-117 de la **SEQ ID NO: 3**, los residuos 127-137 de la **SEQ ID NO: 3**; y/o
- (b) una o más regiones variables de la cadena ligera FR (regiones marco) como se define por una secuencia seleccionada de uno o más de: los residuos 21-43 de la **SEQ ID NO: 4**, los residuos 55-69 de la **SEQ ID NO: 4**, los residuos 77-108 de la **SEQ ID NO: 4**, los residuos 118-127 de la **SEQ ID NO: 4**.
- 55 6. La población de anticuerpos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que los primeros anticuerpos y/o fragmentos de unión al antígeno de los mismos comprenden además uno cualquiera o más de:
- 60 (a) una secuencia de dominio constante de la cadena pesada tal como se define por las posiciones 138-461 de la **SEQ ID NO: 3**;
- (b) una secuencia de dominio constante de la cadena ligera tal como se define por las posiciones 128-234 de la **SEQ ID NO: 4**;
- 65 (c) una región de bisagra.

7. La población de anticuerpos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que los primeros anticuerpos comprenden o consisten en una secuencia de cadena pesada como se define por las posiciones 20-461 de la **SEQ ID NO: 3** y una secuencia de cadena ligera como se define por las posiciones 21-234 de la **SEQ ID NO: 4**.
- 5
8. Células de hibridoma capaces de producir la población de anticuerpos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. Las células de hibridoma de acuerdo con la reivindicación 8, en las que las células de hibridoma se depositan en Cellbank Australia con el número de acceso CBA20140026.
- 10
10. Una molécula de ácido nucleico que codifica al menos uno de los primeros anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 15
11. La molécula de ácido nucleico aislada de conformidad con la reivindicación 10, en la que la molécula de ácido nucleico comprende la secuencia como se expone en la **SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2**.
12. Un procedimiento de producción de anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, en el que el procedimiento comprende cultivar las células de hibridoma de acuerdo con la reivindicación 8 o la reivindicación 9 en un medio de cultivo en condiciones adecuadas para producir de ese modo el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo.
- 20
13. Un procedimiento para obtener células de hibridoma de acuerdo con la reivindicación 8 o la reivindicación 9 de una población mixta de hibridomas, el procedimiento comprende aislar al menos una porción de las células de hibridoma de una población mixta de hibridomas, en el que la población mixta de hibridomas se deposita en la Colección Americana de Cultivos Tipos de Tejidos (ATCC) con el número de acceso HB11785.
- 25
14. La población de anticuerpos de acuerdo con la reivindicación 3, en la que los primeros anticuerpos y/o fragmentos de unión al antígeno de los mismos son anticuerpos quiméricos que comprenden:
- 30
- (a) una región constante de la cadena pesada que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos como se define en los residuos 138-467 de la **SEQ ID NO: 9**; y
- (b) una región constante de la cadena ligera que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos como se define en los residuos de 128-234 de la **SEQ ID NO: 10**.
- 35

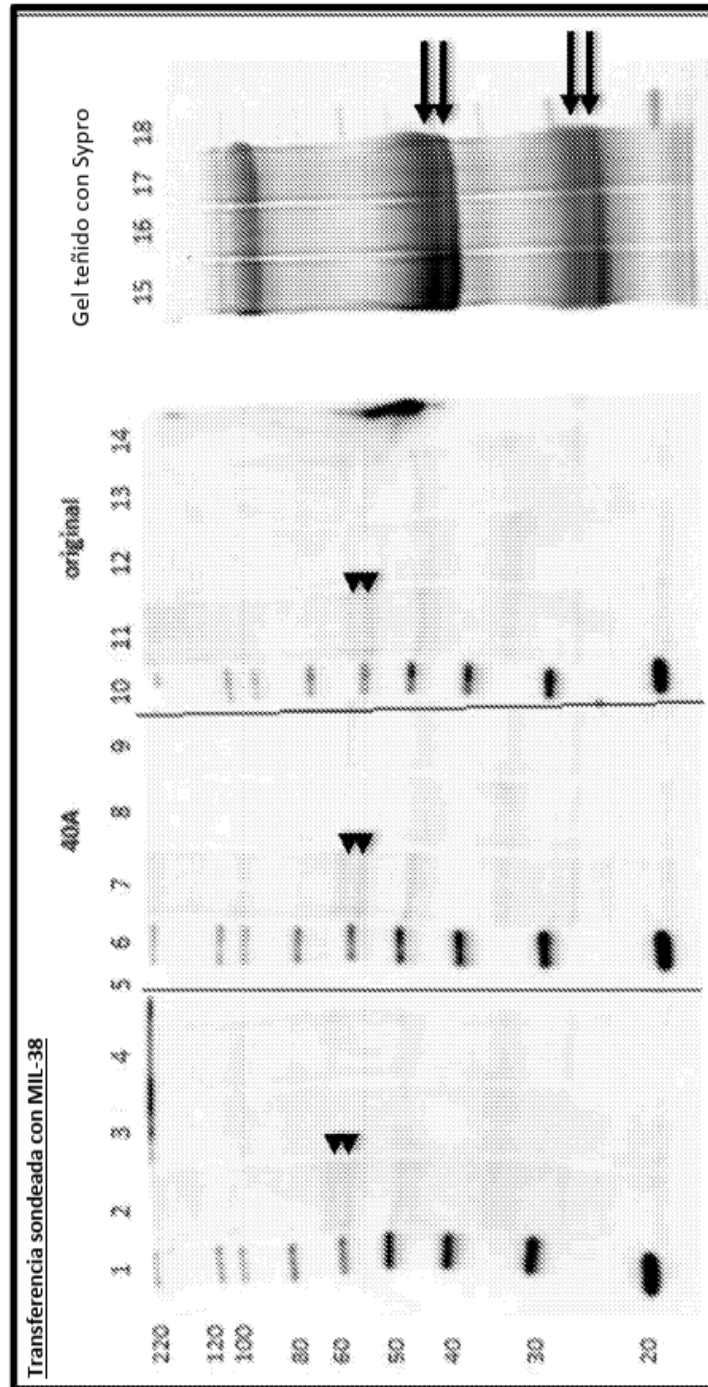


FIGURA 1

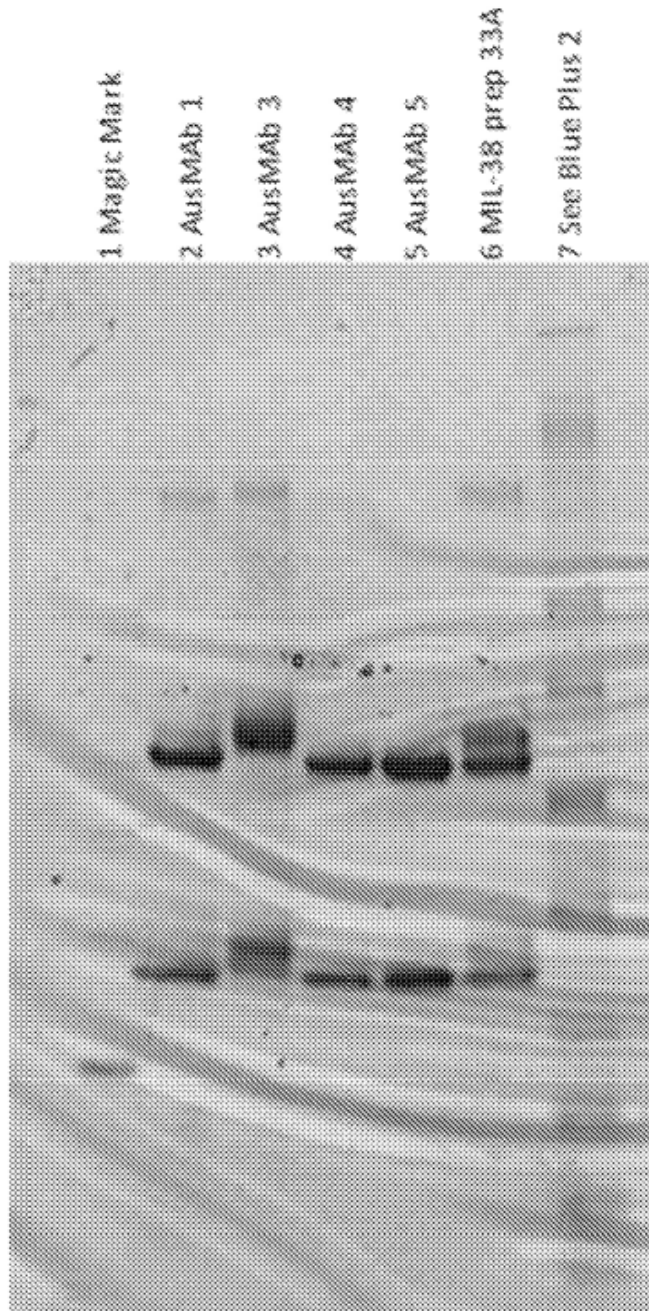


FIGURA 2A

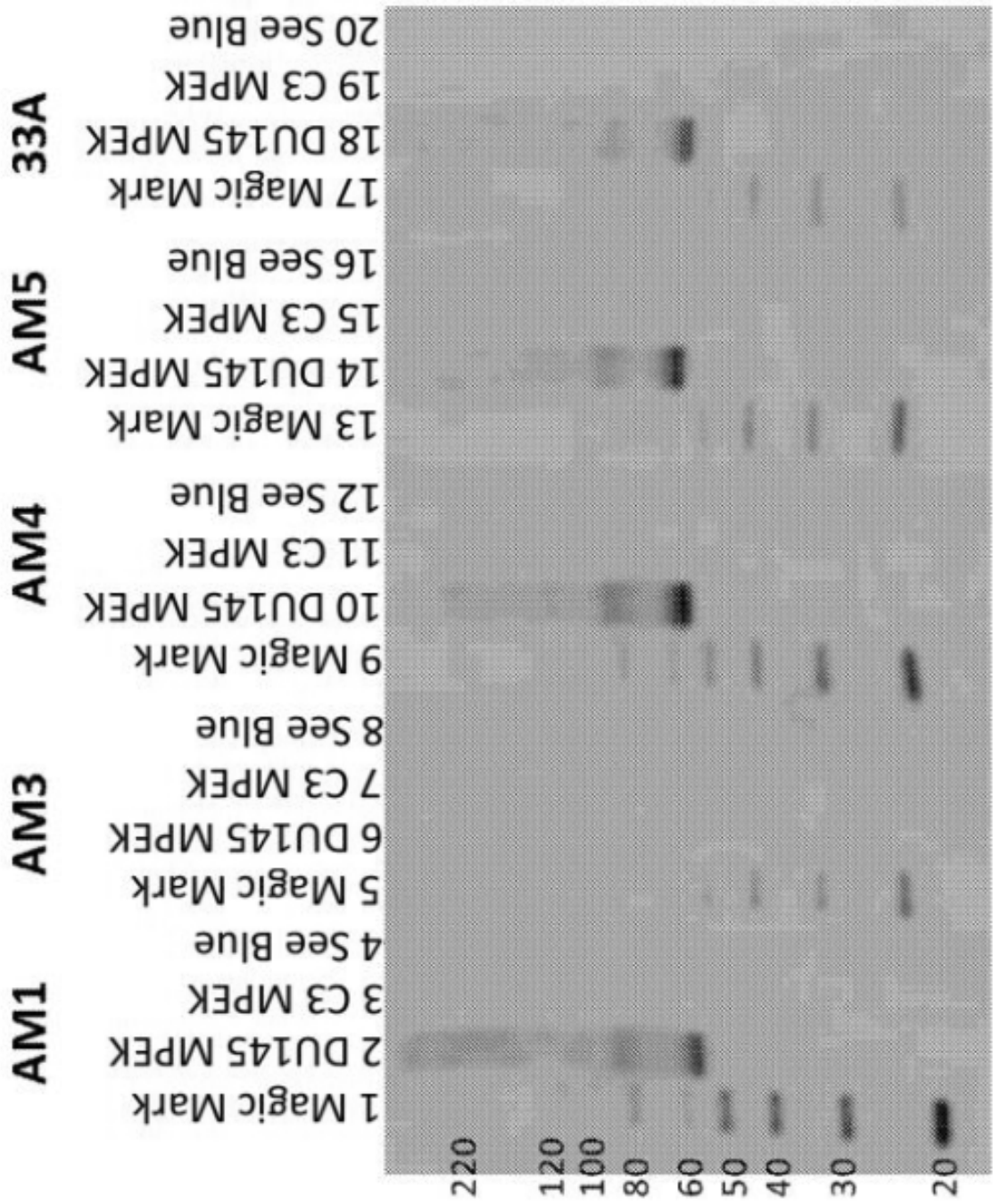


FIGURA 2B

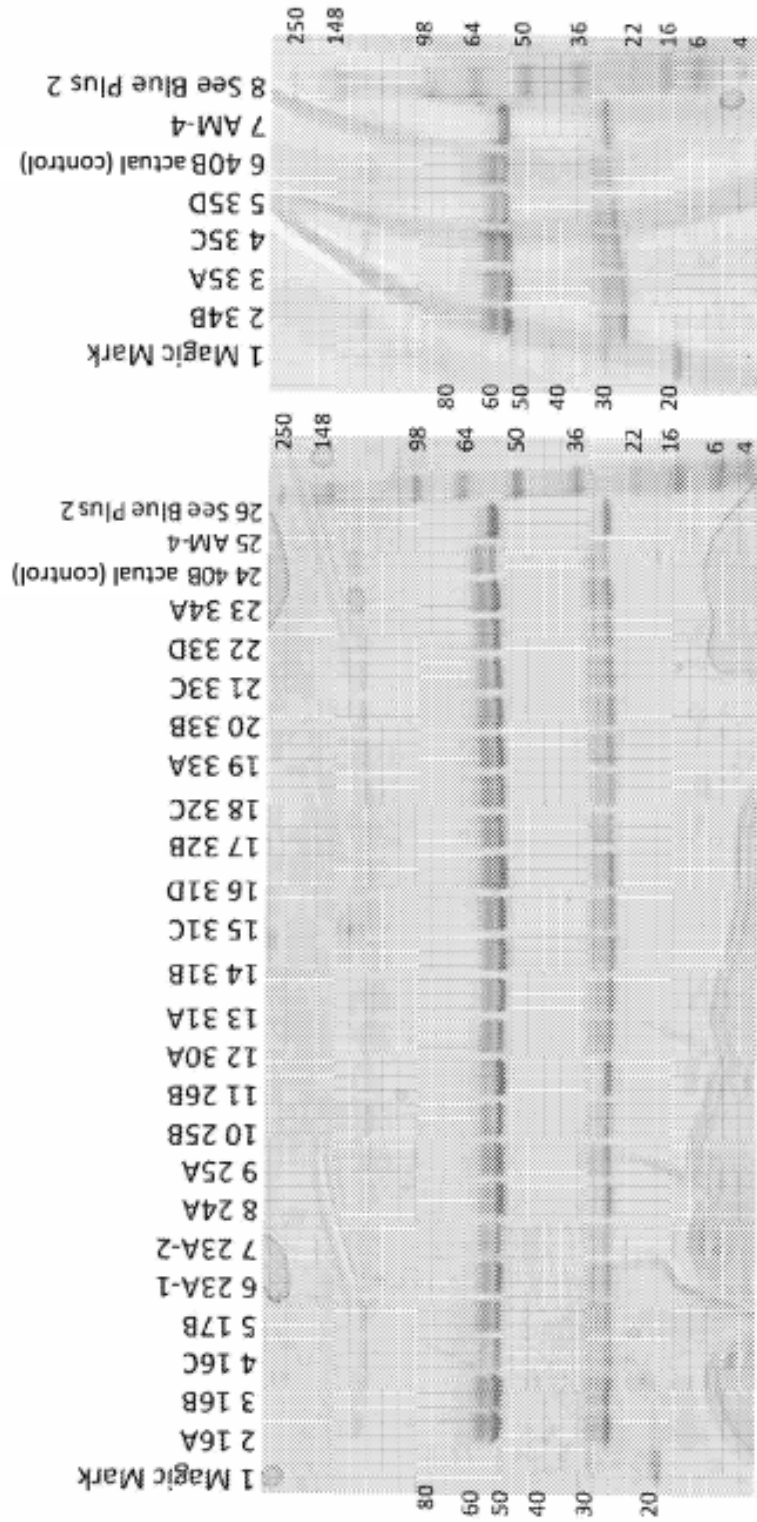


FIGURA 3A

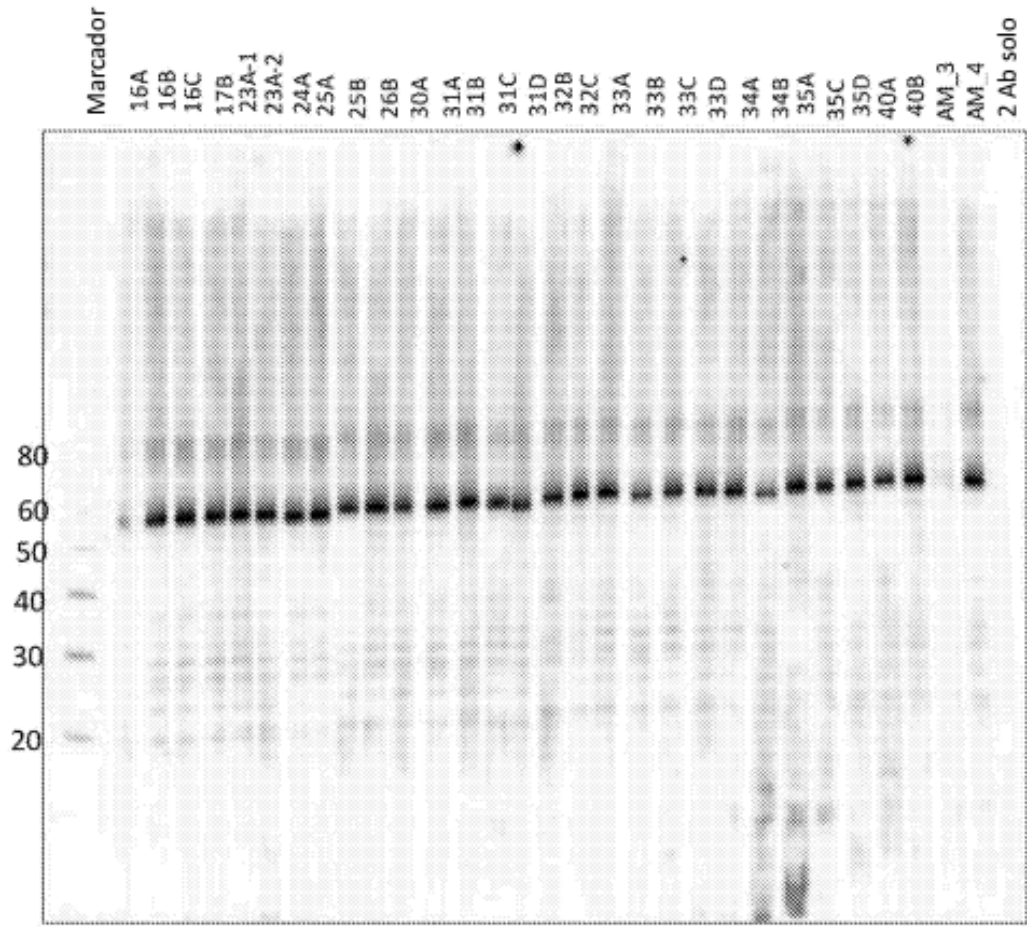


FIGURA 3B

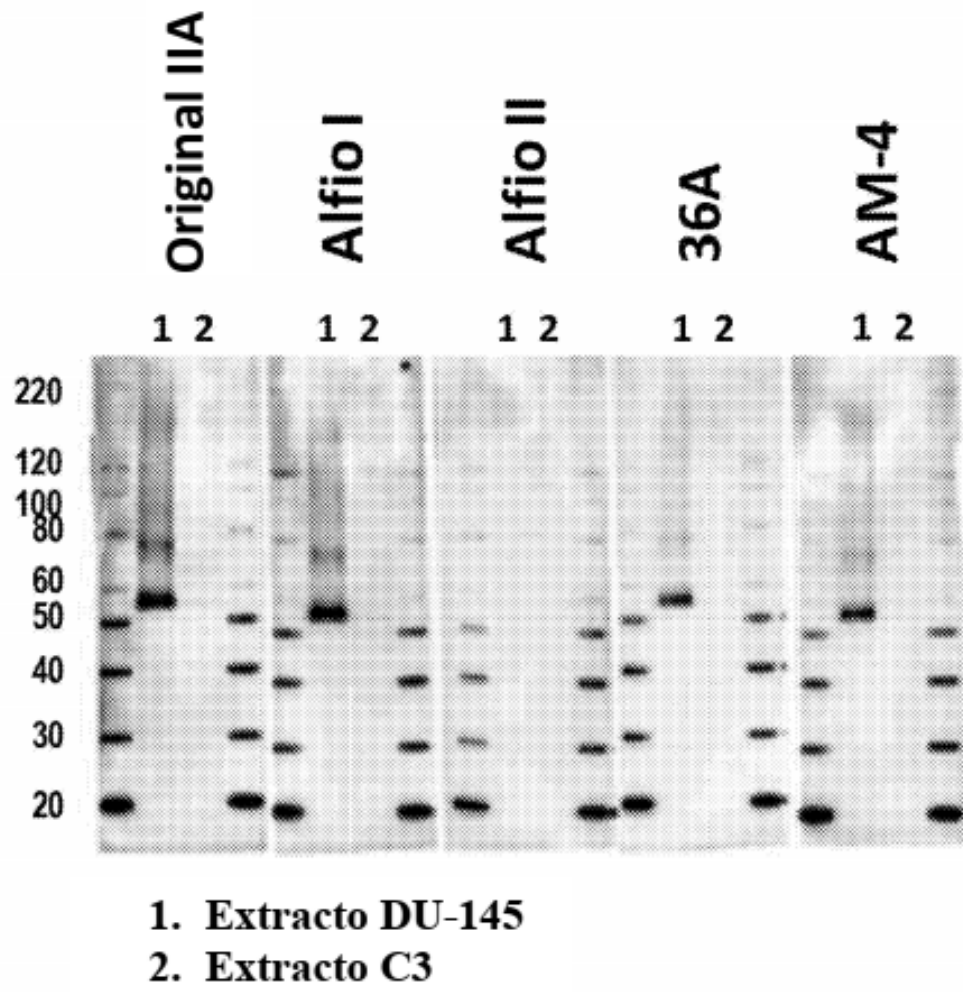


FIGURA 4A

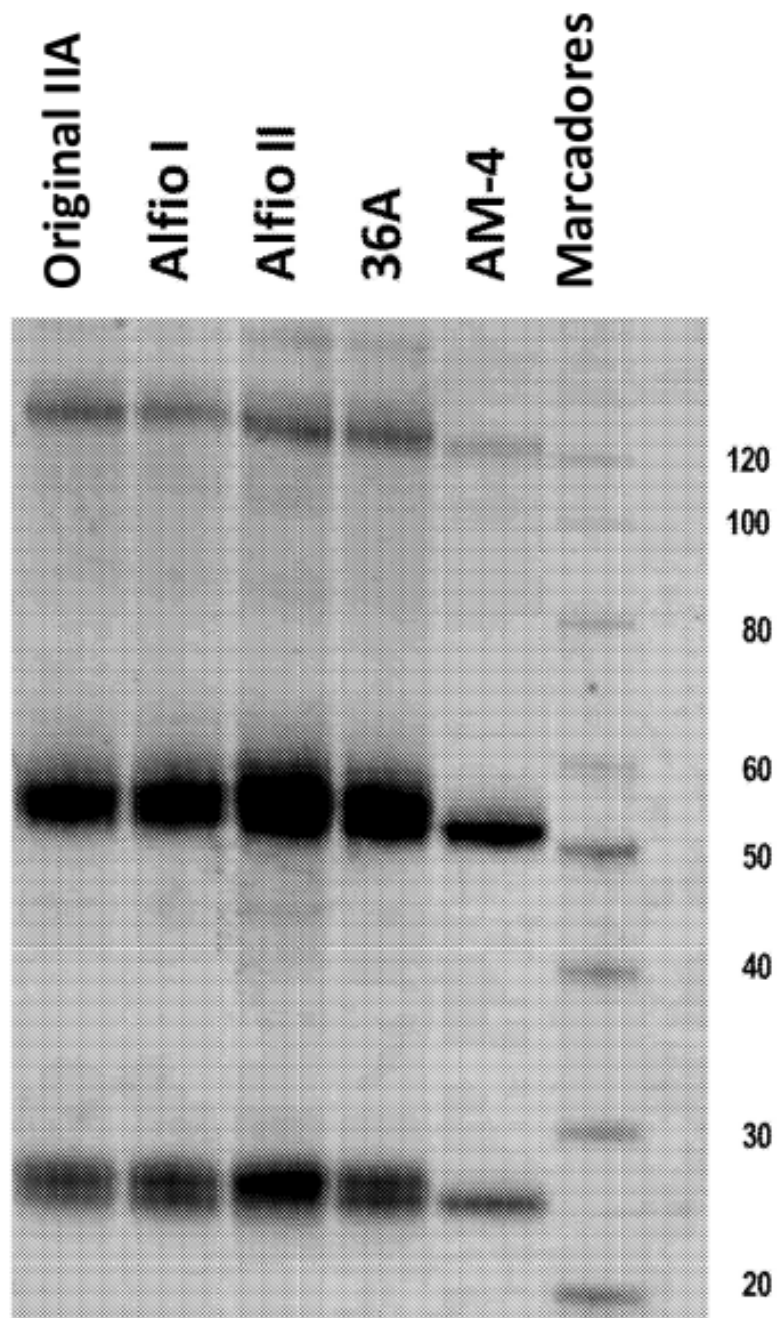


FIGURA 4B

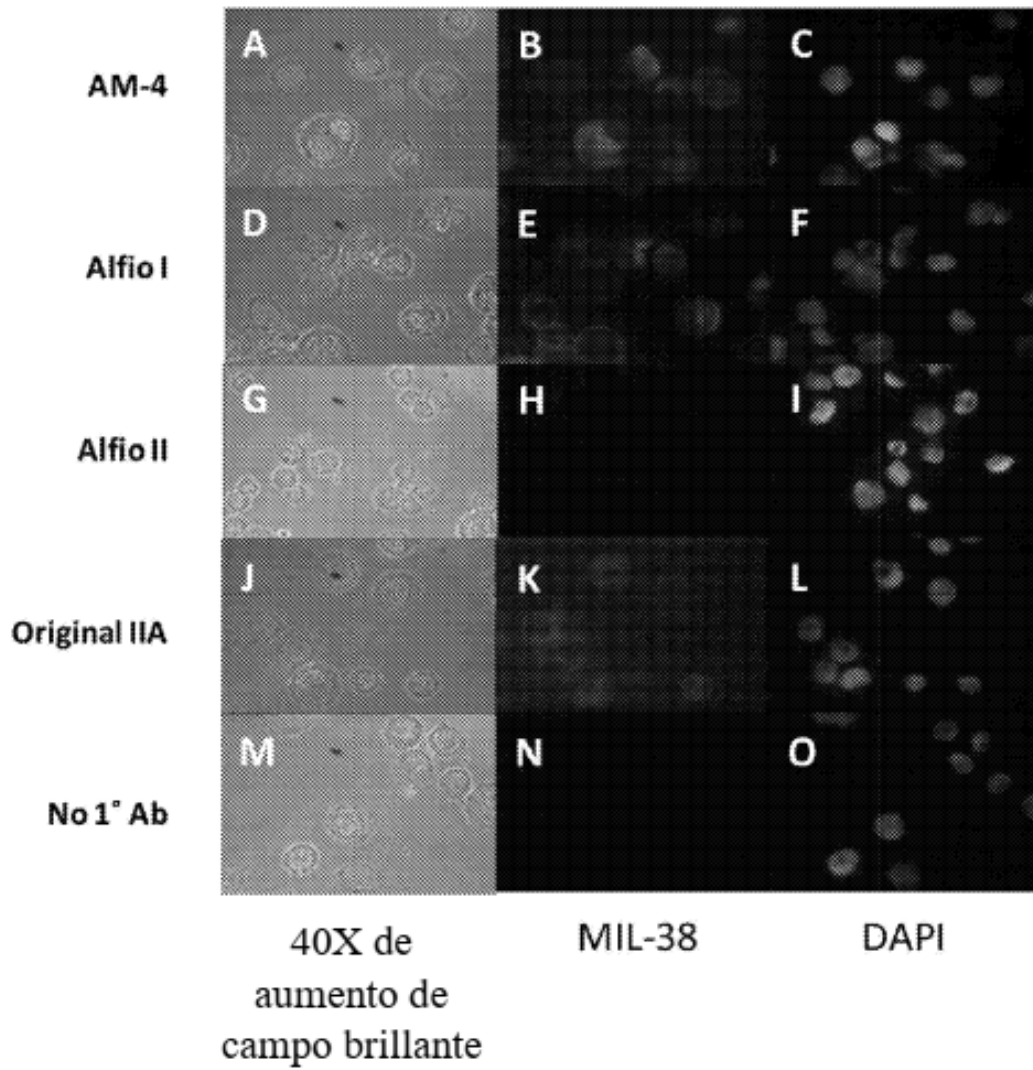


FIGURA 5A

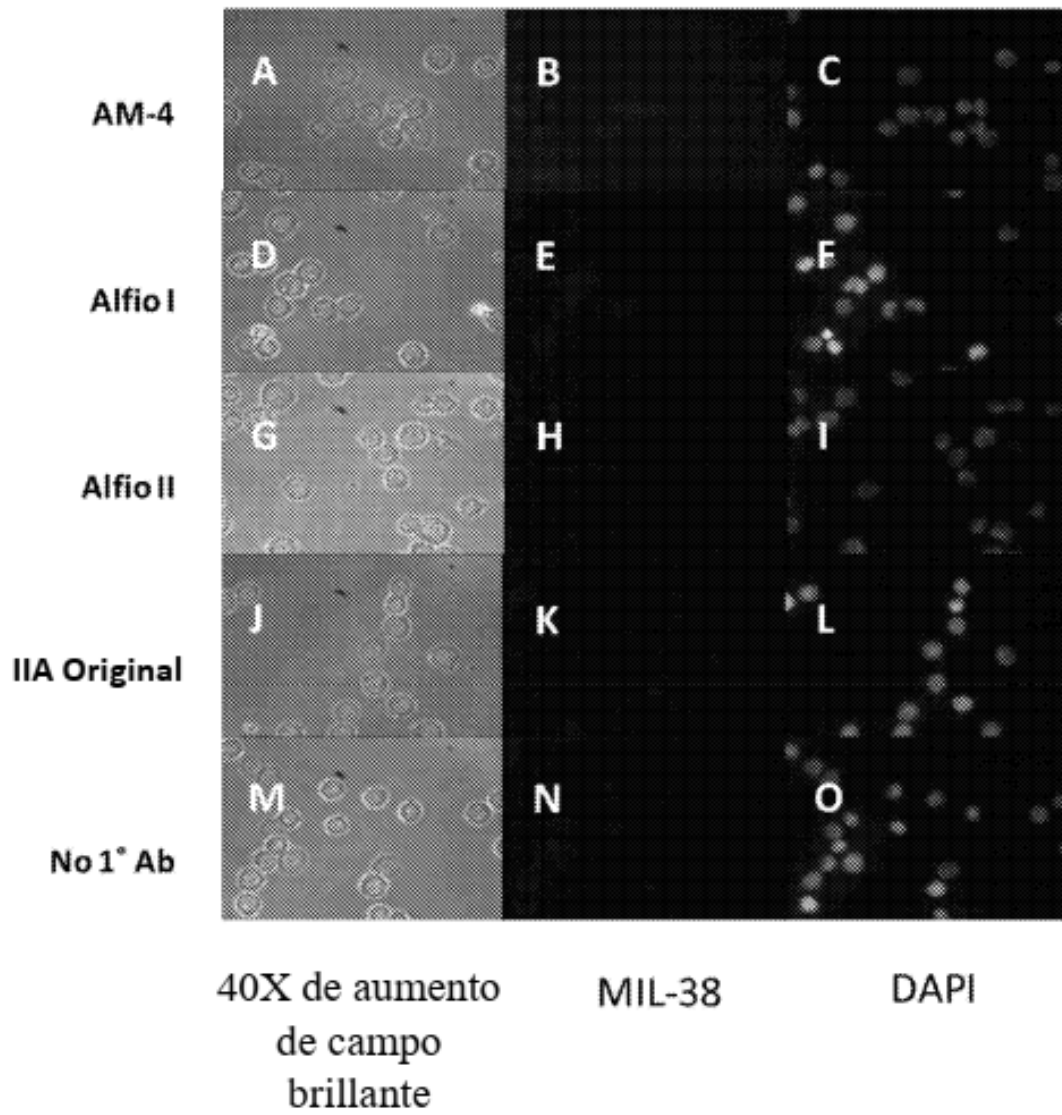


FIGURA 5B

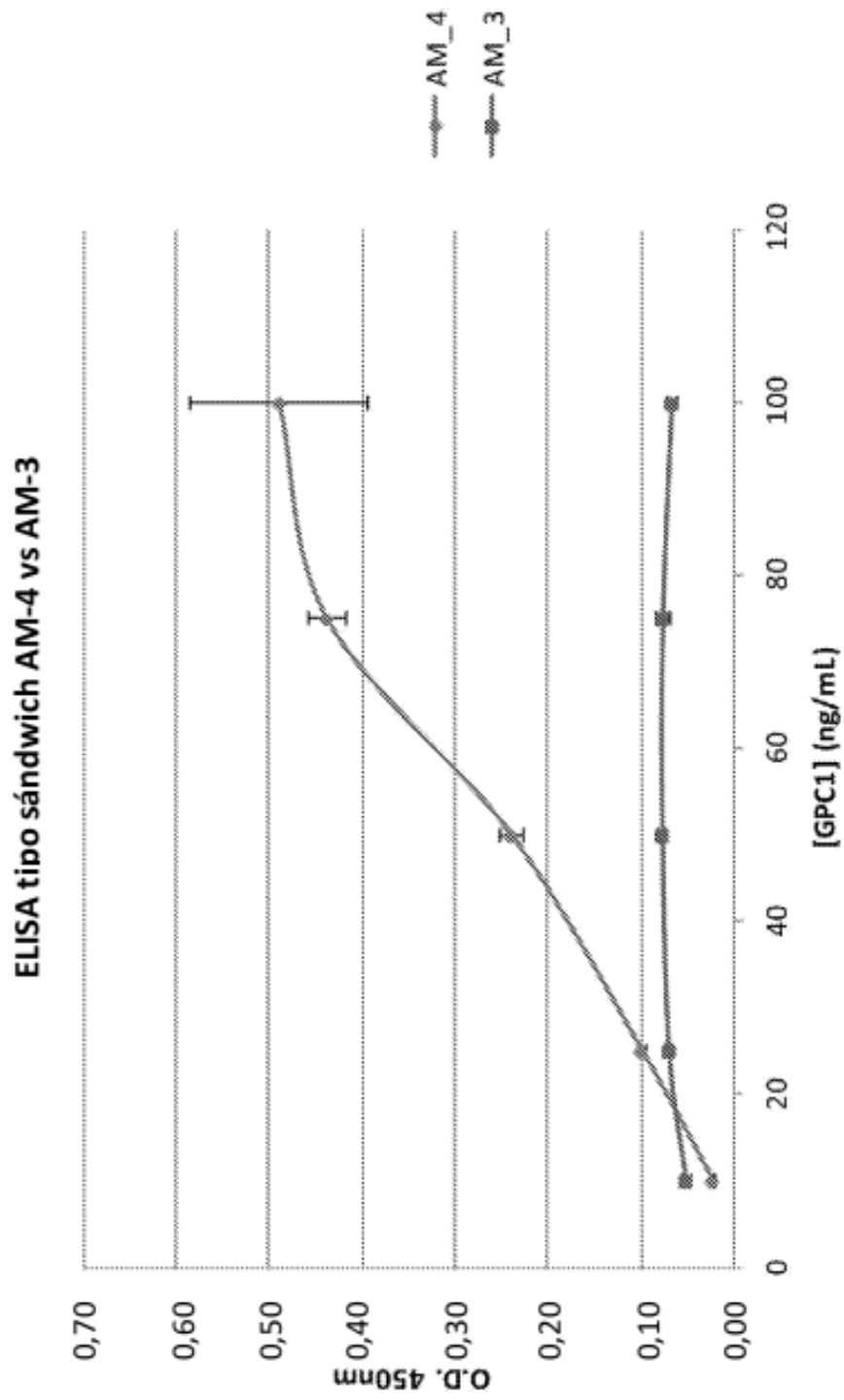


FIGURA 6A

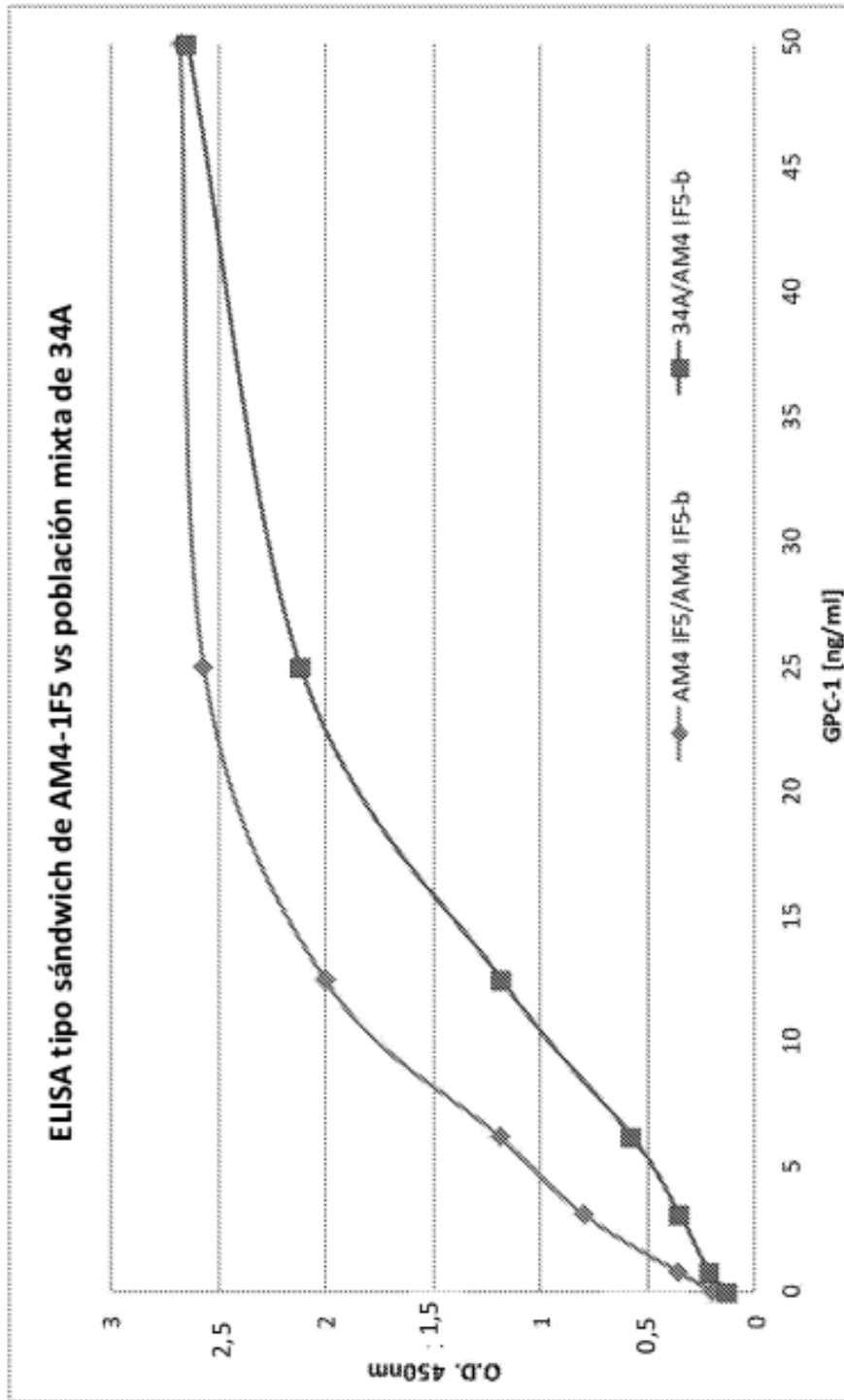


FIGURA 6B

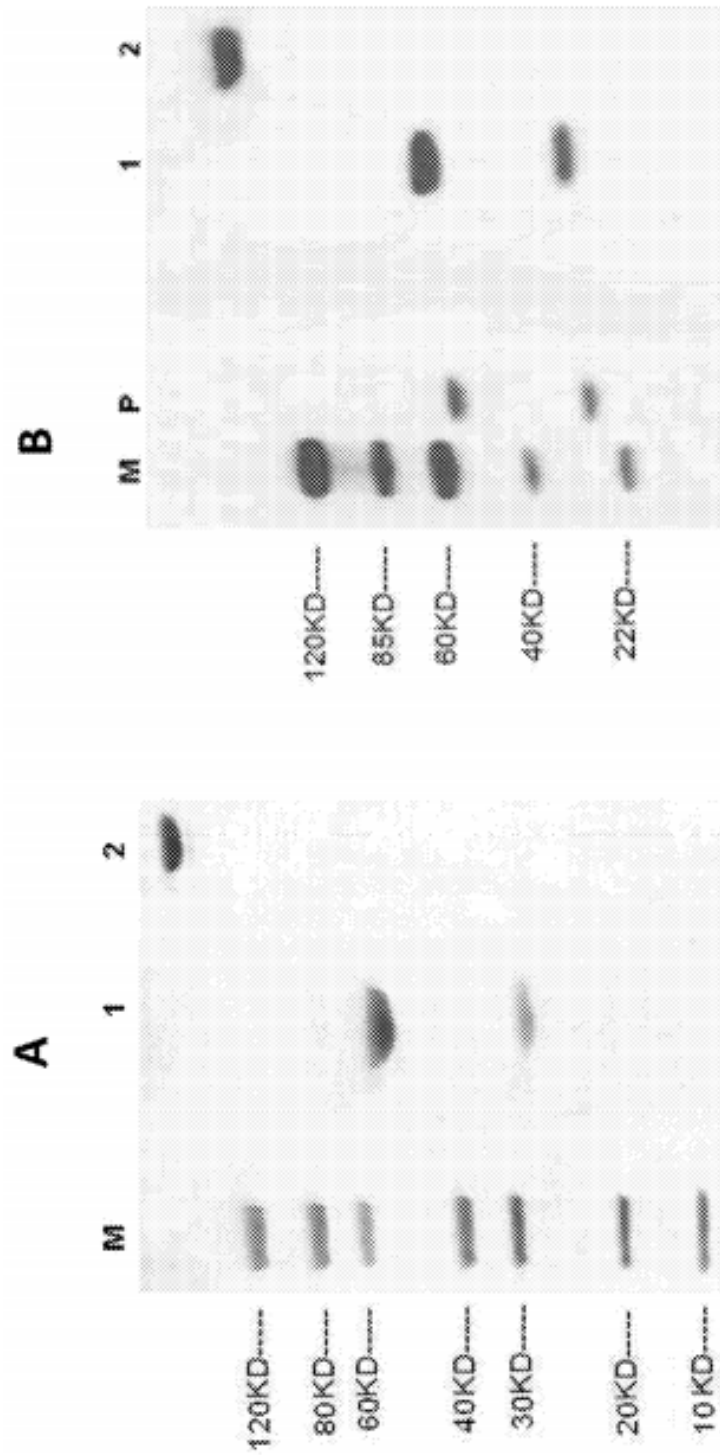


FIGURA 7

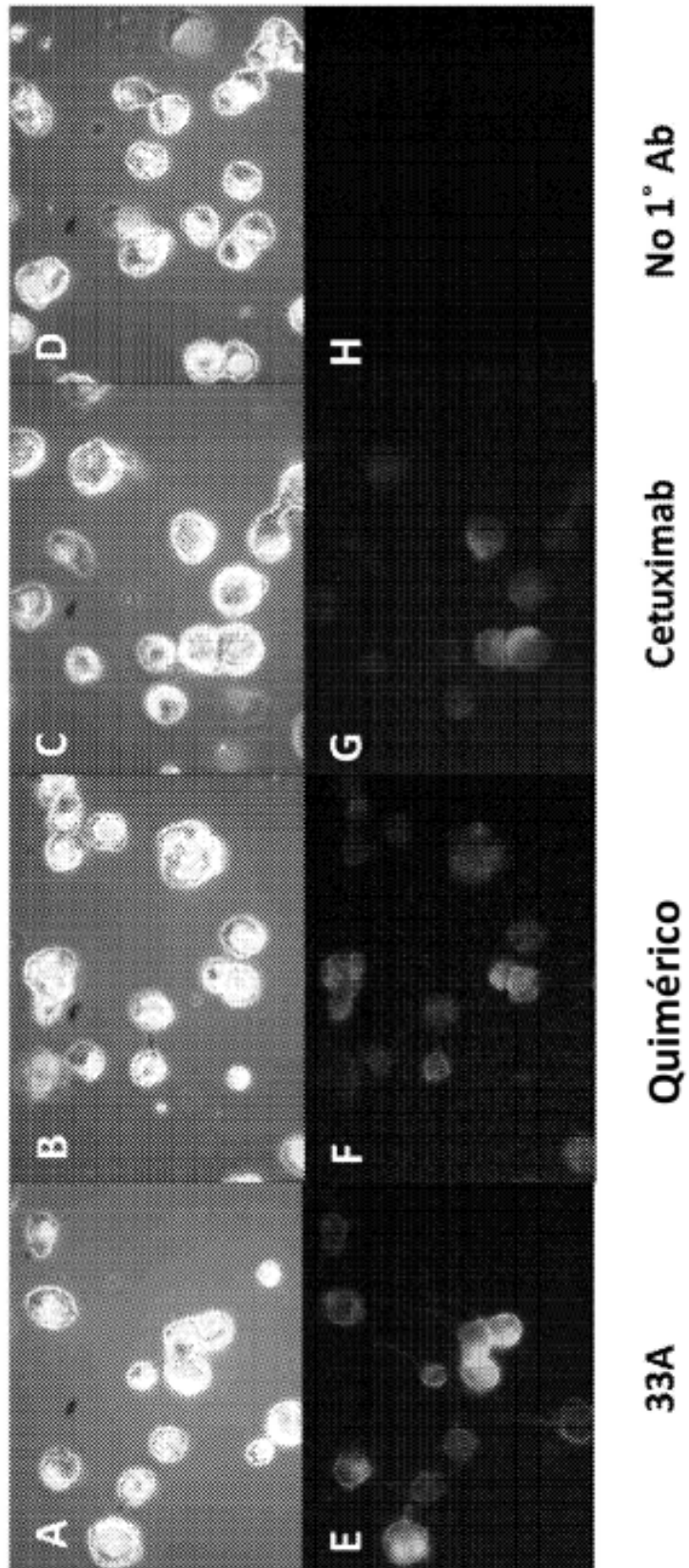


FIGURA 8

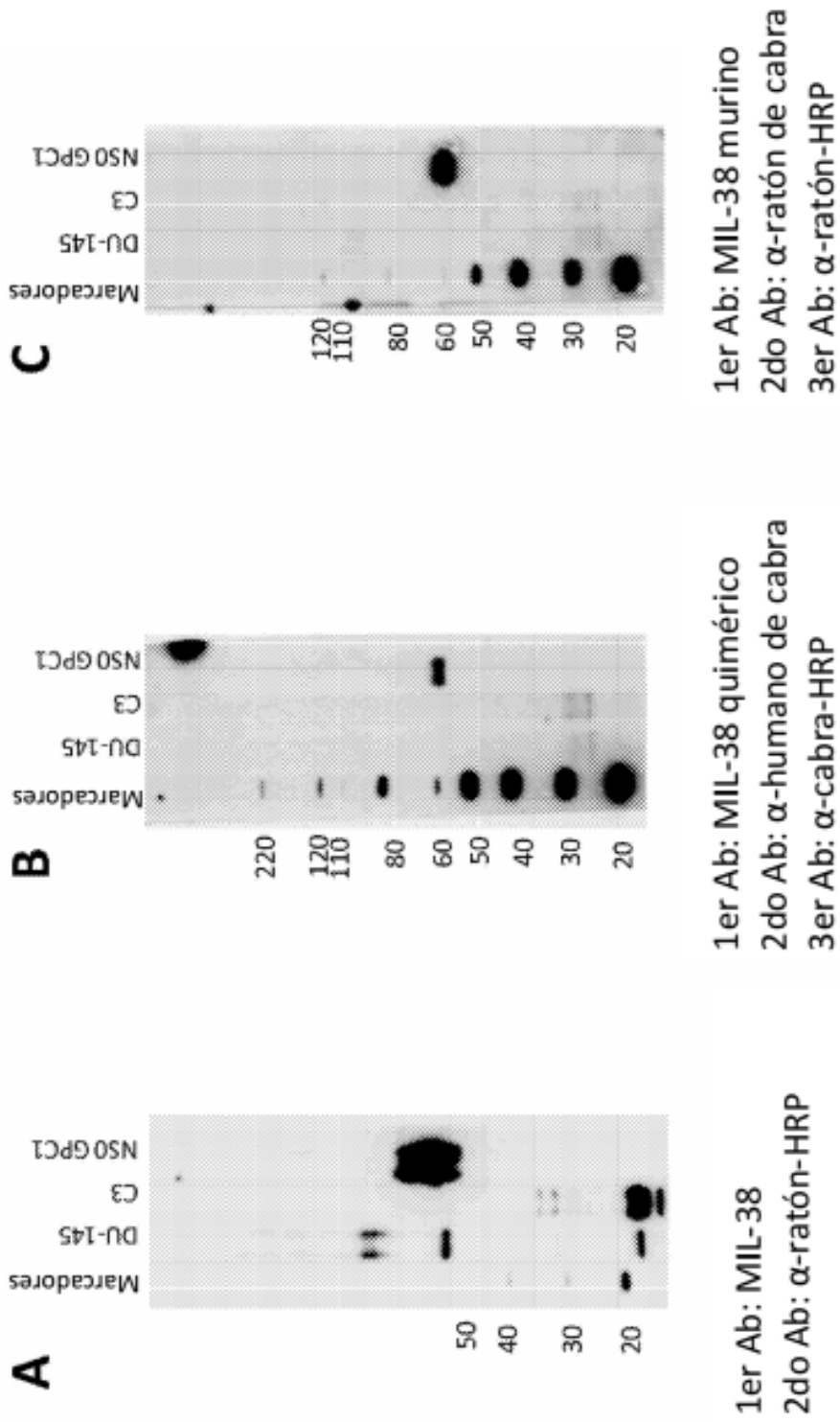


FIGURA 9