

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 803 217**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.01.2015 PCT/AU2015/000018**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.07.2015 WO15106311**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.01.2015 E 15737205 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020 EP 3094976**

54 Título: **Antígeno de superficie de células de cáncer de próstata para el diagnóstico**

30 Prioridad:

17.01.2014 US 201461928776 P

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

25.01.2021

73 Titular/es:

**MINOMIC INTERNATIONAL LTD. (100.0%)
Suite 2 Ground Floor, 75 Talavera Road
Macquarie Park, NSW 2113, AU**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

VIDAL GONZÁLEZ, Maria Ester

ES 2 803 217 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

Antígeno de superficie de células de cáncer de próstata para el diagnóstico

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere en general al campo del diagnóstico del cáncer de próstata. En particular, la presente invención se refiere a la identificación de biomarcadores en muestras biológicas, que pueden usarse en la detección de cáncer de próstata. Como se describe en la presente descripción, los marcadores identificados pueden usarse, además, para determinar el pronóstico y controlar la respuesta al tratamiento en los pacientes con cáncer de próstata.

Antecedentes de la invención

El cáncer de próstata es el cáncer visceral diagnosticado con mayor frecuencia y la segunda causa principal de muerte por cáncer en hombres en los Estados Unidos. La Sociedad Estadounidense del Cáncer estima que en 2013 se diagnosticarán unos 238 590 nuevos casos de cáncer de próstata y 29 720 hombres morirán de la enfermedad. En general, uno de cada seis hombres será diagnosticado con cáncer de próstata en su vida.

Actualmente, el cáncer de próstata puede detectarse mediante un examen rectal digital (DRE) o mediante la medición del antígeno prostático específico (PSA) en la sangre de los pacientes. Sin embargo, ninguna de las pruebas es completamente concluyente, y ambas pueden conducir a falsos negativos (lo que deja sin detectar los cánceres reales) y falsos positivos (que señala cáncer donde no lo hay). Por ejemplo, las pruebas estándar de PSA realizadas con el límite recomendado de 4,0 ng/mL, son 86 % sensibles en pacientes con cáncer pero solo 33 % específicas, lo que produce falsos positivos en aproximadamente el 67 % de los pacientes sin cáncer (Hoffman y otros, 2002). Los falsos positivos habitualmente son seguidos por biopsias invasivas y dolorosas. Suhovskih y otros, (2013) describen la expresión de glipicano-1 en tejido prostático humano normal y en cáncer de próstata.

Existe una necesidad de pruebas de diagnóstico de cáncer de próstata con mayor precisión y/o sensibilidad.

30 Resumen de la invención

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que los niveles del proteoglicano de heparán sulfato de glipicano-1 (GPC-1) soluble están elevados en los fluidos o tejidos corporales de pacientes con cáncer de próstata. Los presentes inventores descubrieron que el glipicano-1 soluble es un nuevo marcador para el cáncer de próstata. Por consiguiente, la presente invención proporciona los métodos para detectar glipicano-1 soluble con el propósito de determinar la existencia de cáncer de próstata en pacientes.

La invención proporciona un método in vitro para detectar cáncer de próstata en un paciente, el método que comprende medir el nivel de glipicano-1 soluble en una muestra de fluido corporal seleccionada del grupo que consiste en sangre, suero, plasma, y orina, que se obtiene de un paciente y determinar que dicho paciente tiene cáncer de próstata o una mayor probabilidad de desarrollar cáncer de próstata en base al nivel de glipicano-1 soluble en la muestra de fluido corporal, en donde se comparan los niveles medidos de glipicano-1 soluble en la muestra de fluido corporal del paciente con respecto a: una muestra de control de fluido corporal que se obtiene de un paciente que no tiene cáncer; o valores de referencia predeterminados o intervalos de valores de referencia. En algunas modalidades, los niveles de uno o más marcadores adicionales de próstata se miden en la muestra de fluido corporal, y la determinación de que el paciente tiene cáncer se basa en los niveles de glipicano-1 soluble y en los niveles de uno o más marcadores adicionales en la muestra de fluido corporal del paciente. En algunas modalidades, el cáncer es cáncer de próstata, y el marcador adicional es PSA. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-glipicano-1 es MIL-38. En otras modalidades, el anticuerpo anti-glipicano-1 no es MIL-38. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-glipicano-1 es un fragmento de anticuerpo o anticuerpo recombinante capaz de unirse a glipicano-1. El anticuerpo anti-glipicano-1 puede marcarse para una fácil detección. El marcador de anticuerpos puede ser un marcador fluorescente, un sistema de amplificación de biotina-avidina, un sistema de quimioluminiscencia, microesferas u oro coloidal, entre otros.

La muestra de fluido corporal que se obtiene del paciente es una muestra de sangre, suero, plasma, u orina.

En una modalidad, la unión del anticuerpo anti-glipicano-1 a la muestra de fluido corporal del paciente se compara con el nivel de unión del anticuerpo anti-glipicano-1 de una muestra de control; en donde la unión aumentada del anticuerpo anti-glipicano-1 de la muestra de fluido corporal sobre la muestra de control se asocia con la presencia de cáncer de próstata. En algunas modalidades, dicha muestra de control comprende el fluido corporal de un paciente de la misma edad que no tiene cáncer de próstata.

En otras modalidades, el nivel de unión del anticuerpo anti-glipicano-1 al fluido corporal del paciente se compara con el nivel de unión del anticuerpo anti-glipicano-1 a un estándar de referencia, en donde la unión incrementada del anticuerpo anti-glipicano-1 a la muestra de fluido corporal con respecto a la muestra estándar de referencia se asocia con la presencia de cáncer de próstata. En algunas modalidades, dicho estándar de referencia comprende una muestra con un contenido conocido de glipicano-1 soluble. En algunas modalidades, la comparación de la unión del anti-glipicano-1 al fluido o tejido

corporal se compara con la unión del anti-glipicano-1 a los estándares de glipicano-1 para cuantificar la cantidad de glipicano-1 soluble en dicho fluido corporal.

5 El contenido de glipicano-1 soluble superior a aproximadamente: 0,1 ng/mL, 0,5 ng/mL, 1 ng/mL, 5 ng/mL, 10 ng/mL, 15 ng/mL o 20 ng/mL en la muestra de fluido corporal puede ser indicativo de cáncer de próstata.

10 Los métodos de diagnóstico descritos en la presente descripción pueden comprender, además, administrar uno o más tratamientos para el cáncer de próstata a un paciente, y seguir los cambios en el nivel de glipicano-1 en fluidos o tejidos corporales como un mecanismo para controlar la recuperación del paciente o las respuestas a los tratamientos para el cáncer de próstata. La unión del anticuerpo antiglipicano-1 puede detectarse mediante técnicas tales como inmunofluorescencia, radiomarcaje, inmunotransferencia, inmunoensayo ligado a enzimas, citometría de flujo, densidad óptica, y quimioluminiscencia.

15 La presente descripción incluye, además, kits para detectar glipicano-1 en los fluidos o tejidos corporales de los pacientes. Como se describe en la presente descripción, el kit para detectar el cáncer de próstata comprende un primer anticuerpo anti-glipicano-1, un vehículo aceptable farmacéuticamente, y estándares de glipicano-1; en donde dicho kit es capaz de detectar glipicano-1 en el fluido o tejido corporal de un paciente. Como se describe en la presente descripción, el kit comprende, además, un ligando secundario. Como se describe en la presente descripción, el ligando secundario es un segundo anticuerpo anti-glipicano-1. Como se describe en la presente descripción, el segundo anticuerpo anti-glipicano-1 es el mismo que el primer anticuerpo anti-glipicano-1.

20 Como se describe en la presente descripción, el ligando secundario se conjuga con un marcador para la detección rápida de dicho ligando.

25 La presente invención se refiere, por lo tanto, a un método in vitro para detectar cáncer de próstata en un paciente, el método comprende medir el nivel de glipicano-1 soluble en una muestra de fluido corporal seleccionada del grupo que consiste en sangre, suero, plasma, y orina, que se obtiene de un paciente y determinar que dicho paciente tiene cáncer de próstata o una mayor probabilidad de desarrollar cáncer de próstata en base al nivel de glipicano-1 soluble en la muestra de fluido corporal, en donde los niveles medidos de glipicano-1 soluble en la muestra de fluido corporal del paciente se comparan con respecto a: una muestra de control de fluido corporal que se obtiene de un paciente que no tiene cáncer; o valores de referencia predeterminados o intervalo de valores de referencia.

Otras modalidades se definen mediante las reivindicaciones adjuntas.

35 Breve descripción de las figuras

Figura 1. Caracterización del antígeno glipicano-1 MIL-38 unido a la célula.

40 Las células de cáncer de próstata DU-145 se procesaron con un kit de Extracción de Proteína de Membrana (MPEK, Merck) y se incubaron con el anticuerpo MIL-38 unido a perlas magnéticas. El antígeno se inmunoprecipitó y se lavó sobre las perlas magnéticas antes de eluir el antígeno y someter dicho antígeno a análisis de espectrometría de masas. Los resultados del análisis de espectrometría de masas muestran que se identifica glipicano-1 como el antígeno de MIL-38. Las 18 secuencias peptídicas únicas que abarcan la proteína glipicano-1 están subrayadas.

Figura 2. Inmunoprecipitación de MIL-38 y cromatografía de exclusión por tamaño.

45 Los extractos de membrana de las células DU-145 de cáncer de próstata se inmunoprecipitaron mediante el uso de MIL-38 y se pasaron por una columna de cromatografía de exclusión por tamaño. La figura muestra el análisis de transferencia Western de fracciones de cromatografía por pares mediante el uso del anticuerpo MIL-38 o el control de anticuerpo secundario. El antígeno de MIL-38 se muestra a 60Kd en las fracciones A28 y A30.

Figura 3. La espectrometría de masas del antígeno de MIL-38 purificado por cromatografía de exclusión por tamaño.

50 La fracción número A29 de la separación mediante cromatografía de exclusión por tamaño de la Figura 2 se analizó mediante espectrometría de masas. Los resultados del análisis de espectrometría de masas muestran que se identificó glipicano-1 como el antígeno de MIL-38 con 8 secuencias peptídicas únicas que abarcan la proteína glipicano-1 subrayada.

Figura 4. Los anticuerpos MIL-38 y anti-GPC-1 muestran una reactividad superpuesta en la transferencia western de gel 2D.

55 Los extractos de proteínas de membrana de las células DU-145 de cáncer de próstata se separaron en gel 2D (gradiente horizontal pl y masa molecular verticilo). Las transferencias Western que usan el anticuerpo MIL-38 y los anticuerpos policlonales de conejo rGPC-1 comerciales muestran una reactividad superpuesta que marca una proteína de 60Kd (encerrada en un círculo en la figura). El carril D es una separación unidimensional para los extractos de DU-145 como control. El carril M es un carril de separación unidimensional para marcadores de tamaño molecular como controles.

60 Figura 5. MIL-38 puede detectar inmunoprecipitados de anticuerpos GPC-1 y viceversa.

65 Cada uno de los anticuerpos MIL-38 y anti-GPC-1 de conejo se usaron para inmunoprecipitar sus antígenos a partir de los extractos de proteína de membrana de las células DU-145 de cáncer de próstata o células C3 (MIL-38 negativas). Se muestran las transferencias Western de los inmunoprecipitados detectadas con los anticuerpos MIL-38 o anti-GPC-1. La Figura 5A representa la detección de GPC-1 de los inmunoprecipitados de MIL-38 (izquierda) y la detección de MIL-38 de los inmunoprecipitados de GPC-1 (derecha). La Figura 5B representa la detección de MIL-38 de inmunoprecipitados de MIL-38 como un control. Los carriles son: marcador de proteína comercial Magic Mark como control; extracto de proteína

de membrana de cáncer de próstata DU145 MPEK (no inmunoprecipitado); flujo de DU145 FT de cáncer de próstata a través de la inmunoprecipitación; inmunoprecipitados DU145 IP mediante el uso de anticuerpo; Extracto de proteína de membrana de control C3 MPEK- (negativo MIL-38) (no inmunoprecipitado); C3 FT- (MIL-38 negativo) flujo celular a través de la inmunoprecipitación; elución de C3 IP (MIL-38 negativo) inmunoprecipitado de células mediante el uso de anticuerpos. MIL-38 puede detectar el inmunoprecipitado del anticuerpo rGPC-1 y viceversa. MIL-38 puede unirse, además, a todos los controles, que incluye el MPEK de DU145 y al IP conducido por MIL-38.

Figura 6. MIL-38 detecta glipicano-1 recombinante

Un glipicano-1 recombinante que se produjo en células NS0 se evaluó en términos de reactividad con MIL-38 y anticuerpos anti-GPC-1. Las transferencias Western muestran reactividad tanto de MIL-38 como del anticuerpo policlonal anti-GPC-1 de conejo con el glipicano-1 recombinante. Los carriles son: marcador de proteína comercial Magic Mark como control; GPC-1 Proteína Glipicano-1 recombinante; GPC-1 red- Proteína Glipicano-1 recombinante con agente reductor.

Figura 7. MIL-38 puede detectar el antígeno secretado en el sobrenadante de cultivo celular.

Las células de cáncer de próstata DU-145 se incubaron con medio libre de suero durante 36 horas para producir medio condicionado sin células. El medio condicionado sin células se inmunoprecipitó mediante el uso del anticuerpo MIL-38 y se comparó con un IP estándar mediante el uso de extractos de proteína de membrana MPEK DU-145. Se muestra una transferencia western de los inmunoprecipitados mediante el uso del anticuerpo MIL-38. El anticuerpo MIL-38 puede detectar antígenos de 40 y 55 kD en el medio líquido condicionado.

Figura 8. El antígeno de MIL-38 detectado en el sobrenadante del cultivo celular es glipicano-1

Las células de cáncer de próstata DU-145 se incubaron con medio libre de suero durante 36 horas para producir medio condicionado sin células. El medio condicionado se inmunoprecipitó mediante el uso del anticuerpo MIL-38 y los inmunoprecipitados se enviaron para análisis de espectrometría de masas. Figura 8A. Una muestra que contenía los antígenos reactivos de MIL-38 de 40 y 55 kD se sometió a análisis de espectrometría de masas. Los resultados del análisis de espectrometría de masas muestran que se identifica glipicano-1 como el antígeno de MIL-38 del medio líquido condicionado con 9 secuencias de péptidos únicas que abarcan el extremo N-terminal de la proteína glipicano-1 subrayada. Figura 8B. Una muestra que contiene el antígeno reactivo de MIL-38 de 40 kDa se sometió a análisis de espectrometría de masas. Los resultados del análisis de espectrometría de masas muestran que se identifica glipicano-1 como el antígeno de MIL-38 del medio líquido condicionado con 10 secuencias peptídicas únicas que abarcan el extremo N-terminal de la proteína glipicano-1 subrayada. Figura 8C. Una muestra que contiene el antígeno reactivo de MIL-38 de 55 kDa se sometió a análisis de espectrometría de masas. Los resultados del análisis de espectrometría de masas muestran que se identifica glipicano-1 como el antígeno de MIL-38 del medio líquido condicionado con 9 secuencias de péptidos únicas que abarcan el extremo N-terminal de la proteína glipicano-1 subrayada.

Figura 9. El anticuerpo MIL-38 puede detectar glipicano-1 en el plasma de pacientes con cáncer de próstata y en extractos de membrana de cánceres de próstata.

Figura 9A. Las muestras de plasma de un paciente control normal y un paciente con cáncer de próstata se inmunoprecipitaron con el anticuerpo MIL-38. Se muestran transferencias Western con los anticuerpos MIL-38 y rGPC1. MIL-38 inmunoprecipitó niveles más altos de proteína glipicano-1 en el plasma del paciente con cáncer de próstata que en el plasma del paciente control. Los carriles son: 046 IP NT -IP del plasma de cáncer de próstata; 046 IP Hep1- IP del plasma de cáncer de próstata tratado con heparinasa; 042 IP NT -IP del plasma de control normal; 042 IP Hep1 -IP del plasma de control normal tratado con heparinasa; Magic Mark marcador de proteína comercial como control. Figura 9B. Se obtuvieron extractos de proteínas de membrana de una próstata normal y de próstata de cáncer a partir de Novus Bio. Se realizaron transferencias western de cantidades equivalentes de proteína mediante el uso del anticuerpo MIL-38. El extracto de cáncer de próstata demostró una mayor expresión del antígeno de MIL-38.

Figura 10. MIL-38 puede detectar cáncer en la orina de pacientes con cáncer de próstata.

Se recolectaron muestras de orina de 125 pacientes de la misma edad y se analizó la presencia de cáncer de próstata mediante el uso del anticuerpo MIL-38 en un ensayo de inmunofluorescencia indirecta. Los pacientes se clasificaron como controles sanos, hipertrofia prostática benigna (BPH) o cáncer de próstata (CaP) en base a la confirmación de la biopsia (BPH, CaP) o al análisis de los factores de riesgo (controles sanos). La figura muestra imágenes ilustrativas de muestras experimentales de CaP; DU145 muestras de control positivo; y muestras de control negativo C3.

Figura 11. MIL-38 puede detectar glipicano-1 recombinante en una diversidad de formatos de ELISA

Los ELISA de tipo sándwich se realizaron mediante el uso de 0, 0,1, 1 o 10 ng de la proteína de glipicano-1 humana producida en NS0 recombinante (rhGPC1) como analito. Figura 11A. Captura con anticuerpos MIL-38, detección con policlonal anti-GPC1 (a-GPC1) generado en conejo. Figura 11B. Captura con anticuerpo anti-glipicano-1, detección con MIL-38. Figura 11C. Captura con MIL-38, detección con MIL-38 biotinilado.

Figura 12. Ensayos ELISA de tipo sándwich comparativos realizados mediante el uso de diferentes preparaciones de anticuerpos MIL-38 como anticuerpos de captura.

La Figura 12A muestra ensayos ELISA de tipo sándwich comparativos mediante el uso de AM3 y AM4 como anticuerpos de captura. La Figura 12B muestra los ensayos ELISA comparativos de tipo sándwich mediante el uso de una preparación mixta (34A) o una población clonal (AM4 1F5) como anticuerpos de captura.

Figura 13. Gráficos de diagrama de caja de datos sin procesar de detección de anticuerpos.

La unión del anticuerpo AM4 MIL-38 a cada uno de los péptidos sintetizados se evaluó en un ELISA basado en PEPSCAN. La parte inferior y superior de los cuadros son los percentiles 25 y 75 de los datos. La banda cerca del centro de la caja es el percentil 50 (la mediana). Los bigotes están en 1,5 del rango intercuartílico, una indicación de valores estadísticos atípicos dentro del conjunto de datos (Mcgill y otros, *The American Statistician*, 32: 12-16, 1978);

Figura 14. Representación de diagrama de letra de MIL38-AM4 detectado en el análisis de sustitución del conjunto 3 (Ejemplo 13).

Descripción detallada

La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que los niveles del proteoglicano de heparán sulfato de glicano-1 (GPC-1) están elevados en los fluidos corporales de pacientes con cáncer de próstata. Los presentes inventores descubrieron que el glicano-1 es un nuevo marcador para el cáncer de próstata. Por consiguiente, la presente invención proporciona los métodos para detectar la existencia de cáncer de próstata en los pacientes.

Las células humanas normales solo son capaces de realizar entre cuarenta y sesenta divisiones celulares antes de que los acortamientos teloméricos las hagan inviables. Sin embargo, las células de cáncer de próstata no están sujetas al límite de divisiones de Hayflick y continúan dividiéndose indefinidamente lo que causa crecimientos anormales.

La manifestación más común de cáncer es la formación de tumores en los cuerpos de los pacientes. Los tumores de cáncer de próstata pueden ser indoloros y asintomáticos. Los tumores pueden causar molestias físicas u otros síntomas localizados, tales como bloqueos de fluidos o sangrado. El cáncer de próstata puede causar síntomas sistémicos, tales como los causados por la interrupción de las funciones normales del cuerpo. Los síntomas de los cánceres de próstata pueden incluir cambios en los hábitos intestinales o en la función de la vejiga.

Uno de los factores distintivos entre los tumores benignos de próstata (no cancerosos) y los tumores malignos de próstata (cancerosos) es la capacidad de hacer metástasis. La metástasis es la capacidad de los cánceres de propagarse (hacer metástasis) a otras partes del cuerpo. El cáncer de próstata en pacientes se clasifica, además, en fases de acuerdo con la progresión de la enfermedad. El sistema de estadificación más común es el sistema TNM, que clasifica el cáncer en base al tamaño y a la extensión del tumor primario (T), la propagación del cáncer a los ganglios linfáticos cercanos (N), y la presencia de un tumor secundario formado por las metástasis (M) del tumor primario a otras partes del cuerpo (American Cancer Society). La Tabla 1 muestra ejemplos de las definiciones para cada fase de cáncer. Tabla 1. Definiciones para las fases de cáncer del sistema TNM, adaptadas de la American Cancer Society.

Fase	Definición
Fase 0	Carcinoma in situ
Fase I, Fase II, y Fase III	Los números más altos indican una enfermedad más extensa: mayor tamaño tumoral y/o diseminación del cáncer más allá del órgano en el que se desarrolló por primera vez a los ganglios linfáticos y/o tejidos u órganos adyacentes a la ubicación del tumor primario
Fase IV	El cáncer se ha diseminado a tejidos u órganos distantes

Los métodos descritos en la presente descripción pueden detectar cánceres en una o más fases.

El glicano-1 está codificado por la SEQ ID NO: 1. La proteína Glicano-1 es la secuencia de aminoácidos completa de la SEQ ID NO: 2. En algunos ejemplos, la proteína glicano-1 no incluye el péptido señal de la SEQ ID NO: 3. En algunos ejemplos, la proteína glicano-1 no incluye el propéptido de la SEQ ID NO: 4. En algunos ejemplos, la proteína glicano-1 es la SEQ ID NO: 5. En algunos ejemplos, el glicano-1 incluye variantes de glicano-1, tales como isoformas, variantes de empalme, y alotipos. La presente descripción proporciona, además, un método para determinar un pronóstico para un paciente con cáncer de próstata. El método comprende obtener una muestra de prueba de fluido o tejido corporal de un paciente, medir los niveles de glicano-1 en dicho fluido o tejido corporal, y comparar dichos niveles con un intervalo fijo de valores en donde los niveles más altos de glicano-1 se asocian con un peor pronóstico o un resultado menos favorable del paciente.

Ejemplos no limitantes de cánceres de próstata que pueden detectarse con la presente invención incluyen neoplasia intraepitelial prostática, adenocarcinoma, leiomiocarcinoma, y rhabdomiocarcinoma

Una de las herramientas más poderosas contra el cáncer es la detección temprana. Las fases más tempranas del cáncer tienden a ser más fáciles de tratar, y el pronóstico para la mayoría de los cánceres generalmente es mejor si la enfermedad aún está localizada. Existen muchas pruebas que pueden ayudar a diagnosticar el cáncer. En algunos ejemplos, la presente descripción usa glicano-1 solo para detectar el cáncer de próstata. En otros ejemplos, el GPC-1 se usa junto con otro antígeno en donde la presencia de cáncer de próstata se determina mediante la detección de ambos antígenos. En un ejemplo, el otro antígeno es el PSA.

La presente invención proporciona los métodos para detectar el cáncer de próstata. El cáncer de próstata es el cáncer visceral diagnosticado con mayor frecuencia y la segunda causa principal de muerte por cáncer en hombres en los Estados Unidos. La Sociedad Estadounidense del Cáncer estima que en 2013 se diagnosticarán alrededor de 238 590 casos nuevos de cáncer de próstata y 29 720 hombres morirán de la enfermedad. En general, uno de cada seis hombres será diagnosticado con cáncer de próstata en su vida. Los cánceres de próstata se han asociado con muchos síntomas, que incluyen dificultad para orinar, disfunción eréctil y dolor. Aunque la mayoría de los cánceres de próstata son de crecimiento

lento, hay casos de cánceres de próstata agresivos que pueden producir metástasis y, en última instancia, provocar la muerte.

5 Hay dos pruebas principales de detección de cáncer de próstata usadas actualmente por profesionales médicos: un examen rectal digital (DRE), y la medición del antígeno prostático específico (PSA) en la sangre de los pacientes. Desafortunadamente, ninguna de estas pruebas es completamente concluyente y ambas pueden dar como resultado falsos negativos (lo que deja los cánceres reales sin ser detectados) y falsos positivos (que señala cáncer donde no lo hay). Por ejemplo, las pruebas estándar de PSA realizadas con el límite recomendado de 4,0 ng/mL, son 86 % sensibles en pacientes con cáncer pero solo 33 % específicas, lo que produce falsos positivos en aproximadamente el 67 % de los
10 pacientes sin cáncer (Hoffman y otros, 2002). La presente invención describe los métodos para combinar las mediciones de glipicano-1 soluble con otro antígeno de cáncer de próstata, el PSA, en donde la presencia de cáncer de próstata se determina en base a los niveles de glipicano-1 en el fluido corporal del paciente y los resultados de la prueba de PSA,

15 El BLCA-38 (también conocido como MIL-38) es un anticuerpo IgG₁ generado en ratones contra la línea celular de cáncer de vejiga humano UCRU-BL-17CL (Walker y otros, 1989). Se demostró que el anticuerpo resultante se une a la mayoría de las líneas de cáncer de vejiga humano (Russell y otros, 2004). Se describió que el anticuerpo se une a una proteína de 30 Kd de la superficie celular y que era útil para detectar determinados tipos de carcinoma de vejiga (patente de los EE.UU. núm. 5,622,836).

20 La presente invención describe por primera vez la identidad del antígeno de MIL-38. Los presentes inventores descubrieron el antígeno a través de una serie de inmunoprecipitaciones, análisis de transferencia westerns, análisis de espectrometría de masas, y geles 2D descritos más abajo en los Ejemplos 1-8. De acuerdo con la presente invención, cualquier agente adecuado y/o cualquier técnica adecuada conocida por los expertos en la técnica puede usarse para medir los niveles de glipicano-1 soluble en una muestra dada (es decir, una muestra de fluido corporal), y usar la medición
25 para diagnosticar el cáncer de próstata en un paciente del que se deriva la muestra. En algunas modalidades, el agente es un anticuerpo anti-glipicano-1. El anticuerpo MIL-38 se usa para unirse y detectar un proteoglicano de glipicano-1 de 60kD. El anticuerpo MIL-38 puede usarse para detectar el antígeno glipicano-1 en la superficie de las células de cáncer de próstata. De acuerdo con la invención, el anticuerpo MIL-38 se usa para detectar glipicano-1 soluble en los fluidos corporales de pacientes con cáncer de próstata. El anticuerpo MIL-38 tiene especificidad de unión para un epítipo del glipicano-1 que comprende un primer segmento KVNPQGGPGE (SEQ ID NO: 6) o KVNPQGGPGP (SEQ ID NO: 7). El epítipo puede comprender, además, un segundo segmento TQNARA (SEQ ID NO: 8) o TQNARAFRD (SEQ ID NO: 9). En la presente descripción se describe que la capacidad de MIL-38 para unirse al tejido del cáncer de próstata se basa en la presencia del antígeno glipicano-1 y demuestra, además, el uso de otros anticuerpos anti-glipicano-1 para detectar células cancerosas de próstata. Por lo tanto, en algunas modalidades, el anticuerpo anti-glipicano-1 no es MIL-38.
35 Además, la presente invención demuestra la capacidad de detectar cáncer de próstata mediante la detección de niveles de glipicano-1 soluble en los fluidos corporales de los pacientes. Por lo tanto, los presentes inventores descubrieron que el glipicano-1 soluble en los fluidos corporales seleccionados de sangre, suero, plasma y orina que se obtienen de un paciente es un marcador de cáncer de próstata.

40 De acuerdo con la invención, los niveles de glipicano-1 soluble en los fluidos corporales pueden detectarse mediante el uso de cualquier técnica adecuada (por ejemplo, cualquier técnica proteómica). En algunas modalidades, los niveles de glipicano-1 soluble pueden detectarse mediante el uso de un anticuerpo anti-glipicano-1. Por ejemplo, los niveles de glipicano-1 soluble pueden detectarse mediante el uso de un anticuerpo anti-glipicano-1 que comprende: una región variable de cadena pesada que comprende una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) que comprende o
45 que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 50-54 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 69-85 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 118-126 de la SEQ ID NO: 10; y comprende una región variable de cadena ligera que comprende una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) que comprende o
50 que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 44-54 de la SEQ ID NO: 11; 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: 11; 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: 11. El anticuerpo anti-glipicano-1 que se usa para detectar los niveles de glipicano-1 soluble puede no comprender: una región variable de la cadena ligera que comprende una región determinante de complementariedad 1 (CDR1) que comprende o
55 consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 48-58 de la SEQ ID NO: 12; 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: 12; y 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: 12. El anticuerpo anti-glipicano-1 puede producirse por, o de cualquier otra manera ser idéntico a un anticuerpo generado por células del hibridoma como el depositado el 22 de agosto de 2014 en CellBank Australia (CBA) con el número de acceso CBA20140026.

65 En algunas modalidades de la invención, pueden usarse uno o más de otros anticuerpos anti-glipicano-1 para detectar glipicano-1 soluble en los fluidos corporales de los pacientes. Los anticuerpos anti-glipicano-1 pueden ser cualquiera de los anticuerpos enumerados en la (Tabla 2) de esta solicitud. El anticuerpo que se usa para detectar glipicano-1 soluble

en los fluidos corporales de los pacientes podría ser cualquier anticuerpo capaz de unirse al glipicano-1. En algunas modalidades, los anticuerpos incluyen fragmentos de anticuerpos o anticuerpos recombinantes. En algunas modalidades, los anticuerpos incluyen anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados y anticuerpos quiméricos. En algunos ejemplos, los anticuerpos son anticuerpos conjugados. Una lista no limitante de los fragmentos de anticuerpos incluye fragmento Fab de unión a antígeno, F(ab')₂, ScFv, Di-scFv sdAb, F(ab')₂ unido químicamente, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos triespecíficos Fab3, Bis-scFv, anticuerpos minicuerpos bivalentes, anticuerpos triacuerpos trivalentes, anticuerpos diacuerpos biespecíficos, anticuerpos tetracuerpos tetravalentes. Puede encontrarse una revisión de fragmentos de anticuerpos y combinaciones de dominios en (Holliger and Hudson 2005, y en el documentos US 2003/0077282).

10 Tabla 2. Anticuerpos anti-glipicano-1

Compañía	Catálogo #	Reactividad	Uso	Huésped	M/P	Especificidad de unión	Inmunógeno
R&D	BAF4519	Humano	WB, FC	Cabra	poli	aa24-530	Glipicano-1 humano recombinante derivado de NS0 línea celular de mieloma de ratón, Asp24-Ser530 (Acceso # P35052)
Bioss	bs-2426R-Biotina	Humano, ratón, rata, perro, vaca, caballo	WB, ELISA, IHC-P&F	Conejo	poli		Inmunógeno desconocido. Conjugado a Biotina
Bioss	bs-2426-HRP	Humano, ratón, rata, perro, vaca, caballo	WB, ELISA, IHC-P&F	Conejo	poli		Inmunógeno desconocido. Conjugado a HRP
antibodies-online	ABIN740102	Humano, ratón, rata, perro, vaca, caballo	WB, ELISA, IHC-P&F	Conejo	poli	C Terminal	Péptido sintético derivado del extremo C terminal de glipicano-1 humano. Conjugado a biotina.
antibodies-online	ABIN1174125	Humano	IHC, WB, ELISA	Conejo	poli		Inmunógeno desconocido. Biotina conjugada
antibodies-online	ABIN740109	Humano, ratón, rata, perro, vaca, caballo	WB, ELISA, IHC-P&F	Conejo	poli	C Terminal	Péptido sintético derivado del extremo C terminal de glipicano-1 humano. Indagar sobre la información de la secuencia. Conjugado a HRP
antibodies-online	ABIN653109	Humano	WB, IHC, FACS, ELISA	Conejo	poli	N Terminal	Péptido sintético conjugado a KLH entre 12-41aa de la región N-terminal de Glipicano-1 humano
antibodies-online	ABIN952553	humano	ELISA, IHC-p, WB, FACS	Conejo	poli	N Terminal	Péptido sintético conjugado a KLH entre 12-41aa de la región N-terminal de Glipicano-1 humano
antibodies-online	ABIN797896	humano	IHC, WB	Conejo	poli	N Terminal	péptido sintético derivado del dominio N-terminal de GPC1 humano

5	antibodies-online	ABIN347483	ratón, humano	rata, IHC, WB	Conejo	poli	N Terminal	péptido sintético derivado del dominio N-terminal de GPC1 humano
	antibodies-online	ABIN347484	humano	IHC, WB, ICC, ELISA	Conejo	poli	N Terminal	péptido sintético derivado del dominio N-terminal de GPC1 humano
10	antibodies-online	ABIN740100	Humano, ratón, perro, caballo	rata, vaca, IHC-P&F, IF	Conejo	poli	C Terminal	Péptido sintético derivado del extremo C-terminal de glipicano-1 humano. Indagar sobre la información de la secuencia.
15	antibodies-online	ABIN207433	humano	WB, ELISA	Conejo	poli	C Terminal	péptido sintético correspondiente a residuos C-terminales del precursor de GPC1 humano
20	antibodies-online	ABIN964659	humano, ratón	rata, WB, ELISA	Conejo	poli	región interna	péptido sintético correspondiente a una región interna de GPC-1 humano
25	antibodies-online	ABIN349638	humano	WB, ELISA	Conejo	poli	región interna	péptido sintético correspondiente a GPC1 humano
30	antibodies-online	ABIN1101824	humano	WB, ELISA	Conejo	poli	región interna	péptido sintético correspondiente a una región interna de GPC-1 humano
	antibodies-online	ABIN595376	humano	WB, ELISA	Conejo	poli	región interna	péptido sintético correspondiente a una región interna de GPC-1 humano
35	antibodies-online	ABIN330371	humano	WB, ELISA	cabra	poli	aa24-530	aa24-530 de rhGlipicano 1 derivado de NS0
40	antibodies-online	ABIN1479675	humano	FACS, IHC, WB, ELISA	Conejo	poli	aa12-41	péptido sintético de la región N-terminal de GPC1 humano conjugado a KLH

En algunos aspectos, puede generarse un nuevo anticuerpo anti-glipicano-1 a partir de la proteína glipicano-1 o un fragmento o derivado de esta. Solo a modo de ejemplo no limitante, el anticuerpo anti-glipicano-1 puede generarse contra un epítipo de glipicano-1 que comprende un primer segmento KVNPQGGPGE (SEQ ID NO: 6) o KVNPQGGPGP (SEQ ID NO: 7). El epítipo puede comprender, además, un segundo segmento TQNARA (SEQ ID NO: 8) o TQNARAFRD (SEQ ID NO: 9). Un experto en la técnica reconocerá que hay muchos procedimientos disponibles para la producción de anticuerpos, por ejemplo, los métodos descritos en (Harlow y otros, 1988). En algunos ejemplos, el inmunógeno de glipicano-1 que se usa para crear los anticuerpos anti-glipicano-1 incluirá las modificaciones postraduccionales de la proteína natural (por ejemplo, el plegamiento). En algunos ejemplos, el inmunógeno de glipicano-1 no incluirá el péptido señal (SEQ ID No: 3), o las secuencias del propéptido C-terminal (SEQ ID No: 4). En algunos ejemplos, los inmunógenos de glipicano-1 se obtienen de células humanas u otras células de mamíferos tales como NS0 murina transformada, DU-145 de tipo silvestre, u otra línea celular que expresa glipicano-1. En algunas modalidades, el antígeno de glipicano-1 pueden ser células que expresan glipicano-1. En algunos ejemplos, el inmunógeno de glipicano-1 puede ser células enteras o partes de células con la proteína glipicano-1 en su superficie. Un experto en la técnica apreciará, además, que los fragmentos de unión o los fragmentos Fab pueden prepararse a partir de información genética mediante diversos procedimientos bien conocidos tales como los descritos en (Borrebaeck y otros, 1995; y la patente de los EE.UU. núm. 7,960,517).

Pueden crearse anticuerpos policlonales dirigidos contra el glipicano-1 para la detección del cáncer de próstata. De nuevo, solo a modo de ejemplo no limitante, el anticuerpo policlonal dirigido a glipicano-1 puede generarse contra una serie de epítipos de glipicano-1 que incluyen un epítipo de glipicano-1 que comprende un primer segmento KVNPQGGPGE (SEQ ID NO: 6) o KVNPQGGPGP (SEQ ID NO: 7). El epítipo puede comprender, además, un segundo segmento TQNARA (SEQ ID NO: 8) o TQNARAFRD (SEQ ID NO: 9). Pueden usarse diversos procedimientos conocidos en la técnica para la producción de anticuerpos policlonales contra glipicano-1 o un fragmento de glipicano-1. La proteína glipicano-1 o fragmento de esta puede inyectarse en un animal huésped. En algunos ejemplos, los animales huéspedes pueden incluir, pero no se limitan a, conejos, ratones, ratas, etcétera. En algunos ejemplos, el suero resultante se purificó y se evaluó su capacidad para reaccionar con glipicano-1 a través de técnicas bien conocidas en la técnica, tales como transferencia

westerns, ensayos ELISA, selección por inmunofluorescencia, citometría de flujo, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) u otros.

5 En otro ejemplo, pueden crearse anticuerpos monoclonales (AcM) dirigidos contra glipicano-1 para la detección del cáncer de próstata. De nuevo, solo a modo de ejemplo no limitante, el anticuerpo monoclonal dirigido al glipicano puede generarse contra un epítipo de glipicano-1 que comprende un primer segmento KVMPQGGPGE (SEQ ID NO: 6) o KVNPGGPGP (SEQ ID NO: 7). El epítipo puede comprender, además, un segundo segmento TQNARA (SEQ ID NO: 8) o TQNARAFRD (SEQ ID NO: 9). En un ejemplo, los anticuerpos anti-glipicano-1 se crean mediante la técnica de hibridoma (Kohler y Milstein 1975), u otras técnicas (Cole y otros, 1985; o la patente de los EE.UU. núm. 6,116,013). Para más detalles y ejemplos sobre la producción de anticuerpos, ver la patente de los EE.UU. núm. 7,985,560.

15 En algunas modalidades de la presente invención, el glipicano-1 soluble se detecta en los fluidos corporales de los pacientes mediante un anticuerpo anti-glipicano-1. De acuerdo con la invención, la muestra de fluido corporal que se obtiene del paciente es una muestra de sangre, suero, plasma, u orina. Como se describe en la presente descripción, el glipicano-1 se detecta en muestras de tejido de pacientes. En algunos ejemplos, las muestras de tejido incluyen biopsias tumorales u otro tejido del paciente. En algunos aspectos, el anticuerpo detecta glipicano-1 mediante análisis de transferencia Western, ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA), clasificación de células fluorescentes o FACS, inmunofluorescencia, radiomarcaje, inmunoprecipitación, inmunohistoquímica, inmunotransferencia, quimioluminiscencia, y/u otras técnicas conocidas para detectar proteína con un anticuerpo u otro ligando tal como una proteína capaz de unirse a glipicano-1. En algunos ejemplos, el glipicano-1 se detecta mediante una prueba de biopelícula, o una prueba de anillo de afinidad como se describe en la solicitud de EE.UU. 2013/016 736. En algunos ejemplos, se detecta glipicano-1 a través de agentes de unión a glipicano-1 recubiertos con superficies transparentes (por ejemplo, portaobjetos de policarbonato). La unión de células portadoras de glipicano-1 o glipicano-1 puede detectarse mediante cambios en la densidad óptica. En algunos ejemplos, la unión del anticuerpo anti-glipicano-1 a dicha muestra de fluido o de tejido corporal se compara con la unión del anticuerpo anti-glipicano-1 a uno o más estándares de calibración de glipicano-1; en donde la unión del anticuerpo anti-glipicano-1 de los estándares de calibración se usa para cuantificar la cantidad de glipicano-1 en dicha muestra de fluido corporal. En un ejemplo, los estándares de calibración comprenden una o más muestras con concentraciones conocidas de glipicano-1.

30 En algunos ejemplos, la medición de glipicano-1 se logra mediante el contacto de dicha muestra de fluido corporal con un ligando de glipicano-1. En algunos ejemplos, el ligando puede ser un anticuerpo anti-glipicano-1 capaz de unirse al proteoglicano de glipicano-1.

35 En algunos ejemplos, el fluido corporal de un paciente puede requerir un tratamiento previo antes de la detección por el ligando anti-glipicano-1. En algunos ejemplos, dicho pretratamiento puede incluir tratamiento con agentes tales como heparinasa PNGasaF, N-glucosidasa, fosfatasa alcalina, o heparitinasa, entre otros. En otros ejemplos, dicho tratamiento previo puede incluir lisis de tejidos, purificación de membranas, fraccionamiento del plasma sanguíneo o del suero, purificación celular, o purificación de proteínas, entre otros.

40 En algunas modalidades, los niveles medidos de glipicano-1 soluble en el fluido corporal de un paciente se comparan con una muestra de control de fluido corporal de un paciente que no tiene cáncer. En otras modalidades, los niveles medidos de glipicano-1 soluble en el fluido corporal de un paciente se comparan con valores de referencia predeterminados o intervalos de valores de referencia. En otros ejemplos, los niveles de glipicano-1 en los fluidos corporales de un paciente son indicativos del tamaño o de la progresión del tumor de próstata.

45 En algunos ejemplos, la detección de glipicano-1 a partir de muestras de fluido corporal se realiza a través de ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA). Los ensayos ELISA comprenden aquellos basados en colorimetría, quimioluminiscencia, y fluorimetría. Los ensayos ELISA se han aplicado con éxito en la determinación de cantidades ínfimas de fármacos y otros componentes antigénicos en tejidos o fluidos corporales, tales como muestras de sangre, suero, y plasma, y son bien conocidos en la técnica. Un ELISA que es útil en la presente descripción puede emplear cualquier reactivo de captura adecuado y reactivos detectables, que incluyen anticuerpos y derivados de estos, ligandos proteicos y similares. En determinados ejemplos, el ELISA está basado en células. En otros ejemplos, el ELISA detecta antígenos libres de células. En algunos ejemplos, la muestra biológica sospechosa de contener glipicano-1 se pone en contacto y se incuba con los anticuerpos de captura (o recubrimiento) de manera que los anticuerpos de captura capturen o se unan al glipicano-1. La etapa de detección implica el uso del anticuerpo detectable o ligandos de proteínas detectables, que pueden unirse a dicho glipicano-1 y usarse para detectar la presencia o cantidad de glipicano-1 en función de la detección de su marcador.

60 En algunos ejemplos, la muestra biológica se pone en contacto y se incuba con el reactivo de captura (o recubrimiento) inmovilizado, que puede ser un anticuerpo glipicano-1. Este anticuerpo puede ser de cualquier especie, pero en algunos ejemplos, el anticuerpo es un anticuerpo murino o de rata. En otros ejemplos, el anticuerpo es un anticuerpo murino. En otras modalidades, el anticuerpo se deriva de un hibridoma. En algunos ejemplos, el anticuerpo de glipicano-1 es un anticuerpo recombinante o un fragmento de anticuerpo. La inmovilización se realiza convencionalmente insolubilizando el reactivo de captura bien sea antes del procedimiento del ensayo, como mediante adsorción a una matriz o superficie insoluble en agua (patente de los EE.UU. núm. 3,720,760), o mediante un acoplamiento no covalente o covalente (por ejemplo, mediante el uso de las uniones cruzadas con el glutaraldehído o carbodiimida, con o sin activación previa del

soporte con, por ejemplo, ácido nítrico y un agente reductor como se describe en la patente de los EE.UU. núm. 3,645,852 o en Rotmans y otros, 1983), o después, por ejemplo, mediante inmunoprecipitación.

5 En algunos ejemplos, la fase sólida que se usa para la inmovilización puede ser cualquier soporte o vehículo inerte que sea esencialmente insoluble en agua y útil en ensayos inmunométricos, lo que incluye los soportes en forma de, por ejemplo, superficies, partículas, matrices porosas, etcétera. Los ejemplos de soportes usados comúnmente incluyen láminas pequeñas, Sephadex, cloruro de polivinilo, perlas de plástico, y placas de ensayo o tubos de ensayo fabricados de polietileno, polipropileno, poliestireno y similares, que incluyen placas de microtitulación de 96 pocillos, así como también materiales particulados tales como papel de filtro, agarosa, dextrano reticulado, y otros polisacáridos.

10 Alternativamente, las matrices reactivas insolubles en agua tales como los carbohidratos activados con bromuro de cianógeno y los sustratos reactivos descritos en las patentes de los EE.UU. núms. 3,969,287; 3,691,016; 4,195,128; 4,247,642; 4,229,537; y 4,330,440 se emplean adecuadamente para la inmovilización de reactivos de captura. En un ejemplo, el reactivo de captura inmovilizado se recubre sobre una placa de microtitulación, y en particular la fase sólida usada es una placa de microtitulación de múltiples pocillos que puede usarse para analizar numerosas muestras a la vez,

15 por ejemplo, una placa de ELISA de 96 pocillos de microtitulación tal como las que vende Nunc Maxisorb o Immulon. En determinadas modalidades, la placa es una placa ELISA MICROTEST™ o MAXISGRP™ de 96 pocillos, tal como la que se venden como NUNC MAXISORB™ o IMMULON™.

20 En algunos ejemplos, la fase sólida se recubre con el reactivo de captura como se definió anteriormente, que puede estar unido por una interacción no covalente o covalente o enlace físico, según conveniencia. Las técnicas de fijación incluyen las descritas en las patentes de los EE.UU. núm. 4,376,110 y las referencias citadas en ella. Si es covalente, la placa u otra fase sólida se incuba con un agente de reticulación junto con el reactivo de captura en condiciones bien conocidas en la técnica, por ejemplo, tal como durante 1 hora a temperatura ambiente.

25 En otros ejemplos, los agentes de reticulación que se usan comúnmente para unir el reactivo de captura al sustrato en fase sólida incluyen, por ejemplo, ésteres de 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxi-succinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azido-salicílico, imidoésteres homobifuncionales, que incluye ésteres disuccinimidílicos tales como 3,3'-ditio-bis-(succinimidil-propionato) y maleimididas bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano. Los agentes de derivación tales como metil-3-[(p-azidofenil)-ditio]pro-pioimi-dato producen

30 intermedios que se activan con la luz, capaces de formar enlaces cruzados en presencia de luz.

En algunos ejemplos, se utilizan placas de 96 pocillos. En algunos ejemplos, las placas de 96 pocillos se recubren con el reactivo de captura (típicamente, diluido en un tampón tal como carbonato de sodio 0,05 M mediante la incubación durante al menos aproximadamente 10 horas, con mayor preferencia al menos durante la noche, a temperaturas de

35 aproximadamente 4-20 °C, o aproximadamente 4-8 °C, y a un pH de aproximadamente 8-12, o aproximadamente pH 9-10, o aproximadamente pH 9,6). Si se desean tiempos de recubrimiento más cortos, en algunos ejemplos la placa puede recubrirse durante menos tiempo, por ejemplo, a temperatura ambiente durante dos horas o menos. En algunos ejemplos, las placas pueden apilarse y recubrirse mucho antes del propio ensayo, y después el ensayo puede realizarse simultáneamente en numerosas muestras de forma manual, semiautomática, o automática, tal como mediante el uso de

40 la robótica.

En algunos ejemplos, las placas recubiertas pueden tratarse con un agente bloqueador que se une de manera no específica y satura los sitios de unión para evitar la unión no deseada del ligando libre a los sitios en exceso en los pocillos de la placa. Los ejemplos no limitantes de agentes bloqueadores apropiados para este propósito incluyen, por ejemplo,

45 gelatina, albúmina de suero bovino, albúmina de huevo, caseína, y leche descremada. En algunos ejemplos, el tratamiento de bloqueo puede tener lugar en condiciones de temperatura ambiente durante aproximadamente 1-4 horas. En otros ejemplos, el bloqueo puede tener lugar en el transcurso de 1 a 3 horas o menos. En otros ejemplos, el bloqueo puede tener lugar durante la noche a 0-4 °C.

50 En algunos ejemplos, el estándar de glipicano-1 (por ejemplo, la proteína de glipicano-1 purificada) o la muestra biológica que se va a analizar, adecuadamente diluida, se añade a la fase inmovilizada. En algunos ejemplos, la tasa de dilución es de aproximadamente 1-15 % en volumen. En algunos ejemplos, el estándar de proteína glipicano-1 incluirá las modificaciones postraduccionales de la proteína natural. En algunos ejemplos, los estándares de proteína de glipicano-1 se obtienen a partir de células humanas u otras células de mamíferos tales como NS0 transformada, DU-145 de tipo

55 silvestre, u otra línea celular que expresa glipicano-1. En otros ejemplos, la proteína glipicano-1 puede purificarse a partir de fluidos o tejidos corporales. En algunos ejemplos, el estándar de glipicano-1 será un péptido parcial de glipicano-1 u otro epítipo detectado por el anticuerpo de detección de glipicano-1, o ligando. En algunos ejemplos, el estándar puede ser una célula que expresa glipicano-1. En algunos ejemplos, la dilución es de aproximadamente 10 % en volumen. Un grupo no limitante de tampones que pueden usarse para la dilución para este propósito incluye (a) PBS que contiene BSA 0,5 %, detergente TWEEN 20™ (P20) 0,05 %, antibiótico PROCLIN™ 300 0,05 %, EDTA 5 mM, tensioactivo CHAPS 0,25

60 %, γ -globulinas bovinas 0,2 %, y NaCl 0,35M, pH 7,4; (b) PBS que contiene albúmina de suero bovino 0,5 %, polisorbato 20 0,05 %, EDTA 5 mM, CHAPS 0,25 %, γ -globulinas bovinas 0,2 % y NaCl 0,35 M; pH 7,4 (c) PBS que contiene BSA 0,5 %, polisorbato 20 (P20) 0,05 % y PROCLIN™ 300 0,05 %, pH 7; (d) PBS que contiene BSA 0,5 %, P20 0,05 %, PROCLIN™ 300 0,05 %, EDTA 5 mM, y NaCl 0,35 M, pH 6,35; (e) PBS que contiene BSA 0,5 %, P20 0,05 %, PROCLIN™ 300 0,05 %, EDTA 5 mM, γ -globulinas bovinas 0,2 %, y NaCl 0,35 M, pH 7,4; y (f) PBS que contiene BSA 0,5 %, P20 0,05

65

%, PROCLIN™ 300 0,05 %, EDTA 5 mM, CHAPS 0,25 % y NaCl 0,35 M, pH 7,4. PROCLIN™ 300 actúa como conservante, y TWEEN 20™ actúa como un detergente para eliminar la unión no específica.

5 Si bien la concentración de los reactivos de captura generalmente estará determinada por el intervalo de concentración de interés del glicoproteína-1, teniendo en cuenta cualquier dilución necesaria de la muestra biológica, la concentración final del reactivo de captura normalmente se determinará empíricamente para maximizar la sensibilidad del ensayo sobre el intervalo de interés.

10 Las condiciones para la incubación de la muestra y el reactivo de captura inmovilizado se seleccionan para maximizar la sensibilidad del ensayo y para minimizar la disociación. En algunos ejemplos, la incubación se realiza a temperaturas bastante constantes, que varían de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 40 °C. En otros ejemplos, la incubación se realiza de aproximadamente 20 a 25 °C. El tiempo de incubación depende principalmente de la temperatura, generalmente no es mayor de aproximadamente 10 horas para evitar un ensayo insensible. En algunos ejemplos, el tiempo de incubación es de aproximadamente 0,5 a 3 horas. En otros ejemplos, la incubación es de aproximadamente 1,5-3 horas o menos a temperatura ambiente para maximizar la unión del glicoproteína-1 libre a los reactivos de captura. La duración de la incubación puede ser mayor si se agrega un inhibidor de proteasa para evitar que las proteasas en el fluido biológico degraden el glicoproteína-1.

20 En algunos ejemplos, el método de detección es un ELISA competitivo. En algunos ejemplos, la etapa de incubación incluye la adición de anticuerpos no unidos y sin marcar. En algunas modalidades, la concentración conocida de anticuerpo no marcado se une al antígeno de glicoproteína-1 libre y evita que se inmovilice en la placa. En algunos ejemplos, la etapa de incubación incluye la adición de proteína de glicoproteína-1 marcada de concentraciones conocidas. En algunos ejemplos, la cantidad de glicoproteína-1 en la muestra de fluido corporal se detecta como una unión que disminuye la de la proteína mixta glicoproteína-1 marcada. En otros ejemplos, el ELISA es un ELISA de tipo sándwich.

25 En esta etapa, el pH de la mezcla de incubación normalmente estará en el intervalo de aproximadamente 4-9,5. En otras modalidades, el intervalo de pH será de aproximadamente 6-9. Aún en otros ejemplos, el intervalo de pH será de aproximadamente 7-8. En otra modalidad, el pH del diluyente de ensayo (ELISA) es pH 7,4. El pH del tampón de incubación se elige para mantener un nivel significativo de unión específica del reactivo de captura al glicoproteína-1 capturado. Pueden emplearse diversos tampones para lograr y mantener el pH conveniente durante esta etapa, que incluye borato, fosfato, carbonato, Tris-HCl o Tris-fosfato, acetato, barbital, y similares. El tampón particular empleado no es crítico para la invención, pero en ensayos individuales puede preferirse un tampón sobre otro.

35 En algunos ejemplos, la muestra biológica se separa (preferentemente mediante lavado) del reactivo de captura inmovilizado para eliminar las moléculas no capturadas. La solución usada para el lavado es generalmente un tampón ("tampón de lavado") con un pH determinado mediante el uso de las consideraciones y tampones descritos anteriormente para la etapa de incubación. En un ejemplo, el intervalo de pH del tampón de lavado es de aproximadamente 6-9. El lavado puede hacerse una o más veces. La temperatura de lavado es generalmente del refrigerador hasta temperaturas moderadas, con una temperatura constante que se mantiene durante el período de ensayo, típicamente, de aproximadamente 0-40 °C. En otros ejemplos, la temperatura de lavado es de aproximadamente 4-30 °C. Por ejemplo, el tampón de lavado puede colocarse en hielo a 4 °C en un depósito antes del lavado, y puede utilizarse un lavador de placas para esta etapa. Además, puede añadirse un agente de reticulación u otro agente adecuado en esta etapa para permitir que el glicoproteína-1 ahora unido se una covalentemente al reactivo de captura si existe alguna preocupación acerca de que el glicoproteína-1 capturado pueda disociarse en cierta medida en las etapas posteriores.

45 En algunos ejemplos, el reactivo de captura inmovilizado se pone en contacto con anticuerpos detectables. En algunas modalidades, los anticuerpos detectables son anticuerpos anti-glicoproteína-1. En algunas modalidades, el anticuerpo anti-glicoproteína-1 es MIL-38. En otros ejemplos, los anticuerpos son los descritos en la tabla 2. En otros ejemplos, los anticuerpos detectables son cualquier anticuerpo capaz de detectar glicoproteína-1. El anticuerpo detectable se pone en contacto con el glicoproteína-1 inmovilizado a una temperatura de aproximadamente 20-40 °C. En otros ejemplos, el anticuerpo detectable se pone en contacto a aproximadamente 20-25 °C, y la temperatura y el tiempo exactos para contactar los dos dependen principalmente de los medios de detección empleados. Por ejemplo, cuando se usan estreptavidina-peroxidasa y 3,3',5,5'-tetrametilbencidina como medios para la detección, por ejemplo, en un ejemplo, el contacto se realiza (por ejemplo, aproximadamente 1 hora o más) para amplificar la señal al máximo. En algunos ejemplos, un exceso molar de un anticuerpo o ligando con respecto a la concentración máxima de glicoproteína-1 libre esperado se añade a la placa después de lavarla. Este anticuerpo es directa o indirectamente detectable. El anticuerpo detectable puede ser un anticuerpo policlonal o monoclonal, por ejemplo, en determinados ejemplos, es un anticuerpo monoclonal, en un ejemplo murino, y en una modalidad MIL-38. Además, el anticuerpo detectable puede ser directamente detectable, y en un ejemplo tiene un marcador colorimétrico, y en otro ejemplo tiene un marcador fluorimétrico. En otros ejemplos, el anticuerpo detectable está biotinilado y el medio de detección es avidina o estreptavidina-peroxidasa y 3,3',5,5'-tetrametilbencidina. En algunos ejemplos, el anticuerpo detectable puede marcarse con un sistema de amplificación de biotina-avidina, un sistema de quimioluminiscencia, microesferas, u oro coloidal. La lectura de los medios de detección puede ser fluorimétrica o colorimétrica, entre otros. La afinidad del anticuerpo debe ser lo suficientemente alta como para que puedan detectarse pequeñas cantidades de glicoproteína-1 libre.

En algunos ejemplos, el glipicano-1 que está unido al reactivo de captura se mide mediante el uso de un medio de detección para el anticuerpo detectable. Si la muestra de fluido corporal es del paciente, la etapa de medición comprende comparar la reacción que ocurre como un resultado de las etapas anteriores con una curva estándar para determinar el nivel de glipicano-1 en dicha muestra de fluido o de tejido corporal. En otros ejemplos, la reacción que ocurre como resultado de las etapas anteriores se compara con una reacción similar mediante el uso de una muestra de fluido corporal de control tal como el fluido corporal de un individuo de la misma edad que no tiene cáncer.

En otros ejemplos de detección de glipicano-1, el glipicano-1 en el fluido corporal de los pacientes se detecta mediante un análisis de transferencia Western. En algunos ejemplos, este ensayo separa las proteínas en una muestra compleja mediante el uso de electroforesis. En otros ejemplos, la separación por electroforesis se realiza en un gel de exclusión por tamaño, tal como un gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (comúnmente conocido como SDS-PAGE). En un ejemplo, las proteínas separadas después se transfieren a una membrana. Un experto en la técnica reconocerá que hay una variedad de materiales que pueden usarse para las transferencias westerns. En algunas modalidades, la membrana está hecha de nitrocelulosa o fluoruro de polivinilideno, PVDF. En algunos ejemplos, la transferencia se produce en una caja de transferencia de proteínas de manera que las proteínas retienen el mismo patrón de separación en la membrana que tenían en el gel. En algunos ejemplos, la membrana se incubaba en soluciones de proteínas diluidas, por ejemplo, leche en polvo descremada o albúmina de suero bovino (BSA), para bloquear los sitios de unión no específicos. La membrana bloqueada puede incubarse con un anticuerpo primario que es específico para la proteína diana glipicano-1. En algunos ejemplos, después la membrana se lava y se incubaba, con un anticuerpo secundario que se dirige al primer anticuerpo. En algunos ejemplos, el primer o el segundo anticuerpo se conjuga con un marcador detectable de manera que pueda detectarse fácilmente. En algunos ejemplos, el marcador incluye un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente, un radiomarcador, u otra marcador bien conocido en la técnica. En algunos ejemplos, dichos marcadores conjugados con el ligando secundario se eligen de un grupo que consiste en un radiomarcador, un marcador fluorescente, un sistema de amplificación de biotina-avidina, un sistema de quimioluminiscencia, microesferas, y oro coloidal.

Opcionalmente, algunos aspectos de la descripción enseñan que una vez que un usuario ha determinado si una proteína diana está presente en la muestra, los anticuerpos primarios y secundarios (opcionales) pueden eliminarse de la membrana, y la membrana puede incubarse con un anticuerpo primario alternativo que es específico para la misma u otra proteína. En algunos ejemplos, la segunda proteína puede usarse como un control de carga. En otros ejemplos, la segunda proteína es otro marcador para la salud del paciente.

En un ejemplo, el glipicano-1 se detecta mediante citometría de flujo. En algunos ejemplos, el glipicano-1 se detecta en la superficie celular de las células en los fluidos o tejidos corporales del paciente. En determinados aspectos de la descripción, la detección de glipicano-1 para citometría de flujo puede realizarse como se describe más abajo. En algunos ejemplos, las células de los fluidos corporales se purifican. La purificación de las células puede incluir una etapa de neutralización. En algunos ejemplos, la etapa de neutralización comprende almacenar las células en tampón de neutralización. El tampón de neutralización puede hacerse mediante la combinación de 39 mL de NaH_2PO_4 0,2 M con 61 mL de Na_2HPO_4 0,2 M y la adición de agua hasta 200 mL. En algunos ejemplos, las células se centrifugan y se suspenden en diferentes soluciones. En otros ejemplos, las células se clasifican sin purificación. En algunos ejemplos, las células se suspenden o se lavan en solución CytoLyt. En otros ejemplos, las células se suspenden o se lavan en solución salina tamponada con fosfato (PBS). En algunos ejemplos, la suspensión celular se trata con cloruro de amonio para lisar los glóbulos rojos. En algunos ejemplos, las células se fijan en portaobjetos. En otros ejemplos, las células permanecen libres. En algunos ejemplos, las células se ponen en contacto con un anticuerpo principalmente anti-glipicano-1 u otro ligando. En algunas modalidades, el anticuerpo primario es MIL-38. En algunas modalidades, el anticuerpo primario no es MIL-38. En otros ejemplos, el anticuerpo primario es cualquier otro anticuerpo anti-glipicano-1 (Tabla 2). En determinados ejemplos, las células se ponen en contacto adicionalmente con un segundo anticuerpo de detección conjugado con un marcador de detección. En ejemplos alternativos, el anticuerpo primario puede detectar el antígeno directamente si el anticuerpo primario se conjuga con un marcador de detección. En casos particulares, además de marcarse con el anticuerpo glipicano-1, las células pueden marcarse de manera distintiva con otras sondas, que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos para marcadores de superficie celular que distinguen un tipo celular de otro. En algunos aspectos, las otras sondas pueden usarse para normalizar señales o recuentos celulares totales. En algunos ejemplos, las otras sondas marcan los antígenos intracelulares. En otros ejemplos, las otras sondas marcan los antígenos extracelulares. Una vez marcadas, las células marcadas pueden aislarse mediante citometría de flujo FACS. En algunos ejemplos, la máquina de FACS puede aislar las células marcadas individualmente (es decir, como células individuales). En otros ejemplos, las células marcadas pueden aislarse como una población mixta y luego diluirse en células individuales después del FACS. En algunos ejemplos, el segundo marcador puede ser un colorante. En algunos ejemplos, el marcador colorante es DAPI. En algunos ejemplos, el marcaje con DAPI se usa para cuantificar el número de células en la muestra.

En los ejemplos en los que la célula está marcada con una pluralidad de marcadores diferentes, las células pueden seleccionarse mediante el uso de una pluralidad de propiedades diferentes. Por ejemplo, las células pueden clasificarse primero por una sonda y luego por otra. En algunos ejemplos, las células pueden clasificarse primero por tipo de célula y posteriormente clasificarse por la concentración de glipicano-1. De manera similar, las células pueden clasificarse en cualquier secuencia según lo diseñado junto con las sondas y la detección de la máquina de FACS. Los principios generales de la clasificación de células activadas por fluorescencia, que incluye los métodos por los cuales pueden hacerse suspensiones de células individuales, los métodos por los cuales las células pueden marcarse mediante el uso

de, por ejemplo, sondas marcadas con fluorescencia, los métodos por los cuales las células pueden separarse entre sí, así como también el equipo de computadora que pueden emplearse en citometría de flujo, que incluye flujo de las células, los reactivos, y los sistemas de control por computadora son conocidos y se revisan en una variedad de publicaciones, que incluyen, pero no se limitan a: (Orfao y otros, 1996; Johnson y otros, 2007; Tung y otros, 2007; y Dainiak y otros, 2007).

La presente descripción incluye, además, kits para detectar glipicano-1 en los fluidos o tejidos corporales de pacientes. El kit para detectar cáncer comprende los materiales necesarios para realizar cualquiera de los ensayos de detección descritos en este. El kit para detectar cáncer comprende un primer anticuerpo anti-glipicano-1 u otro ligando, un vehículo aceptable farmacéuticamente, y estándares de glipicano-1; en donde dicho kit es capaz de detectar glipicano-1 en el fluido o tejido corporal de un paciente. El primer anticuerpo anti-glipicano-1 puede o no ser MIL-38. El primer anticuerpo anti-glipicano-1 puede comprender: 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: 10; 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: 10; 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: 10; y comprende una región variable de 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: 11; 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: 11; 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: 11. El anticuerpo anti-glipicano-1 que se usa para detectar los niveles de glipicano-1 puede no comprender: 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: 12; 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: 12; y 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: 12. El primer anticuerpo anti-glipicano-1 puede producirse por, o de cualquier otra manera ser idéntico a un anticuerpo generado por células del hibridoma como el depositado el 22 de agosto de 2014 en CellBank Australia (CBA) con el número de acceso CBA20140026.

El kit requerirá el uso adicional de herramientas o maquinaria de laboratorio estándar. Las herramientas necesarias incluyen pipetas, máquinas de clasificación de células, lectores de placas, centrifugas, etcétera, como es conocido por los expertos en la técnica. El uso del kit puede requerir reactivos de laboratorio estándar adicionales, tales como puntas de pipeta, membranas, tampones, o productos químicos, como son bien conocidos por los expertos en la técnica. El kit comprende, además, un ligando secundario. El ligando secundario es un segundo anticuerpo anti-glipicano-1. El segundo anticuerpo anti-glipicano es el mismo que el primer anticuerpo anti-glipicano-1. El ligando secundario se conjuga con un marcador para la detección rápida de dicho ligando. Los anticuerpos del kit pueden ser fragmentos de anticuerpos o combinaciones de anticuerpos como se describe en esta solicitud.

La detección de glipicano-1 en los fluidos o tejidos corporales de un paciente es indicativa de la presencia de cáncer de próstata. La presencia de 1, 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, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 pg/mL de glipicano-1 en el fluido corporal de un paciente es indicativa de cáncer de próstata.

La detección de glipicano-1 en los fluidos o tejidos corporales de un paciente es indicativa de la presencia de cáncer de próstata. La presencia de 1, 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, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 ng/mL de glipicano-1 en el fluido corporal de un paciente es indicativa de cáncer de próstata.

La detección de glipicano-1 en los fluidos o tejidos corporales de un paciente es indicativa de la presencia de cáncer de próstata. La presencia de 1, 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 mg/mL de glipicano-1 en el fluido o tejido corporal de un paciente es indicativa de cáncer de próstata.

Los niveles elevados de glipicano-1 o la señal de detección de glipicano-1 en el fluido corporal de un paciente son indicativos de cáncer de próstata. En algunos casos, los niveles de glipicano-1 de pacientes con cáncer son 1 %, 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 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 %.

63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 %, 110 %, 120 %, 130 %, 140 %, 150 %, 160 %, 170 %, 180 %, 190 %, 200 %, 210 %, 220 %, 230 %, 240 %, 250 %, 260 %, 270 %, 280 %, 290 %, 300 %, 310 %, 320 %, 330 %, 340 %, 350 %, 360 %, 370 %, 380 %, 390 %, 400 %, 410 %, 420 %, 430 %, 440 %, 450 %, 460 %, 470 %, 480 %, 490 %, 500, 600 %, 700 %, 800 %, 900 %, 1 000 %, 5 000 %, 10 000 %, >15 000 % más alto que los niveles de glipicano-1 o la señal de detección de glipicano-1 de un control del fluido corporal no canceroso. El fluido corporal control de no canceroso se ajustará a la edad del paciente.

Ejemplos

Ejemplo 1. Caracterización del antígeno de MIL-38 unido a la célula.

A pesar de los informes iniciales del antígeno de MIL-38 como una proteína de 30kD (Russell y otros, 2004), el trabajo de los presentes inventores indicó que el anticuerpo MIL-38 detecta predominantemente un antígeno de 60 kDa en una diversidad de extractos celulares. La reactividad de la transferencia Western de MIL-38 con el antígeno se pierde si la muestra se ha incubado con agentes reductores antes de la electroforesis en gel.

Mediante el uso del anticuerpo MIL-38 para experimentos de inmunoprecipitación, fuimos capaces de aislar específicamente la proteína de 60 kDa de una diversidad de extractos celulares. Se investigó la presencia del antígeno de 60 kDa en la superficie celular mediante el uso de inmunoprecipitaciones de células vivas. En estos experimentos, las células vivas se incubaron en hielo con medio sin suero que contenían el anticuerpo MIL-38. Después, las células se lavaron, se prepararon los lisados y se incubaron con perlas de proteína G para aislar cualquier anticuerpo asociado con las células. La banda de 60 kDa estaba presente en estos inmunoprecipitados, lo que indica que el MIL-38 reconoció el antígeno en la superficie celular en el medio.

Ejemplo 2. Inmunoprecipitación del antígeno de MIL-38 y espectrometría de masas.

Las células de cáncer de próstata DU-145 se procesaron a través de un kit de extracción de proteínas de membrana (MPEK). Los extractos de membrana se inmunoprecipitaron con MIL-38 unido a las perlas magnéticas mediante enlaces cruzados. Los inmunoprecipitados se introdujeron en un gel y se escindieron para análisis de espectrometría de masas o se eluyeron directamente de las perlas y después se sometieron a espectrometría de masas. Los antígenos unidos al anticuerpo MIL-38 se analizaron después mediante análisis de espectrometría de masas, que puede identificar péptidos en base a los datos de masa/carga.

El espectrómetro de masas identificó glipicano-1 con una puntuación de péptido de 4278 y una cobertura de secuencia del 46 %, que incluye 18 secuencias distintas (Figura 1).

Ejemplo 3. Inmunoprecipitación del antígeno de MIL-38, cromatografía de exclusión por tamaño y espectrometría de masas.

Las células de cáncer de próstata DU-145 se procesaron a través de un kit de extracción de proteínas de membrana (MPEK). Los extractos de membrana se inmunoprecipitaron con MIL-38 unido a las perlas magnéticas mediante enlaces cruzados. Después de un lavado exhaustivo, el inmunoprecipitado se eluyó en TBS (solución salina tamponada con tris) que contenía SDS al 2 %. El eluato se sometió a cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y cada segunda fracción se precipitó con acetona, se suspendió en tampón de carga de muestra y se usó para transferencias Western de MIL-38. Las fracciones 28 y 30 contenían altas cantidades del antígeno de MIL-38 (Figura 2), lo que indica que la fracción 29, además, contendría altas concentraciones del antígeno de MIL-38. La fracción 29 se sometió a análisis de espectrometría de masas y se identificó glipicano-1 con una cobertura de secuencia del 14 % (Figura 3). Esto confirmó, además, que el antígeno para el anticuerpo MIL-38 era glipicano-1.

Ejemplo 4. Los anticuerpos MIL-38 y anti-glipicano-1 (anti-GPC-1) muestran una reactividad superpuesta en las transferencias de Western 2D.

Se adquirió un anticuerpo de conejo anti-GPC-1 y mostró reactividad con la porción central de la proteína glipicano-1 a un peso molecular de aproximadamente 60 kDa, el mismo peso molecular detectado por MIL-38. Para confirmar que MIL-38 reconoció el glipicano-1, los extractos de las células de cáncer de próstata MPEK DU-145 se sometieron a electroforesis 2D y a transferencia Western.

Como se muestra en la Figura 4, el anticuerpo MIL-38 y los anticuerpos anti-GPC-1 mostraron una reactividad superpuesta que detectó una proteína con un peso molecular de 60 kDa y puntos isoeléctricos que varían de 5 a 7.

Ejemplo 5. MIL-38 se detecta en inmunoprecipitados de anti-GPC-1 y viceversa.

Se usaron anticuerpos MIL-38 o anti-GPC-1 de conejo para inmunoprecipitar sus respectivos antígenos a partir de extractos MPEK de DU-145 o C3 (MIL-38 negativo). Los inmunoprecipitados (IP) se sometieron a transferencia Western con anticuerpo MIL-38 o anti-GPC-1 (Figura 5).

Se detectó una banda reactiva a GPC-1 de 60 kDa en los IP de MIL-38 revelada con el anti-GPC-1, mientras que se detectó una banda reactiva a MIL-38 de 60 kDa en los IP del anti-GPC-1 revelada con MIL-38. No se detectó reactividad con los controles secundarios solamente. Además, la inmunoprecipitación con el anticuerpo MIL-38 dio como resultado un agotamiento casi completo de los antígenos de MIL-38 y de anti-GPC-1, lo que sugiere que el antígeno de MIL-38 es el glipicano-1.

Ejemplo 6. MIL-38 detecta el GPC-1 recombinante

Se evaluaron dos fuentes de glipicano-1 recombinante purificado o la reactividad con anticuerpos MIL-38 y anti-GPC-1. La primera fuente fue una forma truncada producida a partir de extractos de germen de trigo (tenga en cuenta que esto no contendría las modificaciones postraduccionales apropiadas de mamíferos). La segunda fuente fue el glipicano-1 de longitud completa producido en células NSO murinas. No se observó reactividad de MIL-38 con el glipicano-1 expresado en germen de trigo, sin embargo, pudo detectarse con el anticuerpo anti-GPC-1 generado en conejo (datos no mostrados). En contraste, se observó una reactividad muy fuerte con MIL-38 y anticuerpos anti-GPC-1 para el glipicano-1 producido en células NSO (Figura 6).

Ejemplo 7. MIL-38 puede detectar el antígeno secretado en el sobrenadante de cultivo celular.

Hasta la fecha, no ha habido evidencia experimental para la secreción del antígeno de MIL-38. Para evaluar esto, las células DU-145 se lavaron en medios sin suero y después se incubaron con medios sin suero durante 36 horas. Los medios condicionados resultantes se inmunoprecipitaron con MIL-38 y las muestras resultantes se compararon con un IP estándar de extractos MPEK de DU-145. Se observaron bandas de aproximadamente 40 y 55 kDa en el IP de medio condicionado, en comparación con la banda de 60 kDa aislada de extractos de DU-145 (Figura 7).

La muestra de IP de medio acondicionado que contenía las bandas de 40 y 55 kD se sometió a análisis de espectrometría de masas. El glipicano-1 (SEQ ID No: 2) se identificó con una cobertura peptídica del 16 % (Figura 8a). Análisis separados de solo la banda de 40 kD (Figura 8b) o la banda de 55 kD (Figura 8c), ambos identificados como péptidos de glipicano-1 (SEQ ID No: 2).

Estos resultados sugieren que puede liberarse una forma reactiva a MIL-38 de glipicano-1 en el sobrenadante de cultivo celular a partir de la línea celular de cáncer de próstata DU-145.

Ejemplo 8. GPC-1 puede detectarse por MIL-38 en muestras de plasma de cáncer de próstata y en extractos de membrana de pacientes con cáncer de próstata (ejemplo comparativo).

Hasta la fecha, no ha habido evidencia experimental de la secreción del antígeno de MIL-38 en muestras de plasma de pacientes con cáncer de próstata o normal. Para evaluar esto, las muestras de plasma de un paciente normal (042) y un paciente con cáncer de próstata (046) se inmunoprecipitaron con el anticuerpo MIL-38 y la muestra de IP se reveló con anticuerpos MIL-38 y anti-GPC-1 (Figura 9a).

Ambos anticuerpos detectaron bandas específicas de aproximadamente 70kDa en ambas muestras de plasma. Las señales fueron notablemente más altas (bandas más oscuras) para los anticuerpos MIL-38 y anti-GPC-1 en el plasma del paciente con cáncer de próstata en comparación con el plasma del paciente normal, lo que sugiere que esta forma soluble de glipicano-1 puede estar elevada en pacientes con cáncer de próstata.

Para determinar si el antígeno de MIL-38 podría detectarse en extractos de proteínas de membrana de próstata normal y cáncer de próstata, se obtuvo una muestra de cada uno de Novus Bio. Cantidades equivalentes de proteína se sometieron a transferencia Western mediante el uso del anticuerpo MIL-38 (Figura 9b). El extracto de cáncer de próstata demostró una expresión mucho mayor del antígeno de MIL-38 que la muestra de próstata normal.

Ejemplo 9. Detección del antígeno de MIL-38 en orina de pacientes.

MIL-38 puede detectar células en la orina de pacientes con cáncer de próstata. Para evaluar la sensibilidad y especificidad de este método de detección, se obtuvieron 125 muestras de orina de pacientes con la misma edad. Las células se centrifugaron a partir de la orina y se analizaron mediante el ensayo de inmunofluorescencia indirecta con MIL-38. Se analizaron un total de 47 controles sanos, 37 hipertrofia prostática benigna (BPH) y 41 cánceres de próstata confirmados por biopsia. Se muestran ejemplos de células positivas de cáncer de próstata, controles positivos de células DU-145 y negativos de células C3 (Figura 10).

La prueba de ensayo de inmunofluorescencia (IFA) con MIL-38 demostró una sensibilidad del 71 % y una especificidad del 73 % en la identificación de cánceres de próstata dentro de la cohorte. La prueba mostró 71 % de sensibilidad y 76 % de especificidad en la identificación de cánceres de próstata en comparación con los pacientes con BPH. (Tabla 3).

Tabla 3. Cálculos de sensibilidad y especificidad de detección de cáncer de próstata en orina de pacientes.

Cálculos de Sensibilidad y Especificidad	
Verdadero positivo	Falso positivo
29	12
Falso negativo	Verdadero negativo
23	61
Cálculos de sensibilidad y especificidad solo para BPH	
Verdadero positivo	Falso positivo
29	12
Falso negativo	Verdadero negativo
9	28

Ejemplo 10. La combinación de la detección del antígeno de MIL-38 con el nivel de PSA aumenta la capacidad de detectar el cáncer de próstata.

Cuando la prueba de ensayo de inmunofluorescencia (IFA) con MIL-38 se combina con la prueba de PSA, aumenta la sensibilidad y la especificidad. Estos aumentos varían según el valor de corte aplicado a la prueba de PSA. Cuando el límite para un diagnóstico positivo es superior a 2 ng/mL, la especificidad aumenta del 73 % solo para la prueba IFA hasta el 83 % para las dos pruebas combinadas. Cuando el límite para un diagnóstico positivo es superior a 4 ng/mL, la especificidad aumenta del 73 % solo para la prueba IFA hasta el 89 % para las dos pruebas combinadas.

Esto se ilustra adicionalmente mediante el análisis de regresión logística que muestra aumentos en OR y CI 95 % cuando se combinan las dos pruebas.

Tabla 4. Aumentos de sensibilidad y especificidad cuando la prueba IFA de MIL-38 se combina con puntajes de PSA

Estratificado por 2 ng/mL

PSA <2 ng/mL

		Cáncer		
		1	0	
GPC-1	1	5	17	Sensibilidad = 100 %
IFA	0	0	36	Especificidad = 68 %

Cáncer

		Cáncer		
		1	0	
GPC-1	1	24	4	Sensibilidad = 67 %
IFA	0	12	20	Especificidad = 83 %

Estratificado por 4 ng/mL

PSA ≥ 2 ng/mL

PSA < 4 ng/mL

		Cáncer		
		1	0	
GPC-1	1	10	20	Sensibilidad = 77 %
IFA	0	3	48	Especificidad = 71 %

		Cáncer		
		1	0	
GPC-1	1	19	1	Sensibilidad = 68 %
IFA	0	9	8	Especificidad = 89 %

Regresión logística

	OR	IC 95 %
GPC-1 IFA	6,4	2,8-14,9
GPC-1 IFA (ajustado para PSA <4)	10,2	3,2-32,8
GPC-1 IFA (ajustado para PS A <2)	13,4	4,0-44,7

10 Ejemplo 11. MIL-38 puede detectar glipicano-1 recombinante en una diversidad de formatos de ELISA.

15 Se realizaron tres formatos de ensayo ELISA como se muestra en la Figura 11. El glipicano-1 recombinante se evaluó a concentraciones de 0, 0,1, 1 y 10 ng/mL mediante el uso de MIL-38 como anticuerpo de captura y anti-GPC-1 generado en conejo como anticuerpo de detección. Se realizaron experimentos similares mediante el uso del anti-GPC-1 generado en conejo como anticuerpo de captura y el MIL-38 como anticuerpo de detección. Además, se evaluó un ELISA de anticuerpo único mediante el uso del anticuerpo MIL-38 como el anticuerpo de captura y un anticuerpo MIL-38 biotilado como el anticuerpo de detección. Los resultados indican que los anticuerpos anti-GPC pueden usarse en una variedad de formatos ELISA y que el GPC-1 de las NS0 podría representar un control positivo adecuado.

20 Ejemplo 12. Detección de antígeno glipicano-1 mediante el uso de anticuerpos AM4 MIL-38

25 Los experimentos realizados por los presentes inventores determinaron que un depósito original del hibridoma para el anticuerpo MIL-38 (número de acceso ATCC HB11783: hibridoma murino BLCA-38), denominado posteriormente como "hibridoma BLCA-38" es una población mixta de células del hibridoma que producen dos poblaciones de anticuerpos distintas, denominadas en la presente como "AM3" y "AM4". Las células del hibridoma responsables de producir cada una de las poblaciones de anticuerpos diferentes se separaron, y las células del hibridoma "AM4" se depositaron el 22 de agosto de 2014 en el CellBank Australia (CBA) con el número de acceso C8A20140026.

30 Las placas de noventa y seis pocillos se recubrieron con preparaciones MIL-38 AM3 o AM4 (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. El antígeno (GPC-1 NS0) se diluyó en Tampón II (HEPES 20 mM, pH 7,5, EDTA 0,5 mM, Triton X-100 al 0,5%) con la adición de NaCl 150 mM y se incubó durante la noche a 37 °C. La detección se realizó con el anticuerpo AM4 biotilado seguido de la detección con avidina HRP (1 µg/mL). Se añadió TMB (Sigma cat núm. T0440) y se detuvo con la solución de parada TMB (Sigma S5814). La absorbancia se leyó a 450 nm. Los resultados se muestran en la Figura 12A.

35 En un segundo experimento, se recubrieron placas de noventa y seis pocillos con preparaciones de MIL-38 34A (una mezcla de anticuerpos AM3 y AM4) o AM4 (2,5 µg/pocillo) en PBS pH 7,2 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 50 mM y NaCl 150 mM y se incubó a 37 °C durante 1 hora. La detección se realizó con el clon 1F5 de AM4 biotilado seguido de la detección con avidina HRP (1 µg/mL). Se añadió TMB (Sigma cat núm. T0440) y se detuvo con la solución de parada TMB (Sigma S5814). La absorbancia se leyó a 450 nm. Los resultados se muestran en la Figura 12B.

40 El primer ELISA descrito anteriormente se desarrolló mediante el uso de MIL-38 para capturar GPC-1 producido por las NS0 (es decir, el antígeno de MIL-38). Este experimento comparó el monoclonal AM3 MIL-38 y el monoclonal AM4 MIL-38 para la captura. AM3 no funcionó como un agente de captura en un ensayo ELISA de tipo sándwich, mientras que se demostró que AM4 lo hacía (Figura 12A).

45 El segundo ELISA descrito anteriormente comparó la señal de ELISA que se obtiene cuando se compara una población mixta de MIL-38 (AM3 y AM4) con la que se obtiene de un clon monoclonal AM4 1F5. El uso del AM4 1F5 como agente de captura proporcionó una señal ELISA más alta que el uso de la población mixta de anticuerpos 34A (Figura 12).

50 Los resultados del ELISA tipo sándwich demuestran que solo las formas similares a AM4 del anticuerpo monoclonal MIL-38 tienen utilidad en la detección del antígeno glipicano-1 como un 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 población mixta.

Ejemplo 13 análisis de secuencia de las poblaciones de anticuerpos AM4 y AM3 de MIL-38

60 Materiales y métodos

Secuenciación de cadenas pesadas y ligeras (ADN)

65 Se realizaron tres corridas de secuenciación separadas. La primera corrida (codificada 224945) utilizó células de hibridoma bi-clonales de una preparación mixta (AM4 y AM3) denominada 1-O. La segunda corrida (codificada 449295-

1) utilizó células de Alfio I, una estirpe del hibridoma que se usó para generar AM4. La tercera corrida (codificada 449295-5) utilizó células de Alfio II, una estirpe del hibridoma que se usó para generar AM3.

5 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. Después se realizó RT-PCR para amplificar las regiones variables (cadenas pesadas y ligeras) y las regiones constantes del anticuerpo, que luego se clonaron en un vector de clonación estándar por separado y se secuenciaron.

10 El ARN total se aisló de las células del hibridoma siguiendo el manual técnico del Sistema de purificación de ARN TRIzol® Plus. El ARN total se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa. El ARN total se transcribió inversamente en ADNc mediante el uso de cebadores antisentido específicos de isotipo o cebadores universales siguiendo el manual técnico del Sistema de SuperScript™ III First-Strand Synthesis. Los fragmentos de anticuerpos de VH, VL, CH y CL se amplificaron de acuerdo con el procedimiento operativo estándar de RACE de GenScript.

15 Los fragmentos de anticuerpos amplificados se clonaron por separado en un vector de clonación estándar mediante el uso de los procedimientos de clonación molecular estándar.

20 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.

25 Los plásmidos V_H y V_L codificaron las regiones variables de longitud completa del anticuerpo y una parte de C_H1 y C_L. El plásmido C_H codificó una parte de C_H1 y C_H2 y C_H3 de longitud completa. 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 las regiones constantes codificadas por los plásmidos C_H y C_L se amplificaron mediante PCR por separado, y después se empleó PCR de extensión solapada para obtener los ADN de longitud completa. Se enviaron cinco colonias individuales con los tamaños de inserto V_H, V_L, C_H y C_L correctos para la secuenciación.

30 La corrida de la secuencia de 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 primer lote de células, se usaron cebadores oligo-dT y cebadores CDS III para la transcripción inversa (RT). VH/CH y VK/CK se amplificaron por PCR mediante el uso de cebadores específicos IgG1 e IgK, el gen parcial de β-actina de ratón se amplificó como control positivo. Las bandas de cadena ligera normales se obtuvieron fácilmente, mientras que en el gel solo pudo observarse VH débil. Se enviaron cinco colonias individuales con tamaños de inserto VK y CK correctos para la secuenciación. Se descubrió que los genes VK y CK de cinco clones diferentes eran casi idénticos. Las secuencias consenso de cadena ligera del hibridoma Alfio II se enumeran a continuación. Se obtuvo una secuencia de cadena pesada no productiva de ocho clones VH positivos secuenciados aleatoriamente, que se muestran más abajo. Se obtuvieron tres tipos de secuencias de la región constante de la cadena pesada de diez clones CH positivos secuenciados aleatoriamente (un IgG₁CB, un IgG_{2a}C_H y ocho IgG_{2b}C_H). Para evitar la influencia del cambio de clase potencial, se realizó la amplificación de la C_H mediante el uso de un cebador específico de IgM, pero no se obtuvo un producto diana del PCR. Tampoco hubo un producto diana de PCR cuando se amplificó la cadena pesada de longitud completa (V_H-C_H) mediante el uso de cebadores degenerados FR1 de cadena pesada.

45 Como no se pudo obtener una cadena pesada productiva después de varios intentos, se intentó aislar la secuencia de la cadena pesada del segundo frasco de células Alfio II. Para el segundo frasco de células, inicialmente se usó el cebador oligo-dT para la transcripción inversa. Se amplificó V_H mediante el uso de cebadores específicos IgG1, IgG2b, IgM, IgA y cebador degenerado IgG, respectivamente, y se amplificó VK mediante el uso de cebadores específicos IgK. Se obtuvieron la cadena ligera productiva y la cadena pesada no productiva, que eran idénticas a los resultados anteriores. Además, la transcripción inversa mediante el uso de cebadores aleatorios de 6 mer se intentó sin éxito.

50 En resumen, 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 se observaron productos débiles de PCR diana de VH y la secuenciación no dio como resultado ninguna secuencia de cadena pesada consistente.

55 Resultados

Tabla de Resumen de Secuencia

60 La Tabla 5 más abajo proporciona una visión 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.

65

Tabla 5: Resumen de secuencias de anticuerpos AM4 y AM3 y regiones internas

ADN Seq ID#		Líder	HFR1	HCDR1	HFR2	HCDR2	HFR3	HCDR3	HFR4	CH1-CH3	Bisagra
13	AM4 pesado	1-57	58-147	148-162	163-204	205-255	256-351	352-378	379-411	412-1383	703-741
		Líder	LFR1	LCDR1	LFR2	LCDR2	LFR3	LCDR3	LFR4	CL	
14	AM4 Ligera	1-60	61-129	130-162	163-207	208-228	229-324	325-351	352-381	382-702	
15	AM3 Ligera	1-72	73-141	142-174	175-219	220-240	241-336	337-363	364-393	394-714	
AA Seq ID#		Líder	HFR1	HCDR1	HFR2	HCDR2	HFR3	HCDR3	HFR4	CH	Bisagra
10	AM4 Pesada	1-19	20-49	50-54	55-68	68-85	86-117	118-126	127-137	138-461	235-247
		Líder	LFR1	LCDR1	LFR2	LCDR2	LFR3	LCDR3	LFR4	CL	
11	AM4 Ligera	1-20	21-43	44-54	55-69	70-76	77-108	109-117	118-127	128-234	
12	AM3 Ligera	1-24	25-47	48-58	59-73	74-80	81-112	113-121	122-131	132-238	

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

LFR = región marco de la cadena ligera; LCDR = región determinante de complementariedad de la cadena ligera; CL = región constante de la cadena ligera

Los cuadros grises son indicativos de las posiciones dentro de la secuencia definida en la columna 1 por la SEQ ID NO.

Secuenciación (ADN)

El ARN total aislado de la muestra se procesó junto con un marcador de ADN (Marker III-TIANGEN, Cat. No.: 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 (Marcador III) en un gel de agarosa/GelRed™ al 1,5 %. Los productos de PCR se purificaron y se almacenaron a -20 °C hasta su uso posterior.

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

Secuencia consenso de ADN de Cadena Pesada de IgG₁ de Ratón AM4 MIL-38 (SEQ ID NO: 13)

15
 CAGATCCAGTTGGTCCAG
 TCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTATGSCCTTCACA
 TGGGTGAAGCAGGCTCCAGGAAAGGTTTAAGGTGGATGGGC
 UGGTTCCTTCTCTTGGAAACCTCTGGCAGCACTGCCTTTTTG
 20
 CAGATCAACAACCTCAGAAATGAAGACACGGCTACATATTTCTGTGCTAGA
 TGGGGCCCAAGGGACTCTGGTCACTCTCTCTGCA
 25
 30
 35
 40
 TGA

45 Las regiones individuales de la secuencia codificada de la cadena pesada del ratón se resaltan con texto alternativo sombreado/no sombreado. 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 = región constante (CH1-CH3); 703-741 = región de bisagra (subrayado); 1384-1386 = codón de parada.

Secuencia consenso de ADN de Cadena Ligera Kappa de Ratón AM4 MIL-38 (SEQ ID NO: 14)

55
 CAGATCCAGATCACT
 CAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGAGAACTGTCAACATCACATGT
 TGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAATCTCCTCAACTCCTGGTCTAT
 GGTGTGCCATCAAGGTCAGTGGCAGTGGATCAGGAACACAATATCTCTCAAGATCAATAGCCTGCAGCCT
 GAAGATTTTGGGACTTATTACTGT
 TTCGGTGGAGGCCACCAAGCTGGAA
 ATCAA
 60
 TAG

65 Las regiones individuales de la secuencia codificada de la cadena ligera de ratón se resaltan con texto alternativo sombreado/no sombreado. 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 AM4 MIL-38 de la cadena pesada y ligera anteriores se traducen en las siguientes secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y la cadena ligera:

Secuencia consenso de aminoácidos de Cadena Pesada IgG1 de Ratón AM4 MIL-38 (SEQ ID NO: 10)

MANVWVLLLEFLMFAAQSTQAQIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYAFTDISMKNVVKQAPGKGLRWMGWINTETG
 EPTTIDDEKGRFAFASLETSASTAFLQINNLRNEDFATYFCARHYDYGGEPYWGQGLTVTVSAAKTPFPFSVYPLAF
 GSAAQINSNVILGCLVKGYFPEEVTVIWNQSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWFSETVTCNVAHPA
 SSTKVDKRIKIPEDCGCKPCICTVPEVSSVFIIPKPKDVLITLTPKAVTCVVVBIISKDDPEVQFSWVVDQVEVET
 AQTQPREEQFNSTFRSUSSELPIMHQENLNGKEFNCRVNSAAPPAPIEKTIKTKGRPKAPQVYTIIPPKEQMAKQ
 KVELTCMIFDFPEPEDIYVENQWNGQPAENYKNTQPIINDTIGSYFVYSKLNVCQKSNKEAGNTFTCSVLHEGLHNEH
 TEKSLSHSPGK*

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 IgG1 (CH1 - CH3) y codón de parada (*). Región de bisagra: está subrayada en la secuencia anterior.

Secuencia Consenso de aminoácidos de Cadena Ligera de AM4 MI L-38 (SEQ ID NO: 11)

MSVLTQVLALLLLNLTGARCIDIQMTQSPASLSASVGETVTTTCRASGNVHNYLAWYQQKQKSPQLLVYFARTLA
 DGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLOPEDEFGTYCYCHFWSNPWFEGGGTKLEIKPADAAFTVSIFFPSSSEQLTSGGA
 SVVCFLLNFPKLDINVRKWKIDGSEKONGVLSNWTQDSKNDSTYSMSSTLTLTKLEYERHNSYTCFAHKTSTSPI
 VNSTNRNEC*

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

Secuencias consenso AM3

No pudo obtenerse una secuencia de cadena pesada consistente de las células Alfio II similar a AM3. La secuencia de la cadena ligera que se obtiene de la corrida de secuenciación 449295-5 (Alfio II) se obtuvo consistentemente y mostró claras diferencias tanto en las regiones marco como en las regiones determinantes de la complementariedad en comparación con la secuencia para las otras dos corridas de secuenciación.

Secuencia consenso de ADN de la Cadena Ligera Kappa AM3 MIL-38 (SEQ ID NO: 15)

ATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAGTTCATGTCCACATCAATAGGAGACAGGGTCAGCGTCACCTGC
 TGGTTCAGCAGAAACCAGGGCAATCTCCTAAAGCACTGATTAC
 GGAGTCACTGATCGCTTCACAGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAAC
 AATGTGCAGTCTGAAGACTTGGCAGAGTATTTCTGT
 ACAAAAGTGGAAATAAAA
 TAG

Las regiones individuales de la secuencia codificada de la cadena ligera se resaltan con texto alternativo sombreado-no sombreado. 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 AM3 MIL-38 (SEQ ID NO: 12)

MGLKNESSQTQYFVYMLLNLSGVDEGDIVMTQSQKFMSTSIGDRVSVTCKASQNVGSHVANFQQKPGQSPKALITYSA
 SYRYSGVTDTRFTGSGSGTDFTLTINNVSQEDLAEYFCQYNSSEFFTFGSGTKLEIKRADAAPTYSIFPPSSSEQLT
 SSGASVVCFLNNFYFKDINVKWRI DGSEKQNSVLSNWTQDSKSDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCLEATHKTS
 TSPVKSFNNEC*

5

10

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 (*)

15

Ejemplo 14 identificación y caracterización del epítipo de glipicano-1 que se une a los anticuerpos anti-glipicano-1 AM4

Materiales y métodos

La Tabla 6 más abajo proporciona información sobre los anticuerpos anti-glipicano-1 AM4 usados en este estudio.

20

Tabla 6: descripción de los anticuerpos AM4 usados

Nombre	Origen	Concentración	Ubicación	Estado
MIL38-AM4*	ratón	4,6 mg/mL	-20 °C/73	OK
* Producido por células del hibridoma depositado en Cellbank Australia con el número de acceso CBA20140026				

25

Péptidos

La secuencia de glipicano-1 humano (GPC-1) en la que se basó este estudio se define en la SEQ ID NO: 16. Se usaron las siguientes secuencias de residuos:

30

GPC1_residuos #343-366 GNPKVNPQGGPPEEKRRRGKLAP (SEQ ID NO: 17)
 GPC1_residuos #140-149 GELYTQNARAFRDLYSELR (SEQ ID NO: 18)

Síntesis de péptidos

35

La síntesis de péptidos se realizó mediante el uso de los métodos mencionados en el Ejemplo 1. Los péptidos lineales y CLIPS sintetizados químicamente se sintetizaron de acuerdo con los diseños que se muestran más abajo:

Péptidos Ligados Químicamente en la tecnología de Andamios (CLIPS)

40

A continuación se describen los principios generales de la tecnología CLIPS utilizada.

La tecnología CLIPS fija estructuralmente los péptidos en estructuras tridimensionales definidas. Esto resulta en miméticos funcionales incluso de los sitios de unión más complejos. La tecnología CLIPS ahora se usa de manera rutinaria para dar forma a las bibliotecas de péptidos en estructuras de bucle simple, doble o triple, así como también plegamientos en forma de hojas y hélices.

45

La reacción CLIPS tiene lugar entre los grupos bromo del andamio CLIPS y las cadenas laterales tiol de las cisteínas. La reacción es rápida y específica en condiciones suaves. Mediante el uso de esta química, las secuencias de proteínas naturales se transforman en construcciones CLIPS con una gama de estructuras que incluyen bucles T2 simples, bucles dobles T3, bucles conjugados T2+T3, hojas beta estabilizadas, y hélices alfa estabilizadas (Timmerman y otros, J. Mol. Recognit. 2007; 20: 283-29).

50

La selección de la biblioteca CLIPS comienza con la conversión de la proteína diana en una biblioteca de hasta 10 000 construcciones de péptidos superpuestos, mediante el uso de un diseño de matriz combinatoria. En un vehículo sólido, se sintetiza una matriz de péptidos lineales, que posteriormente se forman en construcciones CLIPS definidas espacialmente. Las construcciones que representan ambas partes del epítipo discontinuo en la conformación correcta se unen al anticuerpo con alta afinidad, lo que se detecta y cuantifica. Las construcciones que presentan el epítipo incompleto se unen al anticuerpo con menor afinidad, mientras que las construcciones que no contienen el epítipo no se

55

unen en absoluto. La información de afinidad se utiliza en selecciones iterativas para definir la secuencia y la conformación de los epítomos en detalle.

5 La proteína diana que contiene un epítomo conformacional discontinuo se convierte en una biblioteca matricial. Los péptidos combinatorios se sintetizan sobre una tarjeta patentada y se convierten químicamente en construcciones CLIPS definidas espacialmente. La unión de anticuerpos se cuantifica.

Síntesis de péptidos

10 Para reconstruir epítomos discontinuos de la molécula diana, se sintetizó una biblioteca de péptidos estructurados. Esto se realizó mediante el uso de la tecnología de Péptidos Ligados Químicamente en Andamios (CLIPS). La tecnología CLIPS permitió la generación de péptidos estructurados en bucles simples, bucles dobles, bucles triples, plegamientos en forma de hojas, plegamientos en forma de hélice y combinaciones de estos. Los moldes CLIPS se acoplaron a los residuos de cisteína. Las cadenas laterales de múltiples cisteínas en los péptidos se acoplaron a uno o dos moldes CLIPS. Por ejemplo, una solución 0,5 mM del molde T2 CLIPS 1,3-bis (bromometil) benceno se disolvió en bicarbonato de amonio (20 mM, pH 7,9)/acetonitrilo (1:1(v/v)). Esta solución se añadió a las matrices de péptidos. El molde CLIPS se unió a las cadenas laterales de dos cisteínas tal como están presentes en los péptidos unidos en fase sólida de las matrices de péptidos (placa de 455 pocillos con pocillos de 3 µl). Las matrices de péptidos se agitaron suavemente en la solución durante 30 a 60 minutos al mismo tiempo que estaban cubiertas completamente en solución. Por último, las matrices de péptidos se lavaron extensamente con exceso de H₂O y se sonicaron en un tampón de ruptura que contiene 1 por ciento SDS/0,1 por ciento beta-mercaptoetanol en PBS (pH 7,2) a 70 °C durante 30 minutos, seguido por sonicación en H₂O durante otros 45 minutos. Los CLIPS T3 que portan péptidos se hicieron de manera similar pero con tres cisteínas.

25 Los péptidos lineales y CLIPS se sintetizaron químicamente de acuerdo con los siguientes diseños:

Serie 1

25	Mimético	Mimético de epítomos discontinuos
	Tipo	
30	Marcador	MAT.A, MAT.B
	Tipo de mimético	Mimético de epítomos discontinuos
	Descripción	Péptidos miméticos restringidos de longitud variable. A partir de las dos secuencias de partida (SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18) se hicieron todos los péptidos de 10 a 22, y de 10 a 18 mer con la etapa 4, y estos se aparearon. En el extremo terminal y entre los dos péptidos se colocan cisteínas. Estas se unen mediante un CLIPS T3.

Serie 2

40	Mimético	Péptidos lineales
	Tipo	
	Marcador	RN.PKVNPQGGPGPEEKRR (SEQ ID NO: 19)
45	Descripción	Análisis de sustitución, a partir de la secuencia base PKVNPQGGPGPEEKRR (SEQ ID NO: 20), todos los aminoácidos individuales son reemplazados por todos los aminoácidos de origen natural, excepto la cisteína.

Serie 3

50	Mimético	Péptidos restringidos
	Tipo	
55	Marcador	RN.PKVNPQGGPGPEEKRR_BUCLE (SEQ ID NO: 19), RN.ELCTQNCRAFRDLYS_heli3 (SEQ ID NO: 21) RN.ELCTQNCRAFRDLYS_BUCLE (SEQ ID NO: 21)
60	Descripción	Los análisis de sustitución, que empiezan desde las secuencias base como se indica en los nombres de las etiquetas, todos los aminoácidos individuales son reemplazados por todos los aminoácidos de origen natural, excepto la cisteína.

Detección por ELISA

65 La unión del anticuerpo a cada uno de los péptidos sintetizados se evaluó en un ELISA basado en PEPSCAN. Las matrices de péptidos se incubaron con solución de anticuerpo primario (durante la noche a 4 °C). Después del lavado, las matrices

de péptidos se incubaron con una dilución 1/1000 de un anticuerpo conjugado a peroxidasa (SBA, cat.nr.2010-05) durante una hora a 25 °C. Después del lavado, se añadieron el sustrato de peroxidasa 2,2'-azio-di-3-etilbenzotiazolina sulfonato (ABTS) y 2 µl/mL de H2O2 al 3 por ciento. Después de una hora, se midió el desarrollo del color. El desarrollo del color se cuantificó con un dispositivo de carga acoplada (CCD) a una cámara y un sistema de procesamiento de imágenes.

5

Procesamiento de los datos

Los valores obtenidos de la cámara CCD varían de 0 a 3000 mAU, similar a un lector de ELISA de placa de 96 pocillos estándar. Los resultados se cuantificaron y se almacenaron en la base de datos de Peplab. Ocasionalmente, un pocillo contiene una burbuja de aire que resulta en un valor falso positivo, las tarjetas se inspeccionan manualmente y cualquier valor causado por una burbuja de aire se registra como 0.

10

Control de calidad de síntesis

Para verificar la calidad de los péptidos sintetizados, se sintetizó un conjunto separado de péptidos de control positivo y negativo en paralelo. Estos se seleccionaron con el anticuerpo 57,9 (ref. Posthumus y otros, J. Virology, 1990, 64:3304-3309).

15

Detalles de detección

20

La Tabla 7 resume las condiciones de unión del anticuerpo. Para el tampón Pepscan y el Precondicionamiento (SQ), los números indican la cantidad relativa de proteína competidora (una combinación de suero de caballo y ovoalbúmina).

Tabla 7: condiciones de detección

25

suero	dilución	tampón de muestra	precondicionamiento
MIL-38 AM4	10 µg/mL	10 % SQ	50 % SQ

Resultados

30

Resultados experimentales primarios y determinación de la relación señal/ruido

En la Figura 13 se muestra una descripción gráfica del conjunto de datos completo de los resultados de ELISA sin procesar generados por la detección. Aquí, un diagrama de caja representa cada conjunto de datos e indica la señal de ELISA promedio, la distribución y los valores atípicos dentro de cada conjunto de datos. En dependencia de las condiciones del experimento (cantidad de anticuerpo, fuerza de bloqueo, etcétera) se obtienen diferentes distribuciones de datos de ELISA.

35

Anticuerpo MIL 38-AM4

40

En análisis anteriores realizados por los presentes inventores, se estableció que MIL 38-AM4 se une al glicano en el tramo ³⁴⁸VNPQGGPPEEK₃₅₈ (SEQ ID NO: 22), y además se une al tramo ¹³⁵TQNARA₁₄₀ (SEQ ID NO: 8)/¹³⁵TQNARAFRD₁₄₃ (SEQ ID NO: 9), que se tomó como una indicación para un epítipo discontinuo.

Las construcciones en bucle que contienen el tramo principal identifican los residuos que son más críticos para la unión. Los resultados de este estudio demostraron que los residuos V348, Q351, G352, y P353 no toleran el reemplazo, con requisitos significativos para K347, N349 y P350, y en menor medida de G354, P355 y E356 (Figura 14).

45

Conclusiones

50

El epítipo conformacional del anticuerpo MIL38-AM4 se caracterizó.

Los péptidos obtenidos en análisis anteriores que apuntan a un epítipo discontinuo para MIL38 - AM4 se usaron para generar un conjunto de matrices en la que los bucles tienen diferentes longitudes. Además, se realizaron análisis de sustitución completa de las secuencias de péptidos individuales. Todas las matrices se sondearon con el anticuerpo MIL38-AM4.

55

Para el reconocimiento de glicano-1, el anticuerpo MIL38 - AM4 investigado en este estudio se une a un epítipo que consiste exclusiva o principalmente en el bucle flexible entre los residuos 347 y 358.

60

El anticuerpo monoclonal MIL38-AM4 se une principalmente al glicano-1 en el bucle entre los residuos 347-355, pero este anticuerpo claramente se beneficia de la adición al péptido de los residuos del intervalo 135-140 o 135-143.

Tabla 8: Epítipo del anticuerpo MIL38-AM4

Anticuerpo	Epítipo	Residuos más importantes	Conformación sensible
MIL38-AM4	₃₄₂ KVNPQGPGP ₃₄₅ (SEQ ID NO: 7)	V348, Q351, G352, P353	Y

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente descripción tienen el mismo significado como lo entiende comúnmente el experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque cualquiera de los métodos y materiales, similar o equivalente a los descritos en la presente descripción, puede usarse en la práctica o prueba de la presente invención, los métodos y materiales preferidos se describen en la presente descripción.

Las publicaciones discutidas en la presente descripción se proporcionan únicamente por su descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada en la presente descripción debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a anteceder tal publicación en virtud de una invención anterior.

Si bien la invención se ha descrito en relación con modalidades específicas de esta, se entenderá que es capaz de realizar modificaciones adicionales y esta solicitud está destinada a cubrir cualquier variación, usos, o adaptaciones de la invención siguiendo, en general, los principios de invención que incluyen tales desviaciones de la presente descripción como se encuentran dentro de la práctica conocida o habitual dentro de la técnica a la que pertenece la invención y como puede aplicarse a las características esenciales expuestas anteriormente en la presente descripción y como sigue en el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Referencias

- Aikawa T, Whipple C, Lopez M, Gunn J, Young A, Lander A, Korc M. 2008. "Glypican-1 modulates the angiogenic and metastatic potential of human and mouse cancer cells" *The Journal of Clinical Investigation* Vol 118:1
- Borrebaeck y otros, 1995 *Antibody Engineering: A Practical Approach* (Borrebaeck, C, ed.), 1995, Oxford University Press, Oxford; *J. Immunol.* 149, 3914-3920 (1992)
- Cole y otros, 1985, en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96
- Dainak M, Kumar A, Galaev IY, Mattiasson B. 2007 "Methods in Cell Separations" Vol 106:1-18
- David G, Lories V, Decock B, Marynen P, Cassiman JJ, Van den Berghe H. 1990. "Molecular Cloning of a Phosphatidylinositol-anchored Membrane Heparan Sulfate Proteoglycan from Human Lung Fibroblasts" *The Journal of Cell Biology* Vol 111:6-2 3165-3176
- Filmus J, Capurro M, Rast J. "Glypicans" *Genome Biology* 2008, 9:224
- Filmus J, Selleck SB: Glypicans: proteoglycans with a surprise. *J Clin Invest* 2001, 108:497-501.
- Fujise M, Takeo S, Kamimura K, Matsuo T, Aigaki T, Izumi S, Nakato H. Dally regulates DPP morphogen gradient formation in the *Drosophila* wing. *Development* 2003, 130:1515-1522.
- Han C, Belenkaya TY, Wang B, Lin X. "Drosophila glypicans control the cell-to-cell movement of hedgehog by a dynamin-independent process". *Development* 2004, 131:601-611.
- Harlow y otros, 1988. *Antibodies, A Laboratory Manual*, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988), Cold Spring Harbor, N.Y.
- Harmon J Eyre, Robert A Smith, and Curtis J Mettlin, "Chapter 28 Cancer Screening and Early Detection" *Holland-Frei Cancer Medicine 5ta Edición*. Bast RC Jr, Kufe DW, Pollock RE, editors Hamilton (ON): BC Decker; 2000.
- Hoffman R., Gililand F., Cameron M., Hunt W., and Key C. "Prostate-specific antigen testing accuracy in community practice" *BMC Fam Pract.* 2002, 3:19.
- Holliger P and Hudson P. 2005. "Engineered antibody fragments and the rise of single domains" *Nature Biotech* 23 1126-1136.
- Johnson KW, Dooner M, Queensberry PJ. 2007 "Fluorescence Activated Cell Sorting: A Window on the Stem Cell" Vol 8:133-9
- Kleef J, Ishiwata T, Kumbasar A, Friess H, Buchler M, Lander A. "The Cell-surface heparan sulfate proteoglycan glypican-1 regulated growth factor action in pancreatic carcinoma cells and is overexpressed in human pancreatic cancer" *J Clin Invest.* Vol 102 No 9 Nov 1998
- Kohler and Milstein 1975 Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity *Nature* 256:495-497
- Matsuda K, Maruyama H, Guo F, Kleef J, Matsumoto Y, Lander AD, Korc M. "Glypican-1 is overexpressed in human breast cancer and modulates the mitogenic effects of multiple heparin-binding growth factors in breast cancer cells." *Cancer Res* 2001 Jul 15, 61(14):5562-9.
- Orfao A, Ruiz-arguelles, Alejandro. 1996 "General concepts about cell sorting techniques" *Clin. Biochem.* Vol. 29:1 5-9
- Qiao D, Meyer K, Mundhenke C, Friedl S, Friedl D. 2003 "Heparan Sulfate Proteoglycans as Regulators of Fibroblast Growth Factor-2 Signaling in Brain Endothelial Cells: SPECIFIC: ROLE FOR GLYPICAN-1 IN GLIOMA ANGIOGENESIS" *J. Biol. Chem.* 16045-16053.

Rotmans y otros, 1983 Cross-linking of Schistosoma mansoni antigens and their covalent binding on the surface of polystyrene microtitration trays for use in the ELISA. *Immunol. Methods* 57:87-98 (1983)

Russell PJ., Ow KT., Tarn, PN., Juarez EA., Qu CF., Li Y., Cozzi PJ., and Martiniello-Wilks. "Immunohistochemical characterization of the monoclonal antibody BLCA-38 for the detection of prostate cancer" *Cancer Immunol. Immunother* (2004) 53: 995-1004

5 Spaltro, Andrea Doctoral Dissertation University of Bologna 2012

Su G, Meyer, K, Nandini C, Qiao D, Salamat S, Friedl A. "Glypican-1 is frequently overexpressed in human gliomas and enhances FGF-2 signaling in glioma cells" *Am J Pathol* 2006 June 168(6) 2014-2026.

10 Suhovskih A, MostovichL, Kunin I, Mekhroziddin B, Nepomnyashchikh G, Aidaulova S, Griorieva E. "Proteoglycan expression in normal human prostate tissue and prostate cancer" *Oncology Volume* 2013 ID 680136

Tung Jw, Heydari K, Tirouvanziam R, Sahaf B, Parks DR, Herzenberg LA. 2007 "Modern Flow Cytometry: A Practical Approach" Vol 27:453-68

Veugelers M, De Cat B, Ceulemans H, Bruystens AM, Coomans C, Durr J, Vermeesch J, Marynen P, David G. "Glypican-6, a new member of the glypican family of cell surface proteoglycans." *J Biol Chem* 1999 274:26968-26977

15 Walker KZ, Russell PJ, Kingsley EA, Philips J, Raghavan D. "Detection of malignant cells in voided urine from patients with bladder cancer, a novel monoclonal assay. *J Urol* 142:1578 1989.

Whipple C, Yong A, RLATG, Korc M. 2012. "A KrasG12D-driven Genetic Mouse Model of Pancreatic Cancer Requires Glypican-1 for Efficient Proliferation and Angiogenesis" *Ocogene* May 17 31(20) 2535-2544.

20 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Minomic International Ltd

<120> ANTÍGENO DE SUPERFICIE DE CÉLULAS DE CÁNCER DE PRÓSTATA PARA EL DIAGNÓSTICO

<130> P134908C

25 <150> US 61/928,776

<151> 2014-01-17

<160> 24

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

30 <211> 1677

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 803 217 T3

atggagctcc gggcccaggg ctggtggctg ctatgtggg cgcagcgcct ggtgcctgc 60
 gcccgcgggg acccggccag caagagccgg agctgcggcg aggtccgcca gatctacgga 120
 gccaaagggct tcagcctgag cgacgtgccc caggcggaga tctcgggtga gcacctgcgg 180
 5 atctgtcccc agggctacac ctgctgcacc agcagagatgg aggagaacct ggccaaccgc 240
 agccatgccc agctggagac cgcgctccgg gacagcagcc ggcctctgca ggccatgctt 300
 gccaccagc tgcgcagctt cgatgaccac ttccagcacc tgctgaacga ctcggagcgg 360
 10 acgctgcagg ccacctccc cggcgccttc ggagagctgt acacgcagaa cgcgagggcc 420
 ttccgggacc tgtactcaga gctgcgcctg tactaccgcg gtgccaacct gcaacctggag 480
 gagacgctgg ccgagttctg ggcccgctg ctccagcgc tcttcaagca gctgcacccc 540
 cagctgctgc tgccctgatga ctacctggac tgccctggca agcagggcca ggcgctgcgg 600
 15 cccttcgggg agggcccag agagctgcgc ctgcgggcca cccgtgcctt cgtggctgct 660
 cgtccctttg tgcagggcct gggcgtggcc agcagcgtgg tccggaaagt ggtcaggctc 720
 cccctgggcc cggagtgtct gagagctgtc atgaagctgg tctactgtgc tcaactgcctg 780
 20 ggagtccccc gggccaggcc ctgcctgac tattgccgaa atgtgtcaca gggtgcctt 840
 gccaaaccag ccgacctgga cgcagagtgg aggaacctcc tggactccat ggtgctcctc 900
 accgacaagt tctgggttac atcgggtgtg gagagtgtca tcggcagcgt gcacacgtgg 960
 ctggcgggag ccataaacgc cctccaggac aacagggaca cgtccaoggc caaggtcctc 1020
 25 cagggctgog ggaaccccaa ggtcaacccc cagggccccc ggcctgagga gaagcggcgc 1080
 cggggcaagc tggcccccgg ggagaggcca ccttcaggca cgtggagaa gctgggtctcc 1140
 gaagccaagc ccagctccg cgacgtccag gacttctgga tcagcctccc agggacactg 1200
 30 tgcagtgaga agatggccct gagcactgcc agtgatgacc gctgctggaa cgggatggcc 1260
 agagggccgt acctcccga ggtcatgggt gacggcctgg ccaaccagat caacaacccc 1320
 gaggtggagg tggacatcac caagccggac atgaccatcc ggcagcagat catgcagctg 1380
 aagatcatga ccaaccggct gcgcagcgc tacaacggca acgacgtgga cttccaggac 1440
 35 gccagtgacc acggcagcgg ctccggcagc ggtgatggct gtctggatga cctctgcagc 1500
 cggaaaggtca gcaggaagag ctccagctcc cggacgcctt tgacctatgc cctcccaggc 1560
 ctgtcagagc aggaaggaca gaagacctcg gctgccagct gccccagcc cccgaccttc 1620
 40 ctctgcctcc tctctctctt cctggccctt acagtagcca ggccccggtg ggggtaa 1677

<210> 2
 <211> 558
 <212> PRT
 45 <213> Homo sapiens
 <400> 2

50

55

60

ES 2 803 217 T3

Met Glu Leu Arg Ala Arg Gly Trp Trp Leu Leu Cys Ala Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 Leu Val Ala Cys Ala Arg Gly Asp Pro Ala Ser Lys Ser Arg Ser Cys
 5 20 25 30
 Gly Glu Val Arg Gln Ile Tyr Gly Ala Lys Gly Phe Ser Leu Ser Asp
 35 40 45
 Val Pro Gln Ala Glu Ile Ser Gly Glu His Leu Arg Ile Cys Pro Gln
 10 50 55 60
 Gly Tyr Thr Cys Cys Thr Ser Glu Met Glu Glu Asn Leu Ala Asn Arg
 65 70 75 80
 Ser His Ala Glu Leu Glu Thr Ala Leu Arg Asp Ser Ser Arg Val Leu
 15 85 90 95
 Gln Ala Met Leu Ala Thr Gln Leu Arg Ser Phe Asp Asp His Phe Gln
 20 100 105 110
 His Leu Leu Asn Asp Ser Glu Arg Thr Leu Gln Ala Thr Phe Pro Gly
 115 120 125
 Ala Phe Gly Glu Leu Tyr Thr Gln Asn Ala Arg Ala Phe Arg Asp Leu
 25 130 135 140
 Tyr Ser Glu Leu Arg Leu Tyr Tyr Arg Gly Ala Asn Leu His Leu Glu
 145 150 155 160
 Glu Thr Leu Ala Glu Phe Trp Ala Arg Leu Leu Glu Arg Leu Phe Lys
 30 165 170 175
 Gln Leu His Pro Gln Leu Leu Leu Pro Asp Asp Tyr Leu Asp Cys Leu
 180 185 190
 Gly Lys Gln Ala Glu Ala Leu Arg Pro Phe Gly Glu Ala Pro Arg Glu
 35 195 200 205
 Leu Arg Leu Arg Ala Thr Arg Ala Phe Val Ala Ala Arg Ser Phe Val
 40 210 215 220
 Gln Gly Leu Gly Val Ala Ser Asp Val Val Arg Lys Val Ala Gln Val
 225 230 235 240
 Pro Leu Gly Pro Glu Cys Ser Arg Ala Val Met Lys Leu Val Tyr Cys
 45 245 250 255
 Ala His Cys Leu Gly Val Pro Gly Ala Arg Pro Cys Pro Asp Tyr Cys
 260 265 270

ES 2 803 217 T3

Arg Asn Val Leu Lys Gly Cys Leu Ala Asn Gln Ala Asp Leu Asp Ala
 275 280 285
 5 Glu Trp Arg Asn Leu Leu Asp Ser Met Val Leu Ile Thr Asp Lys Phe
 290 295 300
 Trp Gly Thr Ser Gly Val Glu Ser Val Ile Gly Ser Val His Thr Trp
 305 310 315 320
 10 Leu Ala Glu Ala Ile Asn Ala Leu Gln Asp Asn Arg Asp Thr Leu Thr
 325 330 335
 Ala Lys Val Ile Gln Gly Cys Gly Asn Pro Lys Val Asn Pro Gln Gly
 340 345 350
 15 Pro Gly Pro Glu Glu Lys Arg Arg Arg Gly Lys Leu Ala Pro Arg Glu
 355 360 365
 Arg Pro Pro Ser Gly Thr Leu Glu Lys Leu Val Ser Glu Ala Lys Ala
 370 375 380
 20 Gln Leu Arg Asp Val Gln Asp Phe Trp Ile Ser Leu Pro Gly Thr Leu
 385 390 395 400
 Cys Ser Glu Lys Met Ala Leu Ser Thr Ala Ser Asp Asp Arg Cys Trp
 405 410 415
 25 Asn Gly Met Ala Arg Gly Arg Tyr Leu Pro Glu Val Met Gly Asp Gly
 420 425 430
 Leu Ala Asn Gln Ile Asn Asn Pro Glu Val Glu Val Asp Ile Thr Lys
 435 440 445
 Pro Asp Met Thr Ile Arg Gln Gln Ile Met Gln Leu Lys Ile Met Thr
 450 455 460
 35 Asn Arg Leu Arg Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Asp Val Asp Phe Gln Asp
 465 470 475 480
 Ala Ser Asp Asp Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Cys Leu Asp
 485 490 495
 40 Asp Leu Cys Ser Arg Lys Val Ser Arg Lys Ser Ser Ser Ser Arg Thr
 500 505 510
 Pro Leu Thr His Ala Leu Pro Gly Leu Ser Glu Gln Glu Gly Gln Lys
 515 520 525
 45 Thr Ser Ala Ala Ser Cys Pro Gln Pro Pro Thr Phe Leu Leu Pro Leu
 530 535 540
 Leu Leu Phe Leu Ala Leu Thr Val Ala Arg Pro Arg Trp Arg
 50 545 550 555

<210> 3
 <211> 23
 55 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3

ES 2 803 217 T3

Met Glu Leu Arg Ala Arg Gly Trp Trp Leu Leu Cys Ala Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 Leu Val Ala Cys Ala Arg Gly
 5 20

<210> 4
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4

Ala Ala Ser Cys Pro Gln Pro Pro Thr Phe Leu Leu Pro Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Phe Leu Ala Leu Thr Val Ala Arg Pro Arg Trp Arg
 20 25

<210> 5
 <211> 507
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5

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

ES 2 803 217 T3

145 150 155 160
 Leu Pro Asp Asp Tyr Leu Asp Cys Leu Gly Lys Gln Ala Glu Ala Leu
 5 165 170 175
 Arg Pro Phe Gly Glu Ala Pro Arg Glu Leu Arg Leu Arg Ala Thr Arg
 180 185 190
 10 Ala Phe Val Ala Ala Arg Ser Phe Val Gln Gly Leu Gly Val Ala Ser
 195 200 205
 Asp Val Val Arg Lys Val Ala Gln Val Pro Leu Gly Pro Glu Cys Ser
 210 215 220
 15 Arg Ala Val Met Lys Leu Val Tyr Cys Ala His Cys Leu Gly Val Pro
 225 230 235 240
 Gly Ala Arg Pro Cys Pro Asp Tyr Cys Arg Asn Val Leu Lys Gly Cys
 20 245 250 255
 Leu Ala Asn Gln Ala Asp Leu Asp Ala Glu Trp Arg Asn Leu Leu Asp
 260 265 270
 25
 Ser Met Val Leu Ile Thr Asp Lys Phe Trp Gly Thr Ser Gly Val Glu
 275 280 285
 30 Ser Val Ile Gly Ser Val His Thr Trp Leu Ala Glu Ala Ile Asn Ala
 290 295 300
 Leu Gln Asp Asn Arg Asp Thr Leu Thr Ala Lys Val Ile Gln Gly Cys
 35 305 310 315 320
 Gly Asn Pro Lys Val Asn Pro Gln Gly Pro Gly Pro Glu Glu Lys Arg
 325 330 335
 40 Arg Arg Gly Lys Leu Ala Pro Arg Glu Arg Pro Pro Ser Gly Thr Leu
 340 345 350
 Glu Lys Leu Val Ser Glu Ala Lys Ala Gln Leu Arg Asp Val Gln Asp
 355 360 365
 45 Phe Trp Ile Ser Leu Pro Gly Thr Leu Cys Ser Glu Lys Met Ala Leu
 370 375 380
 Ser Thr Ala Ser Asp Asp Arg Cys Trp Asn Gly Met Ala Arg Gly Arg
 385 390 395 400
 50 Tyr Leu Pro Glu Val Met Gly Asp Gly Leu Ala Asn Gln Ile Asn Asn
 405 410 415
 Pro Glu Val Glu Val Asp Ile Thr Lys Pro Asp Met Thr Ile Arg Gln
 420 425 430
 55 Gln Ile Met Gln Leu Lys Ile Met Thr Asn Arg Leu Arg Ser Ala Tyr
 435 440 445
 Asn Gly Asn Asp Val Asp Phe Gln Asp Ala Ser Asp Asp Gly Ser Gly
 450 455 460
 60 Ser Gly Ser Gly Asp Gly Cys Leu Asp Asp Leu Cys Ser Arg Lys Val
 465 470 475 480

ES 2 803 217 T3

```

    Ser Arg Lys Ser Ser Ser Ser Arg Thr Pro Leu Thr His Ala Leu Pro
              485                      490                      495
5    Gly Leu Ser Glu Gln Glu Gly Gln Lys Thr Ser
              500                      505

<210> 6
<211> 10
10  <212> PRT
    <213> Homo sapiens
    <400> 6

              Lys Val Asn Pro Gln Gly Pro Gly Pro Glu
15              1                      5                      10

<210> 7
<211> 9
20  <212> PRT
    <213> Homo sapiens
    <400> 7

              Lys Val Asn Pro Gln Gly Pro Gly Pro
25              1                      5

<210> 8
<211> 6
30  <212> PRT
    <213> Homo sapiens
    <400> 8

              Thr Gln Asn Ala Arg Ala
35              1                      5

<210> 9
<211> 9
40  <212> PRT
    <213> Homo sapiens
    <400> 9

              Thr Gln Asn Ala Arg Ala Phe Arg Asp
45              1                      5

<210> 10
<211> 461
<212> PRT
<213> Mus musculus
50  <400> 10

```

ES 2 803 217 T3

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
1 5 10 15
5 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
10 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
15 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
20 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 Thr Pro Pro Ser
130 135 140
25 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
30 Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
180 185 190
Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro
195 200 205
35 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
40 Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile
245 250 255
45 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys
260 265 270
Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln
275 280 285
50

ES 2 803 217 T3

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
 5 305 310 315 320
 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
 10 340 345 350
 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
 15 370 375 380
 Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln
 20 385 390 395 400
 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
 25 420 425 430
 Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn
 435 440 445
 His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 30 450 455 460
 <210> 11
 <211> 234
 <212> PRT
 35 <213> Mus musculus
 <400> 11
 Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 40 1 5 10 15
 Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser
 20 25 30
 45 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 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
 55 85 90 95
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp

ES 2 803 217 T3

5 100 105 110
 Ser Asn Pro Trp Thr Phe Gly 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
 10 Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160
 Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln
 165 170 175
 15 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
 20 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
 25 225 230

<210> 12
 <211> 238
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 30 <400> 12

Met Gly Ile Lys Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Phe Val Tyr Met Leu
 1 5 10 15
 35 Leu Trp Leu Ser Gly Val Asp Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln
 20 25 30
 Lys Phe Met Ser Thr Ser Ile Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys
 35 40 45
 40 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
 45 65 70 75 80
 Gly Val Thr Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 50 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
 115 120 125
 55 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

60

65

ES 2 803 217 T3

	145		150		155		160
	Asn Asn Phe Tyr	Pro Lys Asp Ile	Asn Val Lys Trp	Lys Ile Asp Gly			
5		165		170		175	
	Ser Glu Arg Gln	Asn Gly Val Leu	Asn Ser Trp Thr	Asp Gln Asp Ser			
		180		185		190	
10	Lys Asp Ser Thr	Tyr Ser Met Ser	Ser Thr Leu Thr	Leu Thr Lys Asp			
		195		200		205	
	Glu Tyr Glu Arg	His Asn Ser Tyr	Thr Cys Glu Ala	Thr His Lys Thr			
		210		215		220	
15	Ser Thr Ser Pro	Ile Val Lys Ser	Phe Asn Arg Asn	Glu Cys			
		225		230		235	

<210> 13
 <211> 1386
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 <400> 13

25	atggottggg tgtggacctt gctattctctg atggctgctg cccaaagtat ccaagcacag	60
	atccagttgg tgcagctctgg acctgagctg aagaagcctg gagagacagt caagatctcc	120
	tgcaaggcctt ctggttatgc cttcacagac tattcaatga actgggtgaa gcaggctcca	180
	ggaaaggggt taaggtggat gggctggata aacctgaga ctggtgagcc aacatataca	240
30	gatgacttca agggacgggt tgccttctct ttggaaacct ctgccagcac tgcctttttg	300
	cagatcaaca acctcagaaa tgaagacacg gctacatatt tctgtgctag acactatgat	360
	taoggggggt ttccttactg gggccaaggg actctgggtca ctgtctctgc agccaaaacg	420
	acacccccat ctgtctatcc actggccccct ggatctgctg cccaaactaa ctccatgggtg	480
35	accctgggat gcctggtaaa gggctatctt cctgagccag tgacagtgc ctggaactct	540
	ggatocctgt ccagcgggtg gcacaccttc ccagctgtcc tgcagctctga cctctacact	600
	ctgagcagct cagtgactgt cccctccagc acctggccca gcgagaccgt cacctgcaac	660
40	gttgccacc oggcccagcag caccaagggtg gacaagaaaa ttgtgcccag ggattgtggt	720
	tgtaagcctt gcatatgtac agtcccagaa gtatcatctg tcttcatott cccccaaag	780
	ccaaggatg tgctcaccaat tactctgact cctaagggtca cgtgtgttgt ggtagacatc	840
	agcaaggatg atcccgaggt ccagttcagc tggttttag atgatgtgga ggtgcacaca	900
45	gctcagacgc aacccccgga ggagcagttc aacagcactt tccgctcagt cagtgaactt	960
	cccatcatgc accaggactg gctcaatggc aaggagttca aatgcagggt caacagtgca	1020
	gctttccctg cccccatoga gaaaaccatc tccaaaacca aaggcagacc gaaggctcca	1080
50	caggtgtaca ccattccacc tcccaggag cagatggcca aggataaagt cagtctgacc	1140
	tgcatgataa cagacttctt ccctgaagac attactgtgg agtggcagtg gaatgggcag	1200
	ccagcgggaga actacaagaa cactcagccc atcatggaca cagatggctc ttacttctgc	1260
	tacagcaagc tcaatgtgca gaagagcaac tgggaggcag gaaatacttt cacctgctct	1320
55	gtgttacatg agggcctgca caaccaccat actgagaaga gcctctccca ctctctctgt	1380
	aaatga	1386

<210> 14
 <211> 705
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 <400> 14

65

ES 2 803 217 T3

atgagtgtgc tcaactcaggt cctggcggtt ctgctgctgt ggcttacagg tgcagatgt 60
 gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga aactgtcacc 120
 5 atcacatgtc gagcaagtgg gaatgttcac aattatttag catggtatca gcagaaacag 180
 ggaaaatctc ctcaactcct ggtctatact gcaaaaacct tagcagatgg tgtgccatca 240
 aggttcagtg gcagtgatc aggaacacaa tattctctca agatcaatag cctgcagcct 300
 10 gaagatthtg ggacttatta ctgtcaacat ttttggagta atccgtggac gttcgggtga 360
 ggcaccaagc tggaaatcaa acgggctgat gctgcaccaa ctgtatccat cttcccacca 420
 tccagtgagc agttaacatc tggaggtgcc tcagtcgtgt gcttcttgaa caacttctac 480
 cccaaagaca tcaatgtcaa gtggaagatt gatggcagtg aacgacaaaa tggcgtcctg 540
 15 aacagttgga ctgatcagga cagcaaaagc agcaacctca gcatgagcag caccctcaoc 600
 ttgaccaagc aogagtatga acgacataac agctatacct gtgaggccac tcacaagaca 660
 tcaacttcac ccattgtcaa gagcttcaac aggaatgagt gttag 705

<210> 15
 <211> 717
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 <400> 15

atgggcatca agatggagtc acagactcag gtctttgtat acatgttgcg gtggttgtct 60
 ggtgttgatg gagacattgt gatgaccag tctcaaaaagt tcatgtccac atcaatagga 120
 gacagggatc gcgtcacctg caaggccagt cagaatgtgg gttctcatgt agcctggttt 180
 30 cagcagaaac cagggcaatc tcctaaagca ctgatttact cggcatccta ccggtacagc 240
 ggagtcactg atcgtctcac aggcagtgga tctgggacag atttcaactc caccatcaac 300
 aatgtgcagt ctgaagaactt ggcagagtat ttctgtcagc aatataacag ttttccattc 360
 acgttcggtt cggggacaaa gttggaata aaacgggctg atgctgcaac aactgtatcc 420
 35 atcttcccac catccagtga gcagttaaca tctggaggtg cctcagtcgt gtgcttcttg 480
 aacaacttct accccaaaga catcaatgtc aagtggaaga ttgatggcag tgaacgacaa 540
 aatggcgtcc tgaacagttg gactgatcag gacagcaaag acagcaccta cagcatgagc 600
 40 agcaccctca cgttgaccaa ggacgagtat gaacgacata acagctatac ctgtgaggcc 660
 actcacaaga catcaacttc acccattgtc aagagcttca acaggaatga gtgttag 717

<210> 16
 <211> 558
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 16

50

55

60

65

ES 2 803 217 T3

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

65

ES 2 803 217 T3

5 Pro Gly Pro Glu Glu Lys Arg Arg Arg Gly Lys Leu Ala Pro Arg Glu
 355 360 365
 Arg Pro Pro Ser Gly Thr Leu Glu Lys Leu Val Ser Glu Ala Lys Ala
 370 375 380
 10 Gln Leu Arg Asp Val Gln Asp Phe Trp Ile Ser Leu Pro Gly Thr Leu
 385 390 395 400
 Cys Ser Glu Lys Met Ala Leu Ser Thr Ala Ser Asp Asp Arg Cys Trp
 405 410 415
 15 Asn Gly Met Ala Arg Gly Arg Tyr Leu Pro Glu Val Met Gly Asp Gly
 420 425 430
 Leu Ala Asn Gln Ile Asn Asn Pro Glu Val Glu Val Asp Ile Thr Lys
 435 440 445
 20 Pro Asp Met Thr Ile Arg Gln Gln Ile Met Gln Leu Lys Ile Met Thr
 450 455 460
 Asn Arg Leu Arg Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Asp Val Asp Phe Gln Asp
 465 470 475 480
 25 Ala Ser Asp Asp Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Cys Leu Asp
 485 490 495
 Asp Leu Cys Ser Arg Lys Val Ser Arg Lys Ser Ser Ser Ser Arg Thr
 500 505 510
 30 Pro Leu Thr His Ala Leu Pro Gly Leu Ser Glu Gln Glu Gly Gln Lys
 515 520 525
 Thr Ser Ala Ala Ser Cys Pro Gln Pro Pro Thr Phe Leu Leu Pro Leu
 530 535 540
 35 Leu Leu Phe Leu Ala Leu Thr Val Ala Arg Pro Arg Trp Arg
 545 550 555

40 <210> 17
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 17

45 Gly Asn Pro Lys Val Asn Pro Gln Gly Pro Gly Pro Glu Glu Lys Arg
 1 5 10 15
 Arg Arg Gly Lys Leu Ala Pro
 20

50 <210> 18
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 18

55 Gly Glu Leu Tyr Thr Gln Asn Ala Arg Ala Phe Arg Asp Leu Tyr Ser
 1 5 10 15
 Glu Leu Arg

60 <210> 19
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia etiquetada de Glipicano-1 de homo sapiens

ES 2 803 217 T3

<400> 19

Arg Asn Pro Lys Val Asn Pro Gln Gly Pro Gly Pro Glu Glu Lys Arg

1 5 10 15

5

Arg

<210> 20

<211> 15

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 20

Pro Lys Val Asn Pro Gln Gly Pro Gly Pro Glu Glu Lys Arg Arg

1 5 10 15

15

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Secuencia etiquetada de Glipicano-1 de homo sapiens

<400> 21

Arg Asn Glu Leu Cys Thr Gln Asn Cys Arg Ala Phe Arg Asp Leu Tyr

1 5 10 15

25

Ser

<210> 22

<211> 11

30 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Val Asn Pro Gln Gly Pro Gly Pro Glu Glu Lys

1 5 10

35

<210> 23

<211> 558

<212> PRT

40 <213> Homo sapiens

<400> 23

Met Glu Leu Arg Ala Arg Gly Trp Trp Leu Leu Cys Ala Ala Ala Ala

1 5 10 15

45

Leu Val Ala Cys Ala Arg Gly Asp Pro Ala Ser Lys Ser Arg Ser Cys

20 25 30

Gly Glu Val Arg Gln Ile Tyr Gly Ala Lys Gly Phe Ser Leu Ser Asp

35 40 45

50

Val Pro Gln Ala Glu Ile Ser Gly Glu His Leu Arg Ile Cys Pro Gln

50 55 60

55

Gly Tyr Thr Cys Cys Thr Ser Glu Met Glu Glu Asn Leu Ala Asn Arg

65 70 75 80

Ser His Ala Glu Leu Glu Thr Ala Leu Arg Asp Ser Ser Arg Val Leu

85 90 95

60

Gln Ala Met Leu Ala Thr Gln Leu Arg Ser Phe Asp Asp His Phe Gln

100 105 110

His Leu Leu Asn Asp Ser Glu Arg Thr Leu Gln Ala Thr Phe Pro Gly

115 120 125

65

ES 2 803 217 T3

Ala Phe Gly Glu Leu Tyr Thr Gln Asn Ala Arg Ala Phe Arg Asp Leu
 130 135 140
 Tyr Ser Glu Leu Arg Leu Tyr Tyr Arg Gly Ala Asn Leu His Leu Glu
 145 150 155 160
 Glu Thr Leu Ala Glu Phe Trp Ala Arg Leu Leu Glu Arg Leu Phe Lys
 165 170 175
 Gln Leu His Pro Gln Leu Leu Leu Pro Asp Asp Tyr Leu Asp Cys Leu
 180 185 190
 Gly Lys Gln Ala Glu Ala Leu Arg Pro Phe Gly Glu Ala Pro Arg Glu
 195 200 205
 Leu Arg Leu Arg Ala Thr Arg Ala Phe Val Ala Ala Arg Ser Phe Val
 210 215 220
 Gln Gly Leu Gly Val Ala Ser Asp Val Val Arg Lys Val Ala Gln Val
 225 230 235 240
 Pro Leu Gly Pro Glu Cys Ser Arg Ala Val Met Lys Leu Val Tyr Cys
 245 250 255
 Ala His Cys Leu Gly Val Pro Gly Ala Arg Pro Cys Pro Asp Tyr Cys
 260 265 270
 Arg Asn Val Leu Lys Gly Cys Leu Ala Asn Gln Ala Asp Leu Asp Ala
 275 280 285
 Glu Trp Arg Asn Leu Leu Asp Ser Met Val Leu Ile Thr Asp Lys Phe
 290 295 300
 Trp Gly Thr Ser Gly Val Glu Ser Val Ile Gly Ser Val His Thr Trp
 305 310 315 320
 Leu Ala Glu Ala Ile Asn Ala Leu Gln Asp Asn Arg Asp Thr Leu Thr
 325 330 335
 Ala Lys Val Ile Gln Gly Cys Gly Asn Pro Lys Val Asn Pro Gln Gly
 340 345 350
 Pro Gly Pro Glu Glu Lys Arg Arg Arg Gly Lys Leu Ala Pro Arg Glu
 355 360 365
 Arg Pro Pro Ser Gly Thr Leu Glu Lys Leu Val Ser Glu Ala Lys Ala
 370 375 380
 Gln Leu Arg Asp Val Gln Asp Phe Trp Ile Ser Leu Pro Gly Thr Leu
 385 390 395 400
 Cys Ser Glu Lys Met Ala Leu Ser Thr Ala Ser Asp Asp Arg Cys Trp
 405 410 415
 Asn Gly Met Ala Arg Gly Arg Tyr Leu Pro Glu Val Met Gly Asp Gly
 420 425 430
 Leu Ala Asn Gln Ile Asn Asn Pro Glu Val Glu Val Asp Ile Thr Lys
 435 440 445
 Pro Asp Met Thr Ile Arg Gln Gln Ile Met Gln Leu Lys Ile Met Thr
 450 455 460
 Asn Arg Leu Arg Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Asp Val Asp Phe Gln Asp
 465 470 475 480

ES 2 803 217 T3

Ala Ser Asp Asp Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Asp Gly Cys Leu Asp
 485 490 495
 Asp Leu Cys Ser Arg Lys Val Ser Arg Lys Ser Ser Ser Ser Arg Thr
 5 500 505 510
 Pro Leu Thr His Ala Leu Pro Gly Leu Ser Glu Gln Glu Gly Gln Lys
 515 520 525
 Thr Ser Ala Ala Ser Cys Pro Gln Pro Pro Thr Phe Leu Leu Pro Leu
 10 530 535 540
 Leu Leu Phe Leu Ala Leu Thr Val Ala Arg Pro Arg Trp Arg
 15 545 550 555

<210> 24
 <211> 17
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 24

Cys Pro Lys Val Asn Pro Gln Gly Pro Gly Pro Glu Glu Lys Arg Arg
 1 5 10 15
 25 Cys

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para detectar cáncer de próstata en un paciente, el método comprende medir el nivel de glipicano-1 soluble en una muestra de fluido corporal seleccionada del grupo que consiste en sangre, suero, plasma, y orina, que se obtiene de un paciente y determinar que dicho paciente tiene cáncer de próstata o una mayor probabilidad de desarrollar cáncer de próstata en base al nivel de glipicano-1 soluble en la muestra de fluido corporal, en donde los niveles medidos de glipicano-1 soluble en la muestra de fluido corporal del paciente se comparan con: una muestra de control de fluido corporal que se obtiene de un paciente que no tiene cáncer; o valores de referencia predeterminados o intervalos de valores de referencia.
2. El método *in vitro* para detectar cáncer de próstata en un paciente de conformidad con la reivindicación 1, que comprende las etapas de:
 - (a) poner en contacto dicha muestra de fluido corporal que se obtiene del paciente con un anticuerpo anti-glipicano-1; y
 - (b) determinar que dicho paciente tiene cáncer de próstata o una mayor probabilidad de desarrollar cáncer de próstata en base a la unión de dicho anticuerpo anti-glipicano-1 a dicha muestra de fluido corporal; en donde la unión del anticuerpo anti-glipicano-1 a dicha muestra de fluido corporal se compara con la unión del anticuerpo anti-glipicano-1 de una muestra de control; en donde la unión incrementada del anticuerpo anti-glipicano-1 de la muestra de fluido corporal con respecto a la muestra de control se asocia con la presencia de cáncer de próstata.
3. El método *in vitro* de conformidad con la reivindicación 2, en donde dicho anticuerpo anti-glipicano-1 es MIL-38.
4. El método *in vitro* de conformidad con la reivindicación 2, en donde dicha muestra de fluido corporal se pone en contacto con una población de anticuerpos, en donde: los anticuerpos de la población comprenden:
 - (a) una región variable de 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: 10;
 - 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: 10;
 - 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: 10; 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: 11;
 - 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: 11;
 - 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: 11; y
 los anticuerpos de la población no 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: 12;
 - 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: 12;

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: 12.

5. El método *in vitro* de conformidad con la reivindicación 4, en donde la población de anticuerpos es producida por, o de cualquier otra manera idéntica a una población de anticuerpos generada por células del hibridoma depositado el 22 de agosto de 2014 en CellBank Australia (CBA) con el número de acceso CBA20140026.
6. El método *in vitro* de conformidad con la reivindicación 2, en donde dicho anticuerpo anti-glipicano-1 no es MIL-38.
7. El método *in vitro* de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde dicho anticuerpo anti-glipicano-1 es un fragmento de anticuerpo o anticuerpo recombinante capaz de unirse al glipicano-1.
8. El método *in vitro* de conformidad con la reivindicación 1, en donde dicho nivel de glipicano-1 soluble en la muestra de fluido corporal que se obtiene de un paciente se compara con el nivel de glipicano-1 soluble en una muestra de control; en donde la unión incrementada del anticuerpo anti-glipicano-1 de la muestra de fluido corporal con respecto a la muestra de control, preferentemente, un aumento del 50 % o más en el nivel de glipicano-1 soluble de dicha muestra de fluido corporal con respecto al nivel de glipicano-1 soluble en la muestra de control, se asocia con la presencia de cáncer de próstata.
9. El método *in vitro* de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en donde un aumento del 50 % o más en la unión del anticuerpo anti-glipicano-1 a dicha muestra de fluido corporal por encima del nivel de unión del anticuerpo anti-glipicano-1 de la muestra de control, es indicativo de cáncer de próstata.
10. El método *in vitro* de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7 o 9, en donde la unión del anticuerpo anti-glipicano-1 a dicha muestra de fluido corporal se compara con la unión del anticuerpo anti-glipicano-1 a uno o más estándares de glipicano-1; en donde la unión del anticuerpo anti-glipicano-1 de los estándares se usa para cuantificar la cantidad de glipicano-1 soluble en dicha muestra de fluido corporal.
11. El método *in vitro* de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde un contenido de glipicano-1 soluble superior a 10 ng/mL en la muestra de fluido corporal es indicativo de cáncer de próstata.
12. El método *in vitro* de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende, además: medir el nivel de antígeno prostático específico (PSA) en una muestra de fluido corporal que se obtiene del paciente, y determinar que dicho paciente tiene cáncer de próstata o una mayor probabilidad de desarrollar cáncer de próstata en base a (i) el nivel de PSA medido en la muestra de fluido corporal, y (ii) la unión de dicho anticuerpo anti-glipicano-1 a dicha muestra de fluido corporal.
13. El método *in vitro* de conformidad con la reivindicación 12, en donde el nivel de antígeno prostático específico (PSA) en la muestra de fluido corporal medido se compara con el nivel de PSA medido en una muestra de control; en donde el aumento de los niveles de PSA en la muestra de fluido corporal con respecto a la muestra de control se asocia con la presencia de cáncer de próstata.
14. El uso de un kit que comprende:
un primer anticuerpo anti-glipicano-1, y

estándares de glipicano-1;

en el método *in vitro* de conformidad con la reivindicación 1, en donde el primer anticuerpo anti-glipicano-1 se usa para detectar glipicano-1 soluble en la muestra de fluido corporal.

- 5 15. El uso de conformidad con la reivindicación 14, en donde el anticuerpo anti-glipicano-1 es:
- (i) no es MIL-38; o
 - (ii) MIL-38; o
 - (iii) el anticuerpo mencionado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4, 5 o 7.

GPC1 HUMANO Masa: 61641 Puntuación: 4276 Coincidencias: 166(134) Secuencias: 21(18) ~~###~~PAI: \$.50
 Gilpicano - 1 OS = Homo sepiene ~~###~~GPC1 ~~###~~ #1 #1 #2

Cobertura de secuencia: 46 %

Los péptidos coincidentes están subrayados

1	<u>MELRARGWNL</u>	<u>LCALAAALVAC</u>	<u>ARGDFASKSR</u>	<u>SCGEVROIYG</u>	<u>AKGFSLSQVY</u>
51	<u>QAEISGEHLR</u>	<u>ICEQGYTCCI</u>	<u>SEMEENIANKR</u>	<u>SHALETALR</u>	<u>DSSRVLOAML</u>
101	<u>ATQLRSFDDH</u>	<u>FQHLNDSEK</u>	<u>TLQATFFGAF</u>	<u>GELYTONARA</u>	<u>FRDLYSELRL</u>
151	<u>YIRGANLHLE</u>	<u>ETLAEFWARL</u>	<u>LERLEKQLHP</u>	<u>QLLLEDDYLD</u>	<u>CLGKQAEALR</u>
201	<u>PEGEAPRELR</u>	<u>LRATRAFVAE</u>	<u>RSFYQGLGVA</u>	<u>SDVVRKVAGY</u>	<u>PLGFECSRAV</u>
251	<u>MKLVYCAHCL</u>	<u>GVPGARPCPD</u>	<u>YCRNVLRGCL</u>	<u>ANQADLDAEW</u>	<u>RNLDSMWLI</u>
301	<u>TDKFWGTSGV</u>	<u>ESVIGSVHTW</u>	<u>LAEAINALQD</u>	<u>NRDTLTAKVI</u>	<u>QCCGNPKVNP</u>
351	<u>QGFQPEEKRR</u>	<u>RGKLAFRERP</u>	<u>PSGTLEKLYS</u>	<u>EAKAQLRIVQ</u>	<u>DFWISLPSIL</u>
401	<u>CSEKMAALSTA</u>	<u>SDDRCWNGMA</u>	<u>RGHYLPEVME</u>	<u>DGLANQINNP</u>	<u>EVEVDITKPD</u>
451	<u>MTIRQQIMQL</u>	<u>KIMTNRLRSA</u>	<u>YNGNDVDFQD</u>	<u>ASDDGSGSGS</u>	<u>GDBGCLDDLCS</u>
501	<u>RKVSRRKSSSS</u>	<u>RPELTHALPG</u>	<u>LSEQEGQKTS</u>	<u>AASCPQPFTE</u>	<u>LLPLLLLLAL</u>
551	<u>TVARPRWR</u>				

(SEQ ID NO: 23)

Figura 1

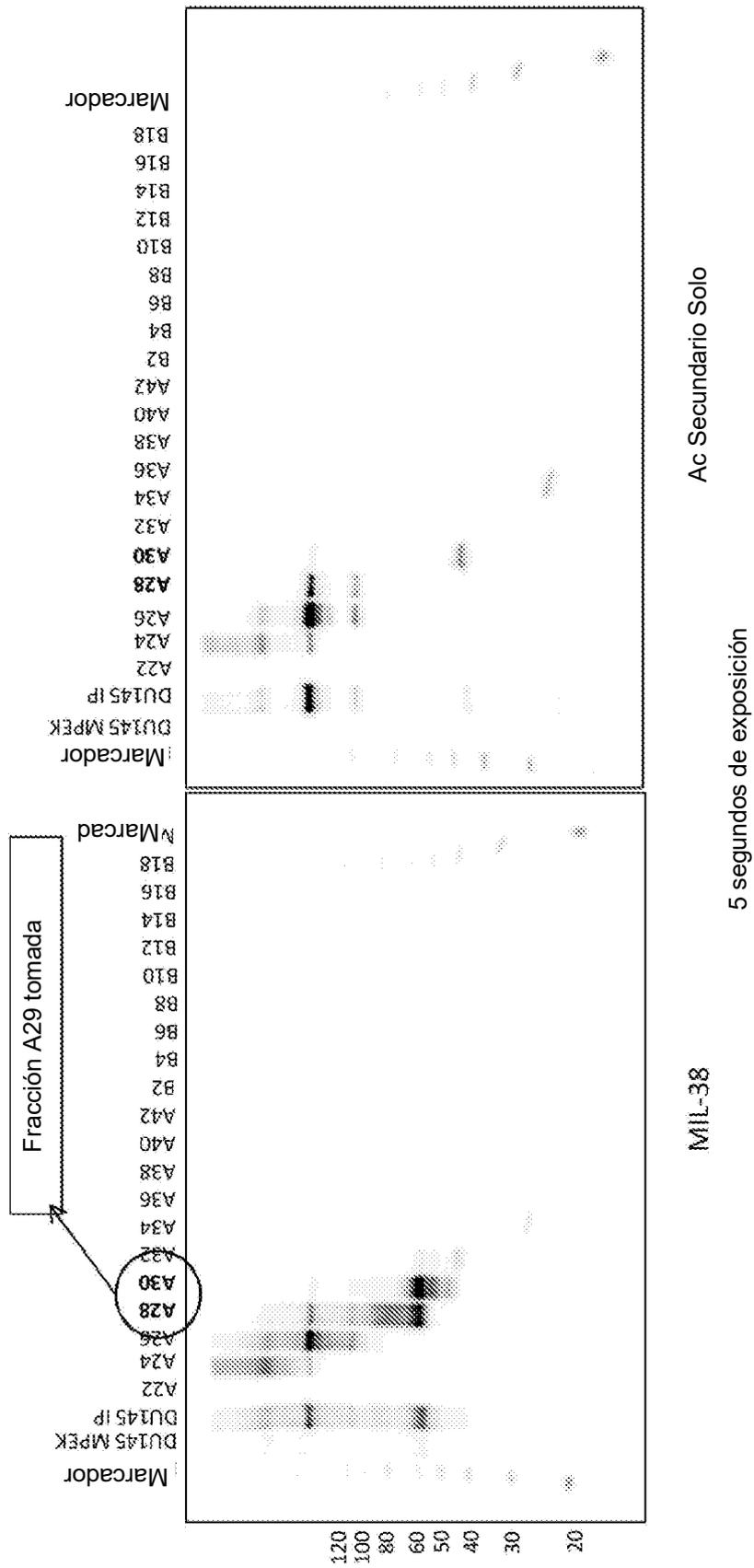


Figura 2

Espectrometría de Masas de Exclusión por Tamaño por HPLC Fracción # 29

GPC1 HUMANO Masa: 61641 Puntuación: 290 Coincidencias: 8(8) Secuencias: ~~0,52~~
 Glipicano - 1 OS = Homo sepiene ~~0,52~~

Cobertura de secuencia: 14 %

Los péptidos coincidentes están subrayados

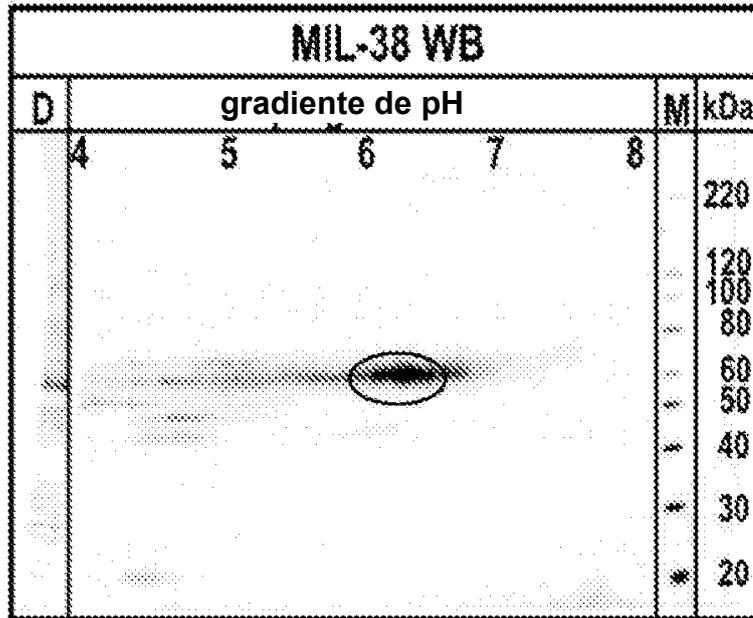
```

1  MELRARGML LCAAAALVAC ARGDFASKSR SCEVTRQIYG ARGFSLEDVF
51  QAEISGEHLR ICFQETCT SEMENLAMR SHAELETALR DSSRVLQAML
101 ATQLRSFDH FQHLLNDSER TLQATFFGAF GELTYQNARA FRDLYSELRL
151 YRGANIHLE ETLAEFMARL LELFFQLHP QLLLFDDILD CIGNQAEAIR
201 PFGEAPRELR IRATRAFVAA RSFVQGISVA SDVVRKVADV FLSFECSRAV
251 MKLVYCAHCL GVFSARPCPD YCRNVLRGSL ANQADLDAEN RNLLDSMVLI
301 TDKEWGTSSV ESVIGSVHTW LARAINALQD NRDLTAKVI QGCCHEKYNF
351 QGEFEERR RGNLAFRERF PSGTIERLVS EAKAQLRIVQ DENISLEFTL
401 CSEKMALSTA SDDECHNGMA RGRYLPEVMG DELANQINP EVEVDIKED
451 MTIRQIMQ KIMTRLRSA YNGNDVDFQD ASDDGSGSGS GDGCLDDLCS
501 RKVSRKSSS RTPLZHALPG LSEQESQKTS AASCPQEFTF LLFLLLFLAL
551 TYAREREMR (SEQ ID NO: 23)

```

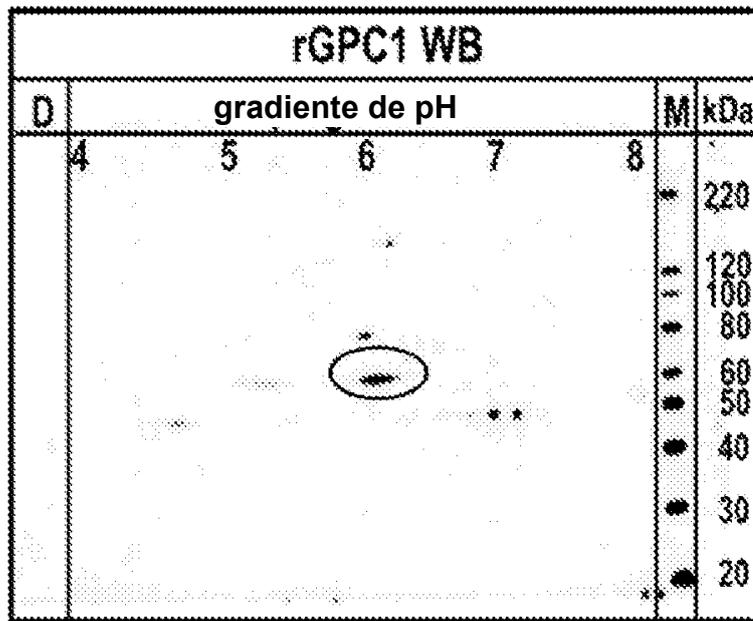
Figura 3

A



30 segundos de exposición

B



1 min de exposición

Figura 4

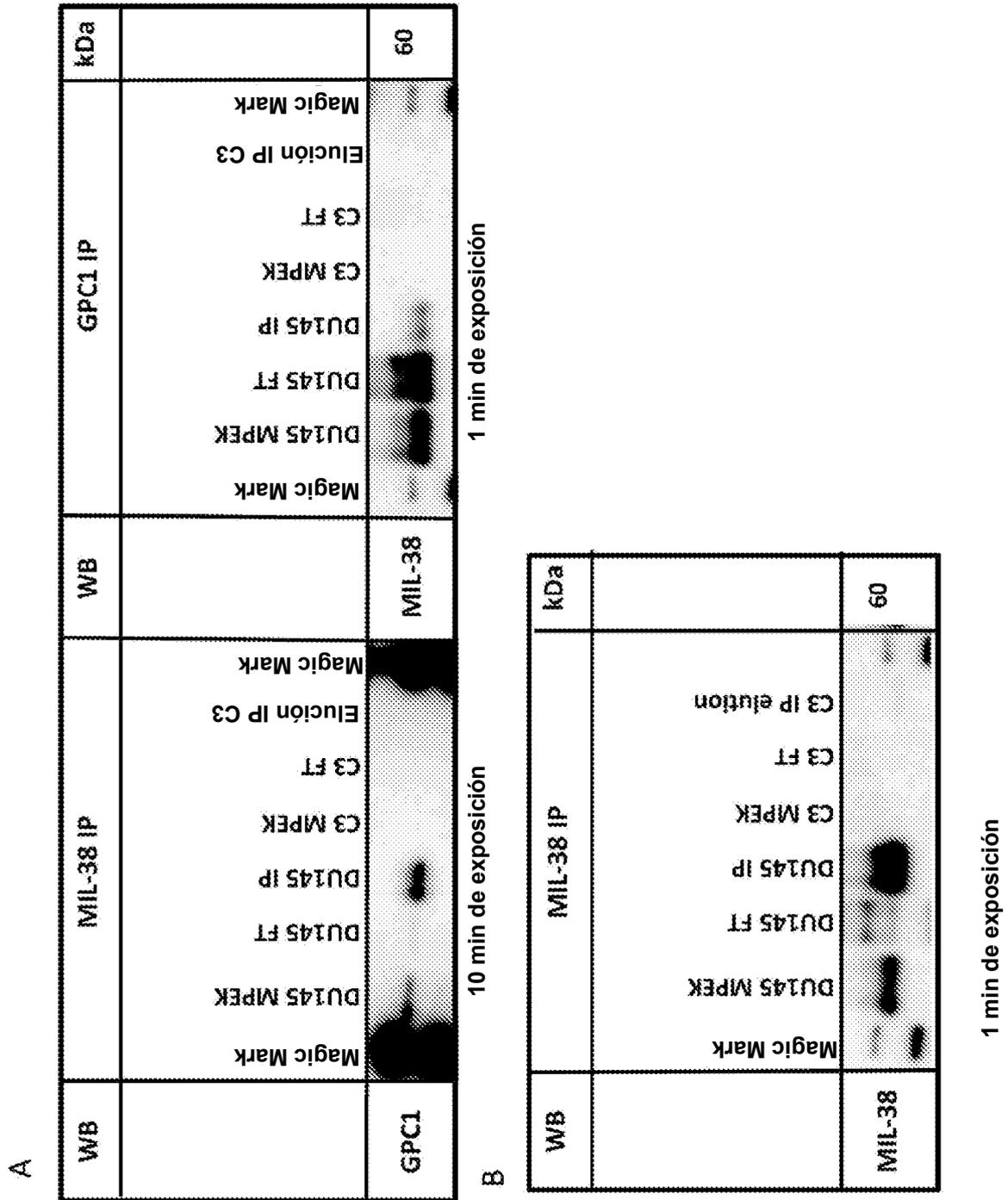


Figura 5

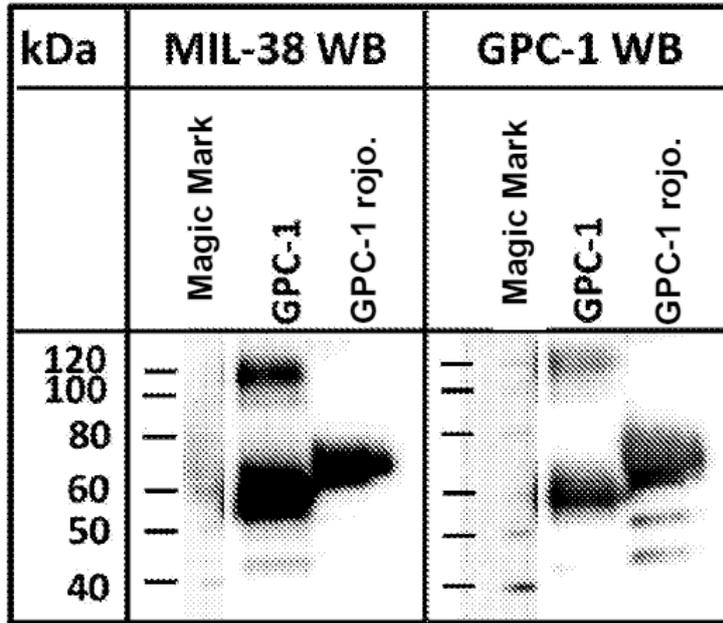
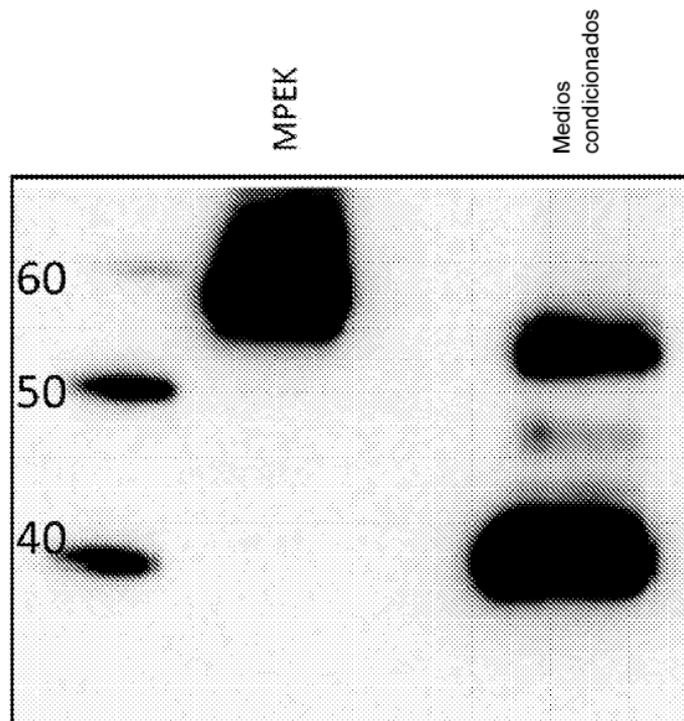


Figura 6



5 min de exposición

Figura 7

A
 GPC1 HUMANO sa: 61641 Puntuación: 852 Coincidencias: 30(22) Secuencias 1.1 (\$) #PAA: 0.6\$

Glipicano - 1 05 = Homo sepiene C1 #2#1 \$V#2

Cobertura de secuencia: 16 %

Los péptidos coincidentes están subrayados

1 MELRARGWNL ICAAAALIVAC ARGDFASKSR SCGEVROIQG AKCFSLSDVP
 51 CAEISGEHLR ICPQGYTOCT SEMENLANR SHALEETALR DSSRYLQAML
 101 ATQLRSFDDH FCHLNDSEK TIGATFPQAF GELXTOMARA FEDIYSELEL
 151 YIRGANLHLE ETLAEFWARL LERLFRQLHF QULLPDDYLD CIGKQAEALR
 201 FEGEAFRELR LRATRAEVAA RSEVQGLGYA SDVVRKVAQV FIFPECSRAY
 251 MRLVYCAHCL GVPGARPCPD YCHNVLKGCL ANQADLDAEW RNLLDSWLLI
 301 TDKFWGTSQV ESVGISVHTW LAFAINALQD NRELTAKVI QCCGNEFYWR
 351 QCEGFEKRR RCKLAPRRP PSETLEKLYS EAKAQIRDVQ DFWISLFGTL
 401 CSEKMAALSTA SDDRCWNGMA RGRILPEVNG DGLAMQINP EVEVDITKPD
 451 MTRQOINQL KIMTRIRLSA YNGNDVDFOD ASDDGGSGGS GDGCLLDLCS
 501 RRVSRKSSSS RPIYTHALPS LSEQEGQKTS AASCPOPTF LIFLLLFLAL
 551 TVAREWR (SEQ ID NO: 23)

Figura 8

B GPC1 HUMANO Masa: 61641 Puntuación: 1531 Coincidencias: 48(43) Secuencias: 11(10) ~~EMPAI: 1.42~~
 Glipicano - 1 05 = Homo sepiene ~~GPC1 EMP1 SVWQ~~

Cobertura de secuencia: 18 %

Los péptidos coincidentes están subrayados

```

1  MELRARGMWL LCAAAALVAL ARGDPASKSR SCCEVRFQIYG AKGFSLSDVF
51  QAEISGEHLR ICEPQYICCT SEMEENLARR SHALEFETALR DSSRVLIQAML
101 ATQLRSFDDH FQHLLNDSER TLQATFFSAF GELYIQMIRA FFDLYSELR
151 YIRGANLHLE ETLAEFWARL LEALFKQLHF QLLFFDDYLD CLGKQAEALR
201 PFGEAPRELR LRATRAFVAA RSVYQGLGYA SDVVRKVAQV FLGFECSRAV
251 MKLVYCARCL GVPGARPCFD YCRNVLKGCL ANQADLDAEW RNLDSMWLI
301 TDKFWGTSYV ESVGISVHTW LAEAINALQD NRDLIAEVI QGCGNPKVNF
351 QGFGPEEKRR RGLAFRRERF PSGTLEKLYS EAKAQLRWQ DFWISLPGTL
401 CSEKMAIATA SDDNCWNGMA RGRYLPEVMS DGLANQINP EVEVDITKED
451 MTIROOIMOL KIMTNRLRSA YNGMVDVFOD ASDDGSSGSGS GDGCIDDLICS
501 RRVSRKSSSS RTPLIHALPS LSEQESQKTS AASCPQPTF LEPILLFLAL
551 TVARFRWR (SEQ ID NO: 23)
    
```

Figura 8

C

GPC1 HUMANO Masa: 61641 Puntuación: 1364 Coincidencias: 39(55) Secuencias: 13 {3} #seq#1: 1,18
 Glipicano - 1 05 = Homo sepiene #seq#1 #seq#2

Cobertura de secuencia: 24 %

Los péptidos coincidentes están subrayados

1 MELRARGHWL LCARAALVAC ARGDPASR SCGEVRCIYG AKGFSLSDVF
 51 QAEISGEHLR ICPQSYTCT SEMEENLANR SHAZLETALR DSEVYLQAML
 101 ATQLRSFDDH FCHLLNDSER TLOATFFCAE GELYTONARA FRDLYSELRL
 151 YIRGANLHLE ETLAEFWARL DERLFKQDNP QLLLFDDYLD CLGKQAEAIR
 201 FFGEARRELR LEATRAFVAA RSEVQSIGVA SDVVRKVAQV PLGFECRAV
 251 MLVYCAHCL GVFGARPCFD YCRNVLNGL ANQADIDAEW RNLLDSMWLI
 301 TDKFWGTSV ESVIGSVHTW LAEAINALQD NRDELTAKVI QCCMFRVNF
 351 QGEGEEKRR RGKLAFRERF PSGTLEKLYS EAKAQLRDVQ DEWISLPGTL
 401 CSEKMALSTA SDDRCWNGWA RGHYLFVMS DGLANQINMF EYEVDITKED
 451 WTIRQQIMQL KIMTNRLRSA YNGNDVDFQD ASDDGSQSGS GDGCIDDLCS
 501 RKVSRKSSSS RTELTHALFG LSEQEGQKTS AASCPOPTF LIFLILFLAL
 551 TVAREHWR (SEQ ID NO: 23)

Figura 8

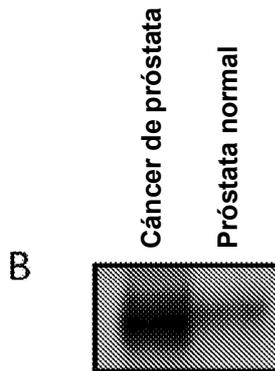
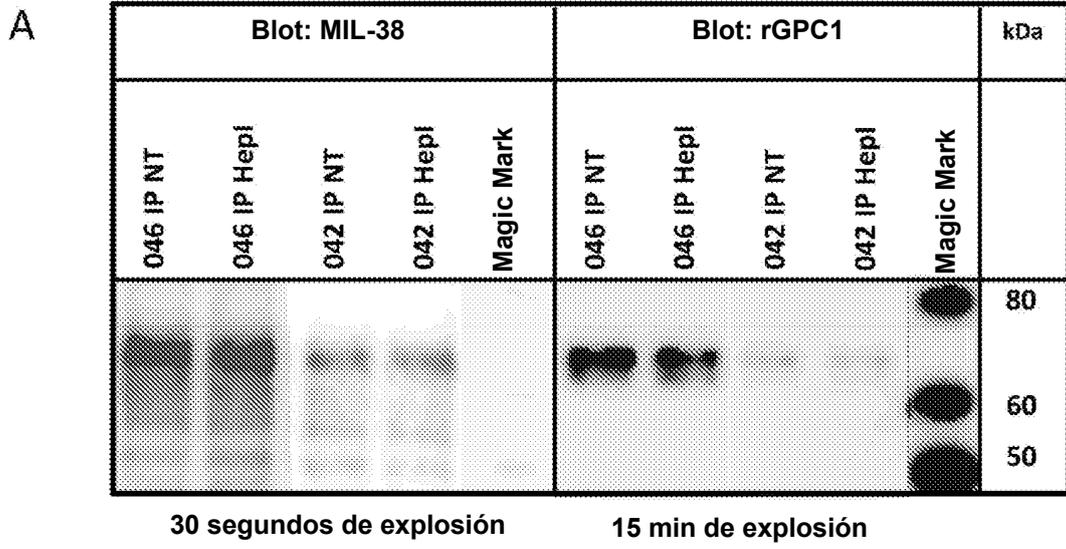
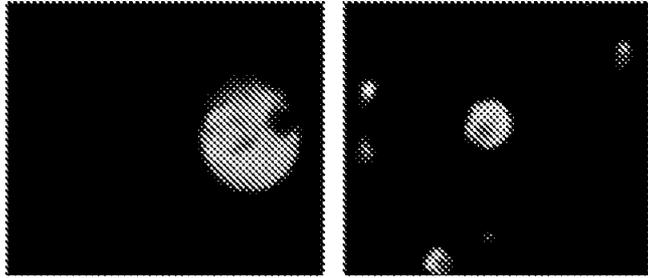
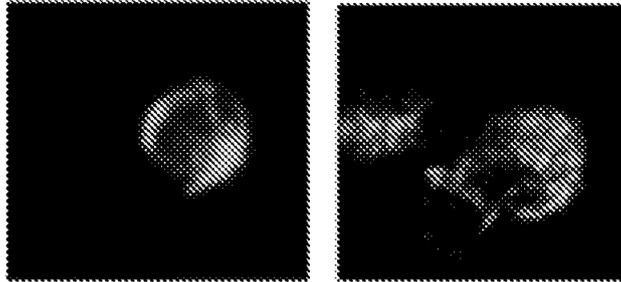


Figura 9

Muestras de CaP



Células de control DU145 + ve



Células de control C3 -ve

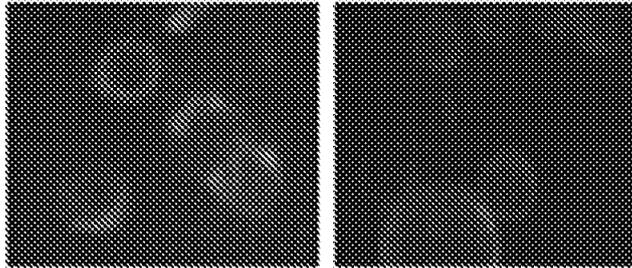


Figura 10

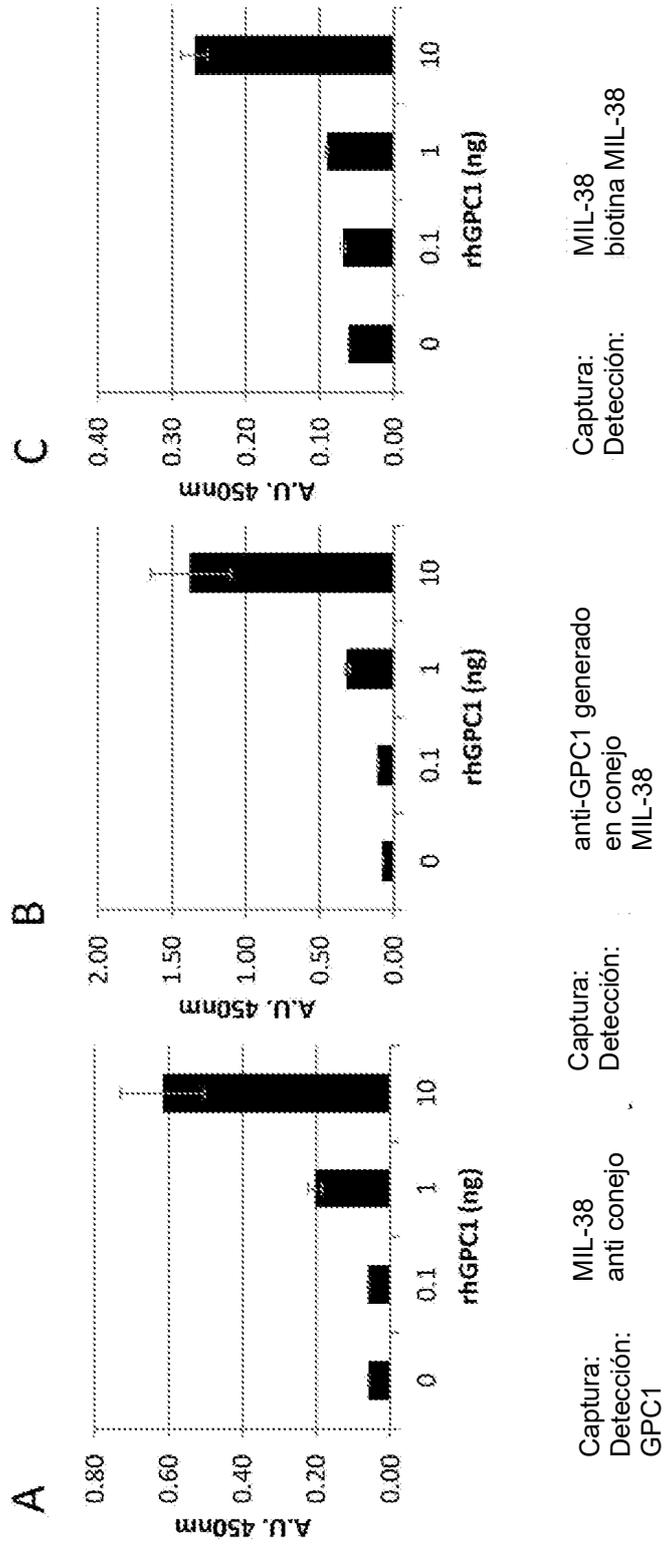


Figura 11

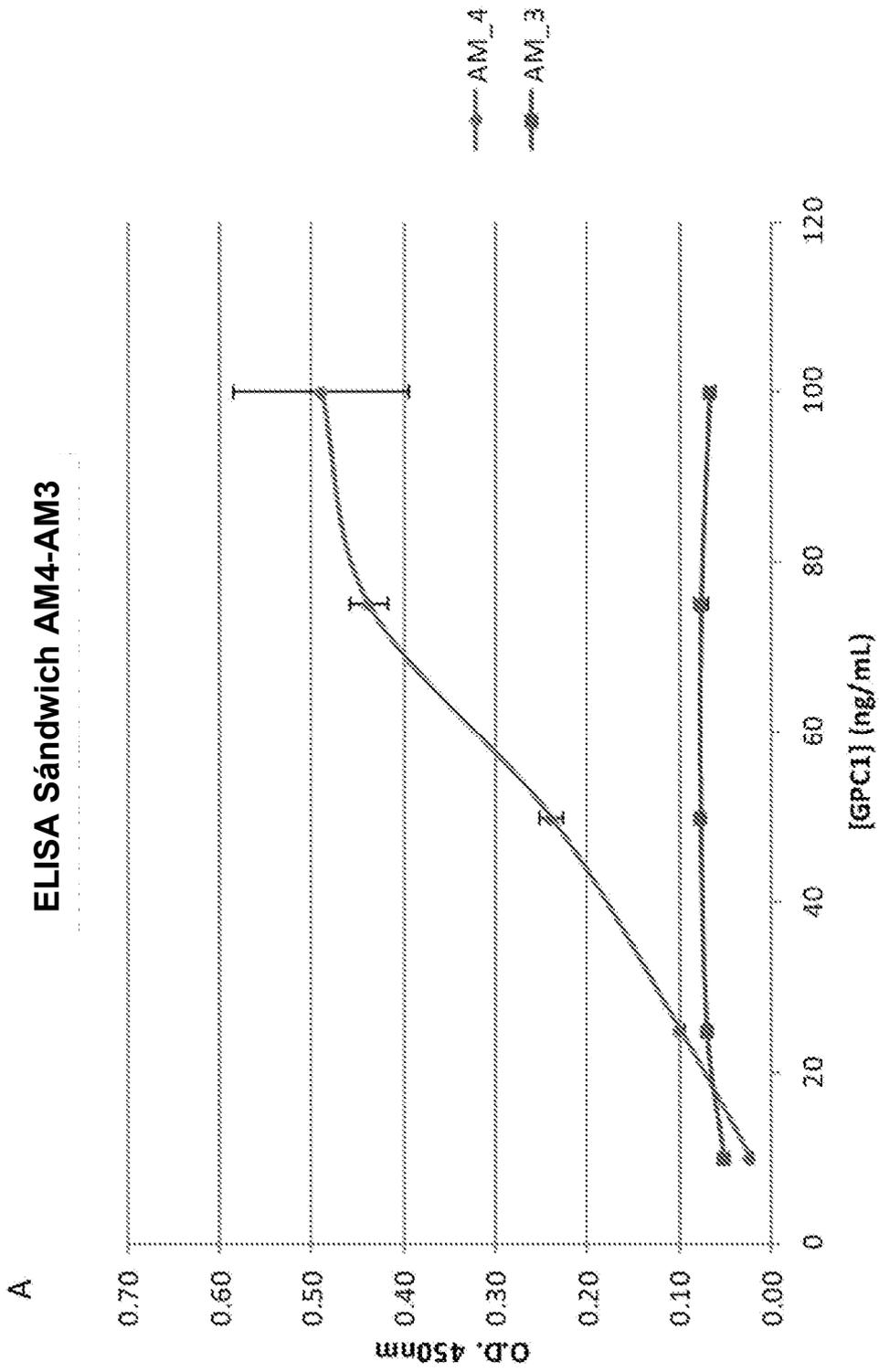


Figura 12

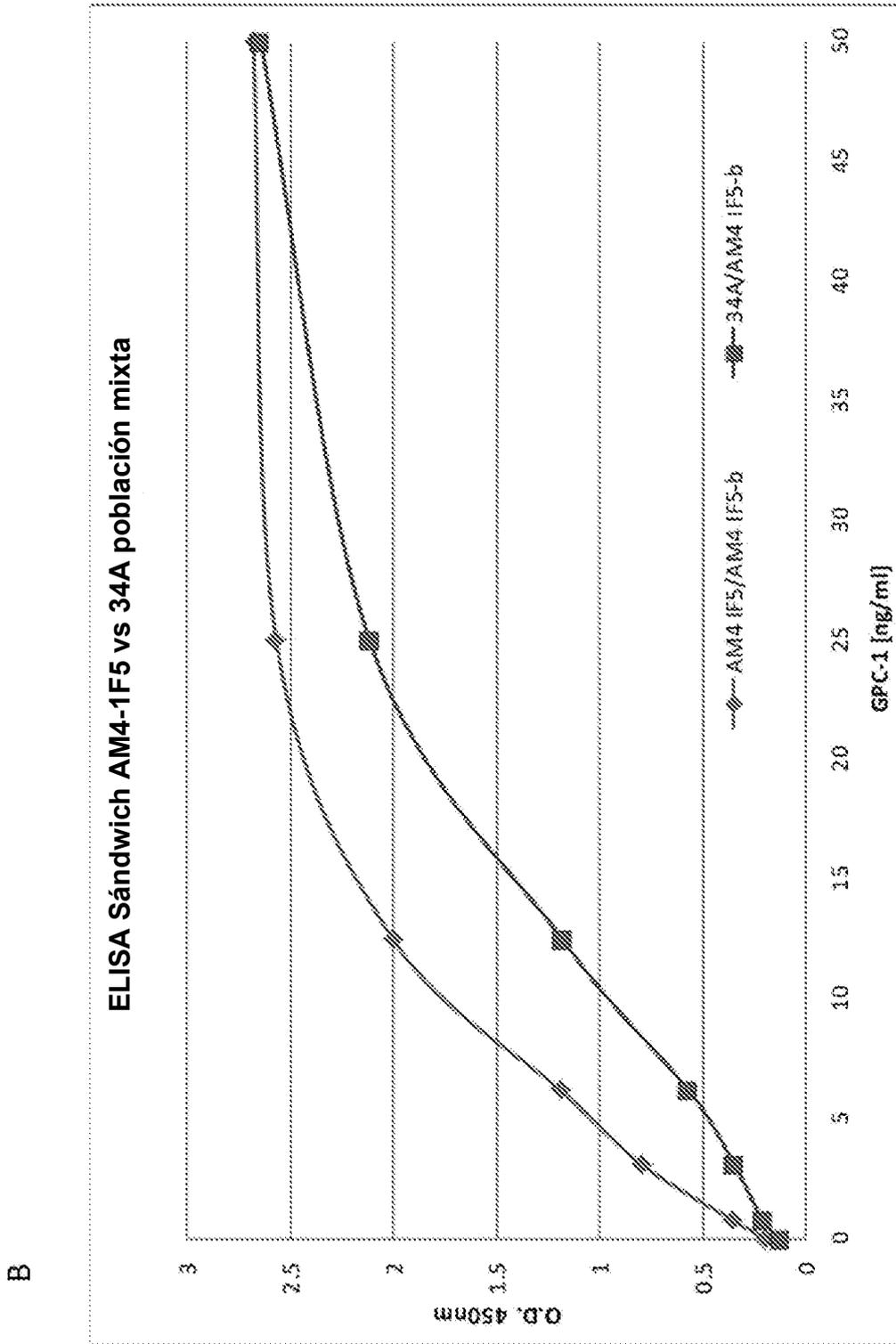


Figura 12

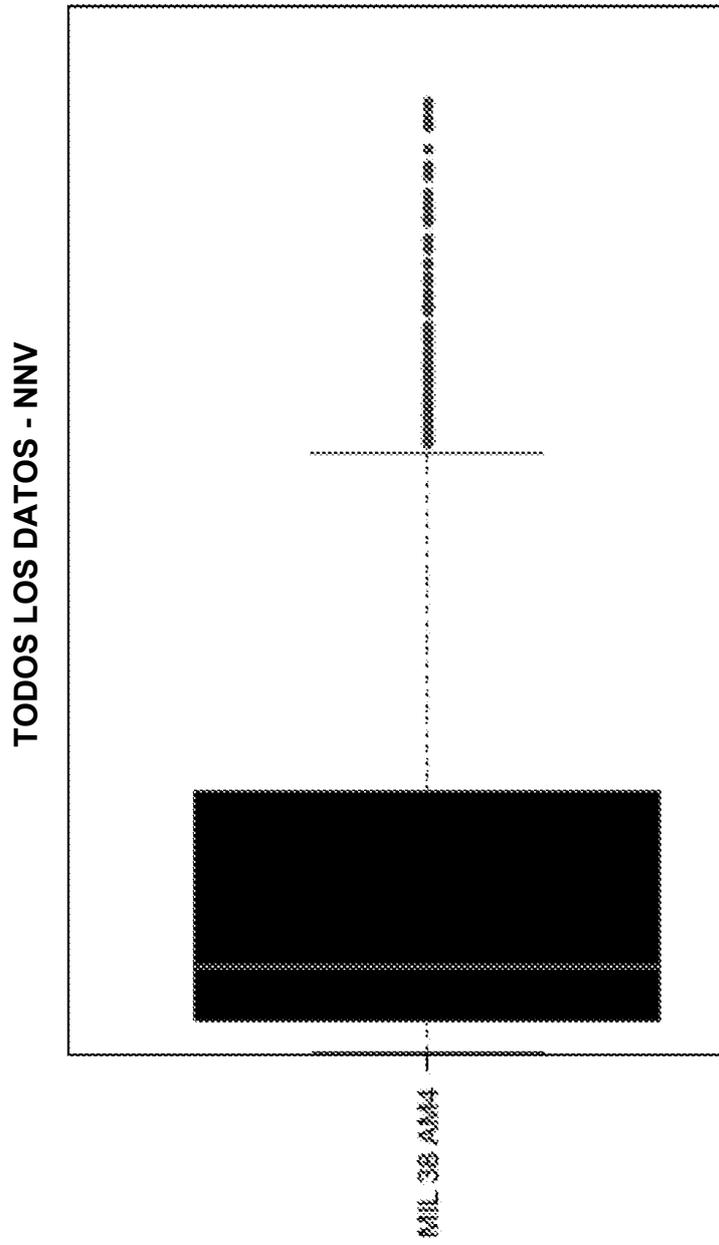


Figura 13

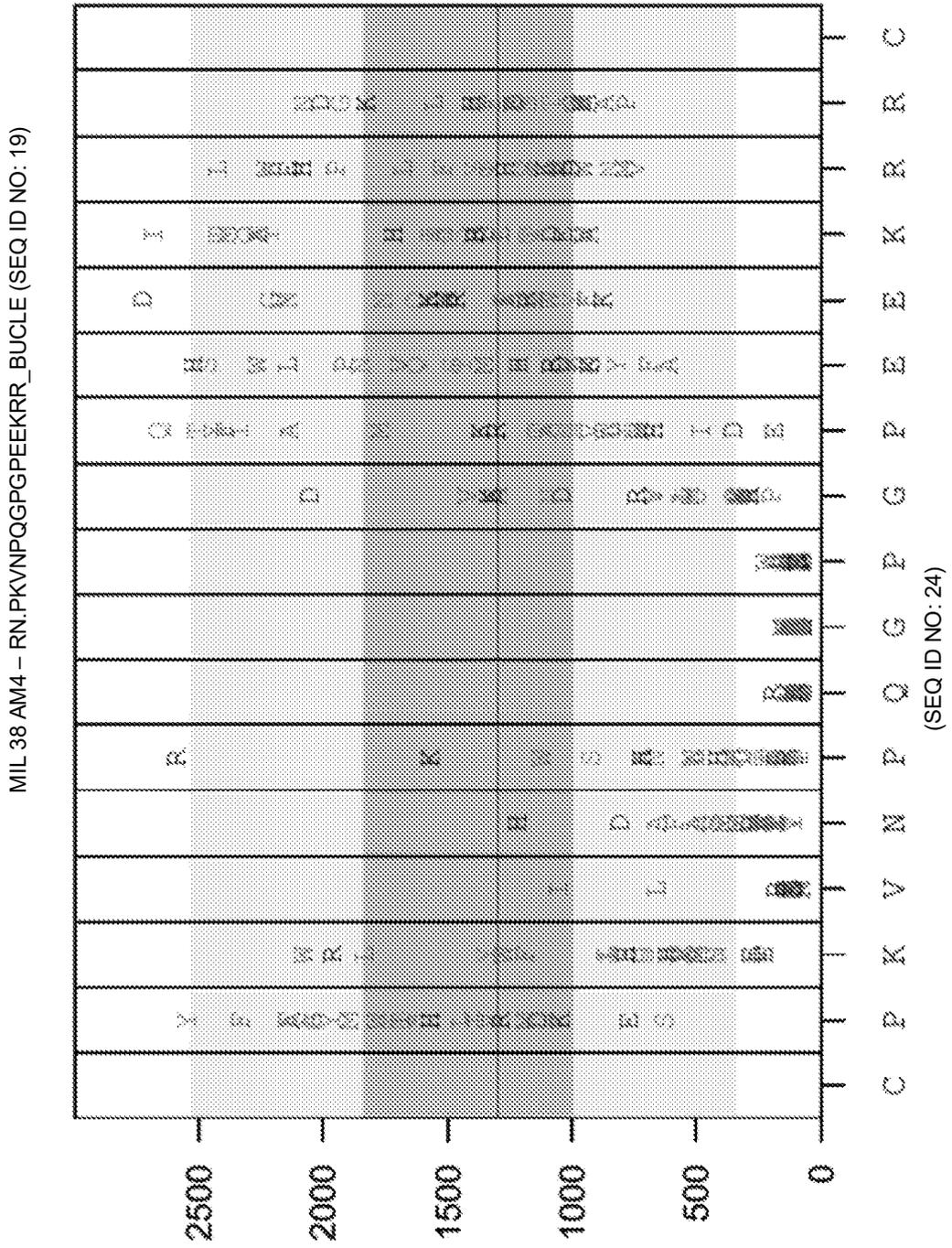


Figura 14