

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 805 085**

51 Int. Cl.:

**C07K 7/06** (2006.01)

**C07K 7/08** (2006.01)

**C07K 14/705** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.01.2015 PCT/AU2015/000019**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.07.2016 WO16112423**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.01.2015 E 15877381 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2020 EP 3245219**

54 Título: **Epítomos de glipicano y usos de éstos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.02.2021**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**VIDAL GONZÁLEZ, Maria Ester**

ES 2 805 085 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

Epítomos de glicicano y usos de éstos

5 Campo técnico

La presente invención se refiere en general a los campos de la inmunología y la medicina. Más específicamente, la presente invención se refiere a epítomos de glicicano-1 (GPC-1) y usos de éstos.

10 Antecedentes

El cáncer de próstata es el cáncer que se produce más comúnmente en hombres de todas las razas y es el segundo sólo con respecto al cáncer de pulmón en cuanto a mortalidad entre hombres blancos, negros, indios americanos/nativos de Alaska e hispanos. En 2011, 209 292 hombres en los Estados Unidos de América se diagnosticaron con cáncer de próstata y 27 970 de ellos murieron a causa de la enfermedad (U.S. Cancer Statistics Working Group, "United States Cancer Statistics: 1999-2011 Incidence and Mortality Web-based Report", Atlanta (GA): Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, y National Cancer Institute; 2014).

20 El tratamiento con cirugía y/o radioterapia es exitoso en muchos pacientes si el cáncer de próstata se diagnostica tempranamente. Sin embargo, muchos pacientes con enfermedad avanzada y una proporción considerable de todos los pacientes con cáncer de próstata desarrollan eventualmente enfermedad metastásica después de la terapia localizada.

25 Por lo tanto, existe la necesidad de pruebas convenientes, confiables y precisas para diagnosticar el cáncer de próstata, especialmente durante las etapas tempranas de la enfermedad.

30 El glicicano-1 (GPC-1) es un proteoglicano de sulfato de heparano de la superficie celular con una proteína central que se ancla a la membrana citoplasmática a través de un glicosil fosfatidil inositol. Es un miembro de una familia más grande de glicicanos. La secuencia de GPC-1 y el ácido nucleico codificante se han descrito, por ejemplo, en el documento WO 99/37764. Se ha informado que el GPC-1 se sobreexpresa en algunas formas de cáncer (por ejemplo, cáncer de páncreas, cáncer de mama), pero la expresión no difiere significativamente en otras. Los presentes inventores han determinado recientemente que el GPC-1 se sobreexpresa por las células de cáncer de próstata, y puede usarse como un medio para diagnosticar la enfermedad (solicitud de patente provisional de Estados Unidos núm. 61/928/776 titulada "Cell Surface Prostate Cancer Antigen for Diagnosis", Walsh y otros - no publicada; núm. de solicitud PCT/AU2014/000999 "Monoclonal ANTI-GPC-1 antibodies and uses thereof", Walsh y otros - no publicada).

40 En vista de la asociación entre los niveles de GPC-1 y el cáncer de próstata determinada por los presentes inventores, existe la necesidad de identificar epítomos dentro del GPC-1 que sean ventajosos para detectar y cuantificar los niveles de GPC-1 en personas sometidas a pruebas de diagnóstico y/o pronóstico.

Breve descripción de la invención

45 Los presentes inventores han determinado que una serie de epítomos dentro de la proteína GPC-1 se seleccionan como objetivo preferentemente por entidades de unión lo que incluye, pero no se limita a, anticuerpos. La patente se refiere a la invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

En la presente descripción se describen las siguientes modalidades:

50 Modalidad 1: Un epítomo para un anticuerpo anti-glicicano 1 (GPC-1) ubicado dentro de una porción del bucle flexible de GPC-1 definido por una secuencia de aminoácidos KVNPGGPGPEEK (SEQ ID NO: 1).

55 Modalidad 2: El epítomo de acuerdo con la modalidad 1, en donde el epítomo comprende un primer segmento que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de:

(i) VNPQGGPGPEEK (SEQ ID NO: 2); o

60 (ii) una variante de VNPQGGPGPEEK (SEQ ID NO: 2), en donde la variante comprende un residuo de aminoácido sustituido solo en:

una cualquiera o más de las posiciones 2, 3, 7, 8, 9, 10 y/u 11; o

una cualquiera o más de las posiciones 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 y/u 11; o

65 una cualquiera o más de las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10 y/u 11.

## ES 2 805 085 T3

Modalidad 3: El epítipo de acuerdo con la modalidad 1, en donde el epítipo comprende un primer segmento que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de:

- 5 (i) KVNPQGPGP (SEQ ID NO: 6); o
- (ii) una variante de KVNPQGPGP (SEQ ID NO: 6) que comprende un residuo de aminoácido sustituido solo en una cualquiera o más de las posiciones 1, 3, 4, 8 y 9 de la SEQ ID NO: 6.

10 Modalidad 4: La variante de acuerdo con la modalidad 3, que comprende un residuo de aminoácido sustituido solo en una cualquiera o más de las posiciones 8 y 9 de la SEQ ID NO: 6.

Modalidad 5: El epítipo de acuerdo con la modalidad 1, en donde el epítipo comprende un primer segmento que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de:

- 15 (i) KVNPQGGPGE (SEQ ID NO: 5); o
- (ii) una variante de KVNPQGGPGE (SEQ ID NO: 5) que comprende un residuo de aminoácido sustituido solo en una cualquiera o más de las posiciones 1, 3, 4, 8, 9 y 10 de la SEQ ID NO: 5.
- 20

Modalidad 6: La variante de acuerdo con la modalidad 5, que comprende un residuo de aminoácido sustituido solo en una cualquiera o más de las posiciones 8, 9 y 10 de la SEQ ID NO: 6.

25 Modalidad 7: La variante de acuerdo con la modalidad 5 o la modalidad 6, en donde E (glu) en la posición 10 se sustituye con cualquier otro aminoácido.

Modalidad 8: La variante de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 3 a 7, en donde la variante comprende una sustitución solo en una cualquiera o más de:

- 30 posición 1, en donde K (lys) se sustituye con uno cualquiera de W (trp), R (arg), L (lys), Y (tyr) o F (phe);
- posición 3, en donde N (asn) se sustituye con uno cualquiera de H (his), P (pro) o D (asp);
- 35 posición 4, en donde P (pro) se sustituye con uno cualquiera de R (arg), K (lys), W (trp), S (ser), H (his) o N (asn);
- posición 8, en donde G (gly) se sustituye con uno cualquiera de D (asp), E (glu), N (asn), Q (gln), K (lys), R (arg) o A (ala);
- 40 posición 9, en donde P (pro) se sustituye con uno cualquiera de M (met), A (ala), I (ile), K (lys), R (arg), Q (gln), S (ser), T (thr) o Y (tyr).

45 Modalidad 9: El epítipo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1 a 8, que comprende un segundo segmento que comprende una secuencia de aminoácidos TQNARA (SEQ ID NO: 8).

Modalidad 10: El epítipo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1 a 8, que comprende un segundo segmento que comprende una secuencia de aminoácidos TQNARAFRD (SEQ ID NO: 7).

50 Modalidad 11: El epítipo de acuerdo con la modalidad 1 o la modalidad 2, en donde el epítipo comprende un primer segmento que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de:

- (i) NPQGGPTEE (SEQ ID NO: 4); o
- 55 (ii) una variante de NPQGGPTEE (SEQ ID NO: 4), en donde la variante comprende un residuo de aminoácido sustituido solo en una cualquiera o más de las posiciones 1, 2, 3, 5, 7 y 9 de la SEQ ID NO: 4.

Modalidad 12: La variante de acuerdo con la modalidad 11, que comprende un residuo de aminoácido sustituido solo en una cualquiera o más de las posiciones 2, 7 y 9 de la SEQ ID NO: 4.

60 Modalidad 13: La variante de acuerdo con la modalidad 11 o la modalidad 12, en donde la variante comprende una sustitución en una cualquiera o más de:

- posición 1, en donde N (asn) se sustituye con H (his);
- 65 posición 2, en donde P (pro) se sustituye con cualquier otro aminoácido;

## ES 2 805 085 T3

- posición 3, en donde Q (gln) se sustituye con uno cualquiera de N (asn), M (met), T (thr), S (ser) o R (arg);
- posición 5, en donde P (pro) se sustituye con A (ala);
- 5 posición 7, en donde P (pro) se sustituye con uno cualquiera de A (ala), D (asp), C (cys), E (glu), Z (glx), G (gly), H (his), K (lys), M (met), F (phe), P (pro), S (ser), T (thr), W (trp) o Y (tyr);
- posición 9, en donde E (glu) se sustituye con cualquier otro aminoácido.
- 10 Modalidad 14: El epítipo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 11 a 13, en donde el epítipo comprende un segundo segmento que comprende una secuencia de aminoácidos ALSTASDDR (SEQ ID NO: 9).
- Modalidad 15: El epítipo de acuerdo con la modalidad 1 o la modalidad 2, en donde el epítipo comprende un primer segmento que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de:
- 15 (i) VNPQGGPTEE (SEQ ID NO: 3); o
- (ii) una variante de VNPQGGPTEE (SEQ ID NO: 3), en donde la variante comprende un residuo de aminoácido sustituido solo en una cualquiera o más de las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 8 y 10 de la SEQ ID NO: 3.
- 20 Modalidad 16: La variante de acuerdo con la modalidad 15, que comprende un residuo de aminoácido sustituido solo en una cualquiera o más de las posiciones 1, 2, 3 y 8 de la SEQ ID NO: 3.
- Modalidad 17: La variante de acuerdo con la modalidad 15 o la modalidad 16, en donde la variante comprende una sustitución en una cualquiera o más de:
- 25 posición 1, en donde V (val) se sustituye con cualquier otro aminoácido;
- posición 2, en donde N (asn) se sustituye con cualquier otro aminoácido;
- 30 posición 3, en donde P (pro) se sustituye con cualquier otro aminoácido;
- posición 4, en donde Q (gln) se sustituye con uno cualquiera de Y (tyr), A (ala), E (glu), V (val), M (met), F (phe), L (leu), I (ile), T (thr) o R (arg);
- 35 posición 5, en donde G (gly) se sustituye con A (ala), S (ser), T (thr), H (his), W (trp), Y (tyr), F (phe) o M (met);
- posición 8, en donde P (pro) se sustituye con cualquier otro aminoácido;
- posición 10, en donde E (glu) se sustituye con Q (gln), D (asp), F (phe), H (his) o M (met).
- 40 Modalidad 18: El epítipo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 15 a 17, en donde el epítipo comprende un segundo segmento que comprende:
- 45 una secuencia de aminoácidos PRERPP (SEQ ID NO: 10) o
- una secuencia de aminoácidos QDASDDGSGS (SEQ ID NO: 11).
- Modalidad 19: El epítipo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 15 a 17, en donde el epítipo comprende un segundo segmento que comprende una secuencia de aminoácidos PRERPP (SEQ ID NO: 10) y un tercer segmento que comprende una secuencia de aminoácidos QDASDDGSGS (SEQ ID NO: 11).
- 50 Modalidad 20: El epítipo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1 a 10, que comprende la secuencia de aminoácidos CGELYTQNARAFRDLCGNPKVNPQGGPTEEKRRRGC (SEQ ID NO: 12).
- 55 Modalidad 21: El epítipo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1 a 20, en donde el epítipo es un epítipo lineal.
- Modalidad 22: El epítipo de acuerdo con la modalidad 19, en donde el segundo segmento y el tercer segmento del epítipo son discontinuos.
- 60 Modalidad 23: El epítipo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 9, 10, 14, 18 o 22 en donde el primer segmento y el segundo segmento del epítipo son discontinuos.
- 65 Modalidad 24: Un epítipo para un anticuerpo anti-glípico 1 (GPC-1) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de una cualquiera o una pluralidad de: TQNARA (SEQ ID NO: 8), ALSTASDDR (SEQ ID

## ES 2 805 085 T3

NO: 9), PRERPP (SEQ ID NO: 10), QDASDDGSGS (SEQ ID NO: 11), LGPECSRAVMK (SEQ ID NO: 13) y TQNARAFRD (SEQ ID NO: 7).

5 Modalidad 25: El epítopo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1 a 24, en donde el epítopo es un polipéptido aislado o un polipéptido sintético.

Modalidad 26: Una disposición de epítopos que comprende una combinación de dos o más epítopos distintos, en donde

10 cada uno de dichos epítopos distintos es un epítopo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1 a 25;

cada uno de dichos epítopos es un epítopo de acuerdo con la Tabla 1; o

15 la combinación de epítopos es una cualquiera o más de las combinaciones expuestas en la Tabla 3.

Modalidad 27: Una disposición de epítopos que comprende una combinación de dos o más epítopos distintos, en donde la disposición comprende

20 un primer epítopo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1 a 10, y

un segundo epítopo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 11 a 14.

Modalidad 28: Una disposición de epítopos que comprende una combinación de dos o más epítopos distintos, en donde la disposición comprende

25 un primer epítopo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1 a 10, y

un segundo epítopo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 15 a 19.

30 Modalidad 29: Una composición que comprende un epítopo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1 a 25, o una disposición de epítopos de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 26 a 28, y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

35 Modalidad 30: Un conjunto que comprende un epítopo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1 a 25, o una disposición de epítopos de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 26 a 28, unido a uno o más soportes solubles o insolubles.

Modalidad 31: El ensamble de la modalidad 30, en donde el ensamble es un componente de un ensayo de inmunosorción ligada a enzimas (ELISA).

40 Modalidad 32: Un ácido nucleico que codifica el epítopo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1 a 25.

Modalidad 33: Un vector que comprende el ácido nucleico de acuerdo con la modalidad 32.

45 Modalidad 34: Una célula huésped que comprende el vector de acuerdo con la modalidad 33.

Modalidad 35: Una entidad de unión aislada capaz de específicamente unirse a un epítopo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1 a 25, en donde la entidad de unión no es un anticuerpo.

50 Modalidad 36: Una entidad de unión aislada capaz de específicamente unirse a un epítopo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1 a 25, en donde la entidad de unión es un anticuerpo y con la condición de que el anticuerpo no sea un: anticuerpo MIL38 (CBA20140026), anticuerpo policlonal anti-GPC-1 de conejo (ab137604, abcam), anticuerpo monoclonal anti-glipicano de ratón 2600 clon 4D1 (Millipore), o anticuerpo anti-glipicano 1 de cabra (AA 24-530).

55 Modalidad 37: Un método para detectar cáncer de próstata en un sujeto, el método que comprende obtener una muestra biológica del sujeto, detectar la presencia de un epítopo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1 a 25 en la muestra, y determinar que el sujeto tiene cáncer de próstata o una mayor probabilidad de desarrollar cáncer de próstata basado en la cantidad del epítopo detectado en la muestra.

60 La muestra biológica puede ser una muestra de fluido corporal.

La muestra biológica puede ser una muestra de tejido.

Modalidad 38: El método de acuerdo con la modalidad 37, en donde detectar la presencia del epítipo en la muestra comprende poner en contacto la muestra con una entidad de unión capaz de específicamente unirse a un epítipo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1 a 25.

5 Modalidad 39: El método de acuerdo con la modalidad 38, en donde la entidad de unión es una población de anticuerpos.

10 Modalidad 40: El método de acuerdo con la modalidad 39, en donde la población de anticuerpos comprende uno o más de: anticuerpo MIL38 (CBA20140026), anticuerpo policlonal anti-GPC-1 de conejo (ab137604, abcam), anticuerpo monoclonal anti-glipicano de ratón 2600 clon 4D1 (Millipore), o anticuerpo anti-glipicano 1 de cabra (AA 24-530).

15 Modalidad 41: El método de acuerdo con la modalidad 39, en donde la población de anticuerpos no contiene ninguno de: anticuerpo MIL38 (CBA20140026), anticuerpo policlonal anti-GPC-1 de conejo (ab137604, abcam), anticuerpo monoclonal anti-glipicano de ratón 2600 clon 4D1 (Millipore), o anticuerpo anti-glipicano 1 de cabra (AA 24-530).

20 Modalidad 42: El método de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 37 a 41, que comprende comparar la cantidad de epítipo presente en la muestra biológica con una cantidad de epítipo presente en una muestra de control, en donde la detección de una mayor cantidad de epítipo en la muestra de fluido corporal comparada con una medida equivalente de la muestra de control es indicativa de cáncer de próstata en el sujeto o de una mayor probabilidad de desarrollar cáncer de próstata en el sujeto.

25 Modalidad 43: El método de acuerdo con la modalidad 42, en donde la cantidad de epítipo detectada en la muestra se incrementa en más del 50 % por encima de la cantidad de epítipo detectada en la muestra de control.

30 Modalidad 44: El método de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 37 a 43, en donde detectar la presencia del epítipo comprende poner en contacto la muestra con una población de anticuerpos MIL38 depositados en Cellbank Australia con el núm. de acceso CBA20140026.

35 Modalidad 45: El método de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 37 a 43, en donde detectar la presencia del epítipo comprende poner en contacto la muestra con una población de anticuerpos que no comprende un anticuerpo que comprende una región variable de cadena ligera que comprende: una región determinante de la complementariedad 1 (CDR1) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 48-58 de la SEQ ID NO: 20; una región determinante de la complementariedad 2 (CDR2) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 74-80 de la SEQ ID NO: 20; y/o una región determinante de la complementariedad 3 (CDR3) que comprende o que consiste en una secuencia de aminoácidos definida por las posiciones 113-121 de la SEQ ID NO: 20.

40 Modalidad 46: El método de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 37 a 45, que comprende, además, determinar el nivel de antígeno prostático específico (PSA) en la muestra biológica y comparar el nivel detectado con el de la muestra de control.

45 Modalidad 47: El método de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 37 a 46, en donde la muestra biológica es una muestra de fluido corporal.

Modalidad 48: El método de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 37 a 46, en donde la muestra biológica es una muestra de tejido.

50 Modalidad 49: Una proteína de fusión que comprende el epítipo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1 a 25.

55 Modalidad 50: El uso del epítipo de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 1 a 25, la disposición de epítopos de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 26 a 28, o la proteína de fusión de acuerdo con la modalidad 48, como un elemento de control positivo en un método para detectar el GPC-1.

Modalidad 51: El uso de acuerdo con la modalidad 50, en donde el método es el método para detectar cáncer de próstata de acuerdo con una cualquiera de las modalidades 37 a 48.

60 El elemento de control positivo, cuando se usa en un método de detección o ensayo de detección, puede proporcionar directa o indirectamente una señal positiva/afirmativa y de esta manera al menos en parte o totalmente validar que el método o ensayo es capaz de funcionar correctamente.

65 Breve descripción de las figuras

Las modalidades preferidas de la presente invención se describirán ahora, solo a manera de ejemplo, con referencia a las figuras adjuntas en donde:

5 La Figura 1 muestra una representación de la cadena B tal como está presente en el identificador del Protein Data Bank (ID PBD) 4AD7 (<http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/4AD7>);

10 La Figura 2 muestra gráficos de diagrama de caja de datos sin procesar del tamizaje de anticuerpo MIL38-AM4. La parte inferior y superior de los recuadros 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 intercuartil, una indicación de valores atípicos estadísticos dentro del conjunto de datos (Mcgill y otros, *The American Statistician*, 32: 12-16, 1978);

La Figura 3 muestra gráficas del número de péptidos frente a la intensidad registrada obtenida para las cinco matrices (series 1-5, Ejemplo 1), cuando se incuban con 1 µg/ml (trazo superior) o 10 µg/ml de MIL38-AM4 (trazo inferior);

15 La Figura 4 muestra la representación de la cadena B a partir del identificador del Protein Data Bank (ID PBD) 4AD7 (<http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/4AD7>) con secuencia TQNARAFRDLYS (SEQ ID NO: 21) en esferas de color oscuro, y los residuos K347, V348, G362 y K363 en esferas de color claro. El bucle que conecta V348 a G362 no se resuelve a partir de la difracción de rayos X;

20 La Figura 5 muestra gráficos de diagrama de caja de datos sin procesar de tamizaje de anticuerpos policlonales y monoclonales anti-GPC-1 y MIL38-AM3. La parte inferior y superior de los recuadros 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 intercuartil, una indicación de valores atípicos estadísticos dentro del conjunto de datos (Mcgill y otros, *The American Statistician*, 32: 12-16, 1978);

25 La Figura 6 muestra gráficos del número de péptidos frente a la intensidad registrada obtenida para tres preparaciones anti-glipicano 1 disponibles comercialmente, probadas en la matriz usada para mapear MIL38-AM4, que se muestra para comparación;

30 La Figura 7 muestra la representación de la cadena B a partir del identificador del Protein Data Bank (ID PBD) 4AD7 (<http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/4AD7>). La Figura 7A muestra la representación de la cadena B con la secuencia PRERPP (SEQ ID NO: 10) en esferas de sombreado claro, y los residuos K347, V348, G362 y K363 en esferas sombreadas oscura. El bucle que conecta V348 a G362 no se resuelve a partir de la difracción de rayos X. Estos epítomos se reconocen por el anti-GPC-1 de conejo. Un epítomo adicional, QDASDDGSGS (SEQ ID NO: 11), no se resuelve en el archivo de coordenadas. La Figura 7B muestra la representación de la cadena B con la secuencia LGPECSRVMK (SEQ ID NO: 13) en esferas sombreadas. Este epítomo se reconoce por el anti-GPC-1 de ratón;

35 La Figura 8 muestra gráficos de diagrama de caja de datos sin procesar de tamizaje de anticuerpos. La parte inferior y superior de los recuadros 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 intercuartil, una indicación de valores atípicos estadísticos dentro del conjunto de datos (Mcgill y otros, *The American Statistician*, 32: 12-16, 1978);

40 La Figura 9 muestra una representación en diagrama de letras del Ac policlonal 137604 de conejo sondeado en el análisis de sustitución del conjunto 3. La barra central/horizontal representa la intensidad media registrada para la secuencia base. Las mutaciones individuales se dibujan en la columna correspondiente a la posición de la mutación, y los símbolos se trazan a la altura correspondiente a la intensidad registrada;

45 La Figura 10 muestra una representación de diagrama de letras del anti-GPC-1 policlonal de cabra sondeado en el análisis de sustitución del conjunto 2 (Ejemplo 3);

50 La Figura 11 muestra una representación de diagrama de letras de MIL38-AM4 sondeado en el análisis de sustitución del conjunto 3 (Ejemplo 3);

55 La Figura 12 muestra una representación de mapa de calor de los datos obtenidos para MIL38-AM4 sondeado en los péptidos del conjunto 1 (Ejemplo 3). La intensidad de la señal va de negro (línea de base) a blanco (media) a gris (máximo); 'X' = eje x; las secuencias peptídicas del eje x representadas en las columnas X1-X33 son las siguientes: el péptido X-1 es los residuos 344 - 353 de la SEQ ID NO: 1; el péptido X-2 es los residuos 348 - 357 de la SEQ ID NO: 1; el péptido X-3 es los residuos 352 - 361 de la SEQ ID NO: 1; el péptido X-4 es los residuos 356 - 365 de la SEQ ID NO: 1; el péptido X-5 es los residuos 344 - 354 de la SEQ ID NO: 1; el péptido X-6 es los residuos 348 - 358 de la SEQ ID NO: 1; el péptido X-7 es los residuos 352 - 362 de la SEQ ID NO: 1; el péptido X-8 es los residuos 356 - 366 de la SEQ ID NO: 1; el péptido X-9 es los residuos 344 - 355 de la SEQ ID NO: 1; el péptido X-10 es los residuos 348 - 359 de la SEQ ID NO: 1; el péptido X-11 es los residuos 352 - 363 de la SEQ ID NO: 1; el péptido X-12 es los residuos 344 - 356 de la SEQ ID NO: 1; el péptido X-13 es los residuos 348 - 360 de la SEQ ID NO: 1; el péptido X-14 es los residuos 352 - 364 de la SEQ ID NO: 1; el péptido X-15 es los residuos 344 - 357 de la SEQ ID NO: 1; el péptido X-16 es los residuos 348 - 361 de la SEQ ID NO: 1; el péptido X-17 es los residuos 352 - 365 de la SEQ ID NO: 1; el péptido X-18 es los residuos 344 - 358 de la SEQ ID NO: 1; el péptido X-19 es los residuos 348 - 362 de la SEQ ID NO: 1; el péptido X-20

es los residuos 352 - 366 de la SEQ ID NO: 1; el péptido X-21 es los residuos 344 - 359 de la SEQ ID NO: 1; el péptido X-22 es los residuos 348 - 363 de la SEQ ID NO: 1; el péptido X-23 es los residuos 344 - 360 de la SEQ ID NO: 1; el péptido X-24 es los residuos 348 - 364 de la SEQ ID NO: 1; el péptido X-25 es los residuos 344 - 361 de la SEQ ID NO: 1; el péptido X-26 es los residuos 348 - 365 de la SEQ ID NO: 1; el péptido X-27 es los residuos 344 - 362 de la SEQ ID NO: 1; el péptido X-28 es los residuos 348 - 366 de la SEQ ID NO: 1; el péptido X-29 es los residuos 344 - 363 de la SEQ ID NO: 1; el péptido X-30 es los residuos 344 - 364 de la SEQ ID NO: 1; el péptido X-31 es los residuos 344 - 365 de la SEQ ID NO: 1; el péptido X-32 es los residuos 344 - 366 de la SEQ ID NO: 1; el péptido X-33 es una secuencia aleatoria/desorganizada; 'Y' = eje y; las secuencias peptídicas del eje y representadas en las columnas Y1-Y19 son las siguientes: el péptido Y-1 es los residuos 131 - 140 de la SEQ ID NO: 1; el péptido Y-2 es los residuos 135 - 144 de la SEQ ID NO: 1; el péptido Y-3 es los residuos 139 - 148 de la SEQ ID NO: 1; el péptido Y-4 es los residuos 131 - 141 de la SEQ ID NO: 1; el péptido Y-5 es los residuos 135 - 145 de la SEQ ID NO: 1; el péptido Y-6 es los residuos 139 - 149 de la SEQ ID NO: 1; el péptido Y-7 es los residuos 131 - 142 de la SEQ ID NO: 1; el péptido Y-8 es los residuos 135 - 146 de la SEQ ID NO: 1; el péptido Y-9 es los residuos 131 - 143 de la SEQ ID NO: 1; el péptido Y-10 es los residuos 135 - 147 de la SEQ ID NO: 1; el péptido Y-11 es los residuos 131 - 144 de la SEQ ID NO: 1; el péptido Y-12 es los residuos 135 - 148 de la SEQ ID NO: 1; el péptido Y-13 es los residuos 131 - 145 de la SEQ ID NO: 1; el péptido Y-14 es los residuos 135 - 149 de la SEQ ID NO: 1; el péptido Y-15 es los residuos 131 - 146 de la SEQ ID NO: 1; el péptido Y-16 es los residuos 131 - 147 de la SEQ ID NO: 1; el péptido Y-17 es los residuos 131 - 148 de la SEQ ID NO: 1; el péptido Y-18 es los residuos 131 - 149 de la SEQ ID NO: 1; el péptido Y-19 es una secuencia aleatoria/ desorganizada.

La Figura 13 es una matriz de diagrama de dispersión de todos los resultados obtenidos en los péptidos del conjunto 1;

La Figura 14 muestra resultados de electroforesis y transferencia Western 2D que demuestran que los anticuerpos MIL38 y anti-GPC-1 muestran reactividad superpuesta en la transferencia Western en gel 2D;

La Figura 15 muestra transferencias Western de inmunoprecipitaciones realizadas en extractos de proteínas de membrana celular de cáncer de próstata DU-145 o C3 (negativas para MIL38) con anticuerpos MIL38 o anti-GPC-1; y

La Figura 16 muestra transferencias Western de inmunoprecipitaciones que demuestran que el anticuerpo MIL38 puede detectar glicano-1 en el plasma (Figura 16A) de pacientes con cáncer de próstata y en extractos de cánceres de próstata (Figura 16B). Los carriles de la Figura 16A son: 046 IP NT-IP a partir de plasma de cáncer de próstata; 046 IP HepI-IP a partir de plasma de cáncer de próstata tratado con heparinasa; 042 IP NT-IP a partir de plasma de control normal; 042 IP HepI-IP a partir de plasma de control normal tratado con heparinasa; Magic Mark - marcador de proteína comercial como estándar de peso molecular.

#### Definiciones

Como se usa en esta solicitud, la forma singular "un", "una" y "el/la" incluyen referencias al plural a menos que el contexto lo indique claramente de cualquier otra manera. Por ejemplo, la frase "un anticuerpo" incluye, además, múltiples anticuerpos.

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

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

El término "epítipo", como se usa en la presente descripción, se refiere a la(s) porción(es) específica(s) de un antígeno que interactúa(n) (por ejemplo, se une(n)) con una o más entidades de unión tales como, por ejemplo, una proteína, ligando, anticuerpo, fragmento de anticuerpo o derivado de anticuerpo. Como se usa en la presente descripción, los términos "anticuerpo" y "anticuerpos" incluyen IgG (lo que incluye IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), IgA (lo que incluye IgA1 e IgA2), IgD, IgE, IgM e IgY, anticuerpos enteros, lo que incluyen anticuerpos enteros unicatenarios y fragmentos de unión a antígeno de estos. Los fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno incluyen, pero no se limitan a, Fv, Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub>, Fd, Fv monocatenario (scFv), anticuerpos monocatenarios, Fv unidos por disulfuro (sdFv) y fragmentos que comprenden ya sea un dominio VL o un dominio VH. Los anticuerpos pueden ser de cualquier origen animal o huésped de producción apropiado. Los fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno, lo que incluye anticuerpos monocatenarios, pueden comprender la(s) región(es) variable(s) sola(s) o en combinación con la totalidad o parte de lo siguiente: región bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3. Además, se incluyen cualesquiera combinaciones de regiones variable y región bisagra, dominios CH1, CH2 y CH3. Los anticuerpos pueden ser monoclonales, policlonales quiméricos, multiespecíficos, humanizados y anticuerpos monoclonales y policlonales humanos que se unen específicamente a la molécula biológica. El anticuerpo puede ser un anticuerpo biespecífico, avicuerpo, diacuerpo, tricuerpo, tetracuerpo, nanocuerpo, anticuerpo de dominio único, dominio VHH, anticuerpo humano, anticuerpo completamente humanizado, anticuerpo parcialmente humanizado, anticalina, adnectina o un aficuerpo.



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

10 Como se usa en la presente descripción, el término "anticuerpo humanizado" se refiere a formas de anticuerpos que contienen secuencias de anticuerpos humanos así como también anticuerpos no humanos (por ejemplo, anticuerpos murinos). Por ejemplo, un anticuerpo humanizado puede comprender sustancialmente todos o al menos uno y típicamente dos dominios variables, en el que todos/sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas/sustancialmente todas las regiones FR son a partir de la secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado puede comprender opcionalmente, además, al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc) que puede ser típicamente la de una inmunoglobulina humana.

15 Como se usa en la presente descripción, el término "anticuerpo quimérico" se refiere a un anticuerpo que exhibe una actividad biológica deseada, y en el que una porción de la cadena ligera y/o cadena pesada es idéntica u homóloga con respecto a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie dada/específica, mientras que la(s) cadena(s) restante(s) es(son) idéntica(s) u homóloga(s) con las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie diferente. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede comprender regiones variables que se derivan de una primera especie y comprender regiones constantes que se derivan de una segunda especie. Los anticuerpos quiméricos pueden construirse, por ejemplo, mediante modificación por ingeniería genética a partir de segmentos de genes de inmunoglobulina que pertenecen a diferentes especies.

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

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

30 Como se usa en la presente descripción, el término "sujeto" incluye cualquier animal de importancia económica, social o de investigación, lo que incluye especies de bovinos, equinos, ovinos, primates, aves y roedores. Por lo tanto, un "sujeto" puede ser un mamífero tal como, por ejemplo, un mamífero humano o no humano.

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

40 Como se usa en la presente descripción, los términos "proteína", "péptido" y "polipéptido" se refieren cada uno a un polímero compuesto de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos y se usan indistintamente. Para los propósitos de la presente invención, un "polipéptido" puede constituir una proteína de longitud completa o una porción de una proteína de longitud completa, y no existe una diferencia deseada en el significado de un "péptido" y un "polipéptido".

45 Como se usa en la presente descripción, una sustitución de aminoácidos "conservadora" se refiere a la sustitución de un residuo de aminoácido dado en una secuencia de aminoácidos con otro residuo de aminoácido diferente de un tamaño similar y/o de propiedades químicas similares. Los ejemplos no limitantes de sustituciones conservadoras de aminoácidos incluyen: A (Ala) sustituido con S (Ser); R (arg) sustituido con K (lys); N (asn) sustituido con Q (gln) o H (his); D (asp) sustituido con E (glu); Q (gln) sustituido con N (asn); C (cys) sustituido con S (ser); E (glu) sustituido con D (asp); G (gly) sustituido con P (pro).

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

Como se usa en la presente descripción, el término "entidad de unión" abarca cualquier molécula capaz de unirse específicamente a un epítipo de GPC-1 o imitación de este como se describe en la presente descripción. Los ejemplos no limitantes de entidades de unión incluyen polipéptidos tales como, por ejemplo, anticuerpos.

Como se usa en la presente descripción, el término "kit" se refiere a cualquier sistema de suministro para suministrar materiales. Dichos sistemas de suministro incluyen sistemas que permiten el almacenamiento, transporte o suministro de reactivos de reacción (por ejemplo, marcadores, muestras de referencia, material de soporte, etcétera, en los recipientes apropiados) y/o materiales de soporte (por ejemplo, tampones, instrucciones escritas para realizar un ensayo, etcétera) de un lugar a otro. Por ejemplo, los kits pueden incluir uno o más recintos, tales como cajas, que contienen los reactivos de reacción y/o materiales de soporte relevantes.

Como se usa en la presente descripción, el término "elemento de control positivo" en el contexto de un método de detección o ensayo de detección se refiere a un elemento que, cuando se usa en el método o ensayo, proporciona directa o indirectamente una señal positiva/afirmativa y, de esta manera, al menos en parte o en su totalidad valida que el método o ensayo es capaz de funcionar correctamente.

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

Cualquier descripción de documentos de la técnica anterior en la presente descripción, o declaraciones en la presente descripción derivadas o basadas en dichos documentos, no es una admisión de que los documentos o declaraciones derivadas son parte del conocimiento general común de la técnica relevante.

#### Descripción Detallada

Los presentes inventores han identificado epítipos específicos dentro del glipicano-1 (GPC-1) ventajosos para detectar y cuantificar los niveles de GPC-1 cuando se usan entidades de unión tales como anticuerpos. Aunque son útiles para muchos propósitos, estos epítipos y sus combinaciones pueden seleccionarse como objetivo en ensayos de diagnóstico para el cáncer de próstata que buscan cuantificar los niveles de GPC-1.

En consecuencia, la presente invención se refiere a epítipos de GPC-1 y componentes de estos; combinaciones de dichos epítipos y/o componentes de epítipo; entidades de unión capaces de dirigirse específicamente a los epítipos, componentes y/o combinaciones; composiciones, kits y otras entidades que comprenden los epítipos, componentes y/o combinaciones; métodos para generar entidades de unión capaces de dirigirse específicamente a los epítipos, componentes y/o combinaciones; y métodos de diagnóstico para el cáncer de próstata que requieren la detección de los epítipos, componentes y/o combinaciones.

#### Glipicano-1 (GPC-1)

La presente invención surge de una serie de epítipos en el proteoglicano de sulfato de heparano de glipicano-1 (GPC-1) que se seleccionan como objetivo por entidades de unión específicas (por ejemplo, anticuerpos).

Los epítipos pueden estar presentes en una proteína GPC-1 de mamífero tal como, por ejemplo, una especie bovina, equina, ovina, de primates o roedores. Por lo tanto, los epítipos pueden estar presentes en una proteína GPC-1 de mamífero tal como, por ejemplo, un mamífero humano o no humano (por ejemplo, una proteína GPC-1 de perro).

Adicional o alternativamente, los epítipos pueden estar presentes en una proteína GPC-1 no mamífera tal como, por ejemplo, una proteína GPC-1 aviar.

Los epítipos pueden estar presentes en una proteína GPC-1 humana (por ejemplo, como se define mediante una secuencia expuesta en cualquiera de: secuencia de referencia NCBI núm. de acceso NP\_002072.2, núm. de acceso GenBank AAH51279.1, núm. de acceso GenBank AAA98132.1, núm. de acceso GenBank EAW71184.1, núm. de acceso UniProtKB/Swiss-Prot P35052.2 y/o SEQ ID NO: 14).

Además, se entenderá que los epítipos pueden estar presentes en una variante de GPC-1 (por ejemplo, una isoforma GPC-1, variante de empalme o alotipo). Los epítipos pueden estar presentes en formas unidas a la superficie celular y/o secretadas de GPC-1.

#### Epítipos

##### Epítipos de glipicano-1

## ES 2 805 085 T3

En la presente descripción se describen epítomos de GPC-1 y componentes de estos, y también combinaciones de dichos epítomos y/o componentes de epítomo.

En algunas modalidades, un epítomo de GPC-1 de acuerdo con la presente invención puede comprender o consistir en uno cualquiera o más de los epítomos expuestos en la Tabla 1 más abajo.

Tabla 1: Ejemplos no limitantes de epítomos de GPC-1 de acuerdo con la presente invención

SEQ ID NO	SECUENCIA DE EPÍTOPO
1	KVNPQGGPGEEL (o una variante o fragmento de esta)
2	VNPQGGPGEEL (o una variante o fragmento de esta)
3	VNPQGGPGE (o una variante o fragmento de esta)
4	NPQGGPGE (o una variante o fragmento de esta)
5	KVNPQGGPGE (o una variante o fragmento de esta)
6	KVNPQGGPG (o una variante o fragmento de esta)
7	TQNARAFRD (o una variante o fragmento de esta)
8	TQNARA (o una variante o fragmento de esta)
9	ALSTASDDR (o una variante o fragmento de esta)
10	PRERPP (o una variante o fragmento de esta)
11	QDASDDGSGS (o una variante o fragmento de esta)
12	CGELYTQNARAFRDLCGNPKVNPQGGPGEELKRRRGC (o una variante o fragmento de esta)
13	LGPECSRAVMK (o una variante o fragmento de esta)

En ciertas modalidades, un epítomo de la presente invención comprende o consiste en una pluralidad de segmentos. Estos epítomos pueden ser lineales o discontinuos. En la Tabla 2 más abajo se exponen ejemplos no limitantes de epítomos que comprenden una pluralidad de segmentos.

Tabla 2: Ejemplos no limitantes adicionales de epítomos de GPC-1 de acuerdo con la presente invención

SEQ ID NO.	SECUENCIAS DE SEGMENTO DE EPÍTOPO
1	1er segmento: KVNPQGGPGEEL (o una variante o fragmento de esta)
7	2do segmento: TNARAFRD (o una variante o fragmento de esta)
6	1er segmento: KVNPQGGPG (o una variante o fragmento de esta)
7	2do segmento: TNARAFRD (o una variante o fragmento de esta)
4	1er segmento: NPQGGPGE (o una variante o fragmento de esta)
7	2do segmento: TNARAFRD (o una variante o fragmento de esta)
3	1er segmento: VNPQGGPGE (o una variante o fragmento de esta)
7	2do segmento: TNARAFRD (o una variante o fragmento de esta)
2	1er segmento: VNPQGGPGEEL (o una variante o fragmento de esta)
7	2do segmento: TNARAFRD (o una variante o fragmento de esta)
5	1er segmento: KVNPQGGPGE (o una variante o fragmento de esta)
7	2do segmento: TNARAFRD (o una variante o fragmento de esta)
1	1er segmento: KVNPQGGPGEEL (o una variante o fragmento de esta)
8	2do segmento: TNARA (o una variante o fragmento de esta)
6	1er segmento: KVNPQGGPG (o una variante o fragmento de esta)
8	2do segmento: TNARA (o una variante o fragmento de esta)
4	1er segmento: NPQGGPGE (o una variante o fragmento de esta)
8	2do segmento: TNARA (o una variante o fragmento de esta)
3	1er segmento: VNPQGGPGE (o una variante o fragmento de esta)
8	2do segmento: TNARA (o una variante o fragmento de esta)
2	1er segmento: VNPQGGPGEEL (o una variante o fragmento de esta)
8	2do segmento: TNARA (o una variante o fragmento de esta)
5	1er segmento: KVNPQGGPGE (o una variante o fragmento de esta)
8	2do segmento: TNARA (o una variante o fragmento de esta)
1	1er segmento: KVNPQGGPGEEL (o una variante o fragmento de esta)
9	2do segmento: ALSTASDDR (o una variante o fragmento de esta)

ES 2 805 085 T3

	6 9	1er segmento: KVNPGGPGP (o una variante o fragmento de esta) 2do segmento: ALSTASDDR (o una variante o fragmento de esta)
5	4 9 3 9	1er segmento: NPQGGPPEE (o una variante o fragmento de esta) 2do segmento: ALSTASDDR (o una variante o fragmento de esta) 1er segmento: VNPQGGPPEE (o una variante o fragmento de esta) 2do segmento: ALSTASDDR (o una variante o fragmento de esta)
10	2 9 5 9	1er segmento: VNPQGGPPEEK (o una variante o fragmento de esta) 2do segmento: ALSTASDDR (o una variante o fragmento de esta) 1er segmento: KVNPGGPGPE (o una variante o fragmento de esta) 2do segmento: ALSTASDDR (o una variante o fragmento de esta)
15	1 11 6 11	1er segmento: KVNPGGPGPEEK (o una variante o fragmento de esta) 2do segmento: QDASDDGSGS (o una variante o fragmento de esta) 1er segmento: KVNPGGPGP (o una variante o fragmento de esta) 2do segmento: QDASDDGSGS (o una variante o fragmento de esta)
20	4 11 3 11 2 11	1er segmento: NPQGGPPEE (o una variante o fragmento de esta) 2do segmento: QDASDDGSGS (o una variante o fragmento de esta) 1er segmento: VNPQGGPPEE (o una variante o fragmento de esta) 2do segmento: QDASDDGSGS (o una variante o fragmento de esta) 1er segmento: VNPQGGPPEEK (o una variante o fragmento de esta) 2do segmento: QDASDDGSGS (o una variante o fragmento de esta)
25	5 11	1er segmento: KVNPGGPGPE (o una variante o fragmento de esta) 2do segmento: QDASDDGSGS (o una variante o fragmento de esta)
30	1 13	1er segmento: KVNPGGPGPEEK (o una variante o fragmento de esta) 2do segmento: LGPECSRAVMK (o una variante o fragmento de esta)
	6 13	1er segmento: KVNPGGPGP (o una variante o fragmento de esta) 2do segmento: LGPECSRAVMK (o una variante o fragmento de esta)
35	4 13 3 13	1er segmento: NPQGGPPEE (o una variante o fragmento de esta) 2do segmento: LGPECSRAVMK (o una variante o fragmento de esta) 1er segmento: VNPQGGPPEE (o una variante o fragmento de esta) 2do segmento: LGPECSRAVMK (o una variante o fragmento de esta)
40	2 13 5 13	1er segmento: VNPQGGPPEEK (o una variante o fragmento de esta) 2do segmento: LGPECSRAVMK (o una variante o fragmento de esta) 1er segmento: KVNPGGPGPE (o una variante o fragmento de esta) 2do segmento: LGPECSRAVMK (o una variante o fragmento de esta)
45	1 10 6 10 4 10	1er segmento: KVNPGGPGPEEK (o una variante o fragmento de esta) 2do segmento: PRERPP (o una variante o fragmento de esta) 1er segmento: KVNPGGPGP (o una variante o fragmento de esta) 2do segmento: PRERPP (o una variante o fragmento de esta) 1er segmento: NPQGGPPEE (o una variante o fragmento de esta) 2do segmento: PRERPP (o una variante o fragmento de esta)
50	3 10 2 10	1er segmento: VNPQGGPPEE (o una variante o fragmento de esta) 2do segmento: PRERPP (o una variante o fragmento de esta) 1er segmento: VNPQGGPPEEK (o una variante o fragmento de esta) 2do segmento: PRERPP (o una variante o fragmento de esta)
55	5 10	1er segmento: KVNPGGPGPE (o una variante o fragmento de esta) 2do segmento: PRERPP (o una variante o fragmento de esta)
60	11 13 10 13 9 13	1er segmento: QDASDDGSGS (o una variante o fragmento de esta) 2do segmento: LGPECSRAVMK (o una variante o fragmento de esta) 1er segmento: PRERPP (o una variante o fragmento de esta) 2do segmento: LGPECSRAVMK (o una variante o fragmento de esta) 1er segmento: ALSTASDDR (o una variante o fragmento de esta) 2do segmento: LGPECSRAVMK (o una variante o fragmento de esta)
65	8 13 7 13	1er segmento: TQNARA (o una variante o fragmento de esta) 2do segmento: LGPECSRAVMK (o una variante o fragmento de esta) 1er segmento: TQNARAFRD (o una variante o fragmento de esta) 2do segmento: LGPECSRAVMK (o una variante o fragmento de esta)

7	1er segmento: TQNARAFRD (o una variante o fragmento de esta)
9	2do segmento: ALSTASDDR (o una variante o fragmento de esta)
8	1er segmento: TQNARA (o una variante o fragmento de esta)
9	2do segmento: ALSTASDDR (o una variante o fragmento de esta)
10	1er segmento: PRERPP (o una variante o fragmento de esta)
9	2do segmento: ALSTASDDR (o una variante o fragmento de esta)
11	1er segmento: QDASDDGSGS (o una variante o fragmento de esta)
9	2do segmento: ALSTASDDR (o una variante o fragmento de esta)
7	1er segmento: TQNARAFRD (o una variante o fragmento de esta)
10	2do segmento: PRERPP (o una variante o fragmento de esta)
8	1er segmento: TQNARA (o una variante o fragmento de esta)
10	2do segmento: PRERPP (o una variante o fragmento de esta)
11	1er segmento: QDASDDGSGS (o una variante o fragmento de esta)
10	2do segmento: PRERPP (o una variante o fragmento de esta)
7	1er segmento: TQNARAFRD (o una variante o fragmento de esta)
11	2do segmento: QDASDDGSGS (o una variante o fragmento de esta)
8	1er segmento: TQNARA (o una variante o fragmento de esta)
11	2do segmento: QDASDDGSGS (o una variante o fragmento de esta)
1	1er segmento: KVNPPQGGPPEEK (o una variante o fragmento de esta)
10	2do segmento: PRERPP (o una variante o fragmento de esta)
11	3er segmento: QDASDDGSGS (o una variante o fragmento de esta)
6	1er segmento: KVNPPQGGP (o una variante o fragmento de esta)
10	2do segmento: PRERPP (o una variante o fragmento de esta)
11	3er segmento: QDASDDGSGS (o una variante o fragmento de esta)
4	1er segmento: NPQGGPPEE (o una variante o fragmento de esta)
10	2do segmento: PRERPP (o una variante o fragmento de esta)
11	3er segmento: QDASDDGSGS (o una variante o fragmento de esta)
3	1er segmento: VNPQGGPPEE (o una variante o fragmento de esta)
10	2do segmento: PRERPP (o una variante o fragmento de esta)
11	3er segmento: QDASDDGSGS (o una variante o fragmento de esta)
2	1er segmento: VNPQGGPPEEK (o una variante o fragmento de esta)
10	2do segmento: PRERPP (o una variante o fragmento de esta)
11	3er segmento: QDASDDGSGS (o una variante o fragmento de esta)
5	1er segmento: KVNPPQGGPPE (o una variante o fragmento de esta)
10	2do segmento: PRERPP (o una variante o fragmento de esta)
11	3er segmento: QDASDDGSGS (o una variante o fragmento de esta)
1	1er segmento: KVNPPQGGPPEEK (o una variante o fragmento de esta)
10	2do segmento: PRERPP (o una variante o fragmento de esta)
11	3er segmento: QDASDDGSGS (o una variante o fragmento de esta)

En otras modalidades, se describen combinaciones de epítomos distintos que comprenden o consisten en una pluralidad de epítomos discretos. Estos epítomos discretos pueden ser lineales o discontinuos. Los ejemplos no limitantes de combinaciones de epítomos que comprenden una pluralidad de epítomos distintos se exponen en la Tabla 3 más abajo.

Tabla 3: Ejemplos no limitantes de combinaciones de epítomos de GPC-1 de acuerdo con la presente invención

SEQ ID NO.	SECUENCIAS DE COMBINACIÓN DE EPÍTOMOS
1	1er epítomo: KVNPPQGGPPEEK (o una variante o fragmento de esta)
7	2do epítomo: TQNARAFRD (o una variante o fragmento de esta)
6	1er epítomo: KVNPPQGGP (o una variante o fragmento de esta)
7	2do epítomo: TQNARAFRD (o una variante o fragmento de esta)
4	1er epítomo: NPQGGPPEE (o una variante o fragmento de esta)
7	2do epítomo: TQNARAFRD (o una variante o fragmento de esta)
3	1er epítomo: VNPQGGPPEE (o una variante o fragmento de esta)
7	2do epítomo: TQNARAFRD (o una variante o fragmento de esta)
2	1er epítomo: VNPQGGPPEEK (o una variante o fragmento de esta)
7	2do epítomo: TQNARAFRD (o una variante o fragmento de esta)
5	1er epítomo: KVNPPQGGPPE (o una variante o fragmento de esta)
7	2do epítomo: TQNARAFRD (o una variante o fragmento de esta)



ES 2 805 085 T3

5	5 10	1er epítopo: KVPNQGGPGE (o una variante o fragmento de esta) 2do epítopo: PRERPP (o una variante o fragmento de esta)
5	11 13	1er epítopo: QDASDDGSGS (o una variante o fragmento de esta) 2do epítopo: LGPECSRAVMK (o una variante o fragmento de esta)
	10 13	1er epítopo: PRERPP (o una variante o fragmento de esta) 2do epítopo: LGPECSRAVMK (o una variante o fragmento de esta)
10	9 13	1er epítopo: ALSTASDDR (o una variante o fragmento de esta) 2do epítopo: LGPECSRAVMK (o una variante o fragmento de esta)
	8 13	1er epítopo: TQNARA (o una variante o fragmento de esta) 2do epítopo: LGPECSRAVMK (o una variante o fragmento de esta)
15	7 13	1er epítopo: TQNARAFRD (o una variante o fragmento de esta) 2do epítopo: LGPECSRAVMK (o una variante o fragmento de esta)
	7 9	1er epítopo: TQNARAFRD (o una variante o fragmento de esta) 2do epítopo: ALSTASDDR (o una variante o fragmento de esta)
20	8 9	1er epítopo: TQNARA (o una variante o fragmento de esta) 2do epítopo: ALSTASDDR (o una variante o fragmento de esta)
	10 9	1er epítopo: PRERPP (o una variante o fragmento de esta) 2do epítopo: ALSTASDDR (o una variante o fragmento de esta)
25	11 9	1er epítopo: QDASDDGSGS (o una variante o fragmento de esta) 2do epítopo: ALSTASDDR (o una variante o fragmento de esta)
	7 10	1er epítopo: TQNARAFRD (o una variante o fragmento de esta) 2do epítopo: PRERPP (o una variante o fragmento de esta)
30	8 10	1er epítopo: TQNARA (o una variante o fragmento de esta) 2do epítopo: PRERPP (o una variante o fragmento de esta)
	11 10	1er epítopo: QDASDDGSGS (o una variante o fragmento de esta) 2do epítopo: PRERPP (o una variante o fragmento de esta)
35	7 11	1er epítopo: TQNARAFRD (o una variante o fragmento de esta) 2do epítopo: QDASDDGSGS (o una variante o fragmento de esta)
	8 11	1er epítopo: TQNARA (o una variante o fragmento de esta) 2do epítopo: QDASDDGSGS (o una variante o fragmento de esta)
40	1 10 11	1er epítopo: KVPNQGGPPEEK (o una variante o fragmento de esta) 2do epítopo: PRERPP (o una variante o fragmento de esta) 3er epítopo: QDASDDGSGS (o una variante o fragmento de esta)
	6 10 11	1er epítopo: KVPNQGGPGP (o una variante o fragmento de esta) 2do epítopo: PRERPP (o una variante o fragmento de esta) 3er epítopo: QDASDDGSGS (o una variante o fragmento de esta)
45	4 10 11	1er epítopo: NPQGGPPEE (o una variante o fragmento de esta) 2do epítopo: PRERPP (o una variante o fragmento de esta) 3er epítopo: QDASDDGSGS (o una variante o fragmento de esta)
	3 10 11	1er epítopo: VNPQGGPPEE (o una variante o fragmento de esta) 2do epítopo: PRERPP (o una variante o fragmento de esta) 3er epítopo: QDASDDGSGS (o una variante o fragmento de esta)
50	2 10 11	1er epítopo: VNPQGGPPEEK (o una variante o fragmento de esta) 2do epítopo: PRERPP (o una variante o fragmento de esta) 3er epítopo: QDASDDGSGS (o una variante o fragmento de esta)
	5 10 11	1er epítopo: KVPNQGGPGE (o una variante o fragmento de esta) 2do epítopo: PRERPP (o una variante o fragmento de esta) 3er epítopo: QDASDDGSGS (o una variante o fragmento de esta)
55	1 10 11	1er epítopo: KVPNQGGPPEEK (o una variante o fragmento de esta) 2do epítopo: PRERPP (o una variante o fragmento de esta) 3er epítopo: QDASDDGSGS (o una variante o fragmento de esta)
60	1 10 11	1er epítopo: KVPNQGGPPEEK (o una variante o fragmento de esta) 2do epítopo: PRERPP (o una variante o fragmento de esta) 3er epítopo: QDASDDGSGS (o una variante o fragmento de esta)
65		

Una combinación de epítomos puede comprender el antígeno prostático específico (PSA), también conocido como gamma-seminoproteína o calicreína-3 (KLK3). En consecuencia, una combinación de epítomos puede comprender uno cualquiera de los epítomos enumerados en la Tabla 1 o la Tabla 2 en combinación con PSA, o una cualquiera de las combinaciones de epítomos enumeradas en la Tabla 3 combinadas, además, con PSA.

- 5
- Variantes
- En la presente descripción se proporcionan variantes de los epítomos de GPC-1.
- 10 Las variantes pueden comprender sustituciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras, como conocen los expertos en la técnica.
- En algunas modalidades, una variante de un epítomo de la presente invención puede tener un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos que son los mismos (porcentaje de "identidad de secuencia"), sobre una región especificada, o, cuando no se especifica, sobre toda la secuencia. En consecuencia, una "variante" de un epítomo de GPC-1 descrito en la presente descripción puede compartir al menos 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 83 %, 85 %, 88 %, 90 %, 93 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad de secuencia con la secuencia de un epítomo de GPC-1 descrito en la presente descripción.
- 15
- 20 La variante puede retener una actividad biológica idéntica, sustancialmente idéntica o alterada en comparación con la secuencia del epítomo de GPC-1 de la que surge la variante.
- La variante puede ser un epítomo de GPC-1 homólogo de una familia, género o especie diferente que tiene una función o actividad biológica idéntica o sustancialmente idéntica a la secuencia del epítomo de GPC-1 de la que surge la variante (por ejemplo, las derivadas de otras especies de mamíferos).
- 25
- Las diferencias en la identidad de secuencia pueden surgir de sustituciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras y/o no conservadoras), inserciones y/o deleciones de aminoácidos. Una sustitución conservadora de aminoácidos se refiere a una sustitución o reemplazo de un aminoácido por otro aminoácido con propiedades similares dentro de una cadena polipeptídica, como conocen bien los expertos en la técnica. Por ejemplo, la sustitución del aminoácido cargado ácido glutámico (Glu) por el aminoácido cargado de forma similar ácido aspártico (Asp) sería una sustitución conservadora de aminoácidos.
- 30
- El porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias puede determinarse sin dificultad mediante el uso de métodos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias puede determinarse al comparar dos secuencias alineadas óptimamente sobre una ventana de comparación. La parte de la secuencia en la ventana de comparación puede, por ejemplo, comprender deleciones o adiciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (por ejemplo, una secuencia de epítomo de GPC-1 como se describe en la presente descripción), que no comprende deleciones o adiciones, para alinear las dos secuencias de manera óptima. A continuación, puede calcularse un porcentaje de identidad de secuencia mediante la determinación del número de posiciones en las que se presenta una base de ácido nucleico o residuo de aminoácido idéntico en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, dividir el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicar el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia.
- 35
- 40
- 45
- El nivel de identidad de secuencia puede medirse mediante el uso de un programa informático de análisis de secuencia (por ejemplo, Sequence Analysis Software Package, Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Ave., Madison, Wis. 53705). Este programa informático combina secuencias similares al asignar grados de homología a diversas sustituciones, deleciones y otras modificaciones. Otros ejemplos de programas informáticos adecuados para medir el grado de identidad de secuencia entre dos o más secuencias incluyen, pero no se limitan a, CLUSTAL en el programa PC/Gene (disponible en Intelligenetics, Mountain View, California); el programa ALIGN (versión 2.0) y GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA y TFASTA en el paquete de programa informático GCG Wisconsin Genetics, versión 10 (disponible en Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, California, EE. UU.).
- 50
- 55
- Con relación a las modalidades anteriores, lo que incluye las expuestas en las Tablas 1-3 anteriores, la Tabla 4 más abajo proporciona ejemplos adecuados y no limitantes de las variantes mencionadas.



Tabla 4: Ejemplos no limitantes de variantes de epítipo de GPC-1 de acuerdo con la presente invención

VARIANTE(S) ILUSTRATIVA(S) CON RESIDUO(S) SUSTITUIDO(S)												
SEQ ID NO	V	N	P	Q	G	P	G	P	E	E	E	K
SEQ ID NO: 1	K											
Variante 1	W, R, L, Y o F	H, P o D	R, K, W, S, H o N	Q	G	P	D, E, N, Q, K, R o A	M, A, I, K, R, Q, S, T o Y	cuálquier aminoácido	cuálquier aminoácido	cuálquier aminoácido	cuálquier aminoácido
Variante 2	cuálquier aminoácido	H	cuálquier aminoácido	N, M, T, S o R	G	A	G	A, D, C, E, Z, G, H, K, M, F, P, S, T, W o Y	cuálquier aminoácido	cuálquier aminoácido	cuálquier aminoácido	cuálquier aminoácido
Variante 3	cuálquier aminoácido	cuálquier aminoácido	cuálquier aminoácido	Y, A, E, V, M, F, L, I, T o R	A, S, T, H, W, Y, F, M	P	G	cuálquier aminoácido	E	Q, D, F, H o M	cuálquier aminoácido	cuálquier aminoácido
SEQ ID NO: 2	V	N	P	Q	G	P	G	P	E	E	E	K
Variante 1	V	H, P o D	R, K, W, S, H o N	Q	G	P	D, E, N, Q, K, R o A	M, A, I, K, R, Q, S, T o Y	cuálquier aminoácido	cuálquier aminoácido	cuálquier aminoácido	cuálquier aminoácido
Variante 2	cuálquier aminoácido	H	cuálquier aminoácido	N, M, T, S o R	G	A	G	A, D, C, E, Z, G, H, K, M, F, P, S, T, W o Y	cuálquier aminoácido	cuálquier aminoácido	cuálquier aminoácido	cuálquier aminoácido
Variante 3	cuálquier aminoácido	cuálquier aminoácido	cuálquier aminoácido	Y, A, E, V, M, F, L, I, T o R	A, S, T, H, W, Y, F, M	P	G	cuálquier aminoácido	E	Q, D, F, H o M	cuálquier aminoácido	cuálquier aminoácido
SEQ ID NO: 3	V	N	P	Q	G	P	G	P	E	E	E	
Variante 1	V	H, P o D	R, K, W, S, H o N	Q	G	P	D, E, N, Q, K, R o A	M, A, I, K, R, Q, S, T o Y	cuálquier aminoácido	cuálquier aminoácido	cuálquier aminoácido	cuálquier aminoácido
Variante 2	cuálquier aminoácido	H	cuálquier aminoácido	N, M, T, S o R	G	A	G	A, D, C, E, Z, G, H, K, M, F, P, S, T, W o Y	cuálquier aminoácido	cuálquier aminoácido	cuálquier aminoácido	cuálquier aminoácido
Variante 3	cuálquier aminoácido	cuálquier aminoácido	cuálquier aminoácido	Y, A, E, V, M, F, L, I, T o R	A, S, T, H, W, Y, F, M	P	G	cuálquier aminoácido	E	Q, D, F, H o M	cuálquier aminoácido	cuálquier aminoácido
SEQ ID NO: 4		N	P	Q	G	P	G	P	E	E	E	
Variante 1		H, P o D	R, K, W, S, H o N	Q	G	P	D, E, N, Q, K, R o A	M, A, I, K, R, Q, S, T o Y	cuálquier aminoácido	cuálquier aminoácido	cuálquier aminoácido	cuálquier aminoácido

Variante 2			H	cualquier aminoácido	N, M, T, S o R	G	A	G	A, D, C, E, Z, G, H, K, M, F, P, S, T, W o Y	E	cualquier aminoácido	
Variante 3			cualquier aminoácido	cualquier aminoácido	Y, A, E, V, M, F, L, I, T o R	A, S, T, H, W, Y, F, M	P	G	cualquier aminoácido	E	Q, D, F, H o M	
SEQ ID NO: 5	V	K	N	P	Q	G	P	G	P	E		
Variante 1	V	W, R, L, Y o F	H, P o D	R, K, W, S, H o N	Q	G	P	D, E, N, Q, K, R o A	M, A, I, K, R, Q, S, T o Y	cualquier aminoácido		
Variante 2		cualquier aminoácido	H	cualquier aminoácido	N, M, T, S o R	G	A	G	A, D, C, E, Z, G, H, K, M, F, P, S, T, W o Y	E		
Variante 3		cualquier aminoácido	cualquier aminoácido	cualquier aminoácido	Y, A, E, V, M, F, L, I, T o R	A, S, T, H, W, Y, F, M	P	G	cualquier aminoácido	E		
SEQ ID NO: 6	V	K	N	P	Q	G	P	G	P	E		
Variante 1	V	W, R, L, Y o F	H, P o D	R, K, W, S, H o N	Q	G	P	D, E, N, Q, K, R o A	M, A, I, K, R, Q, S, T o Y			
Variante 2		cualquier aminoácido	H	cualquier aminoácido	N, M, T, S o R	G	A	G	A, D, C, E, Z, G, H, K, M, F, P, S, T, W o Y			
Variante 3		cualquier aminoácido	cualquier aminoácido	cualquier aminoácido	Y, A, E, V, M, F, L, I, T o R	A, S, T, H, W, Y, F, M	P	G	cualquier aminoácido			
SEQ ID NO: 7	Q	T	N	A	R	A	F	R	D			
Variante	CON	CON	CON	CON	CON	CON	CON	CON	CON			
SEQ ID NO: 8	Q	T	N	A	R	A	CON	CON	CON			
Variante	CON	CON	CON	CON	CON	CON	CON	CON	CON			
SEQ ID NO: 9	L	A	S	T	A	S	D	D	R			
Variante	CON	CON	CON	CON	CON	CON	CON	CON	CON			
SEQ ID NO: 10	R	P	E	R	P	P						
Variante	CON	CON	CON	CON	CON	CON	CON	CON	CON			

SEQ ID NO: 11	Q	D	A	S	D	D	G	S	G	S			
Variante	CON	CON	CON	CON	CON	CON	CON	CON	CON	CON			
SEQ ID NO: 12	C	G	E	L	Y	T	Q	N	A	R	A	F	
Variante	CON	CON	CON	CON	CON	CON	CON	CON	CON	CON	CON	CON	CON
(continuación)	R	D	L	C	G	N	P	K	V	N	P	Q	
Variante	CON	CON	CON	CON	CON	CON	CON	CON	CON	CON	CON	CON	CON
(continuación)	G	P	G	P	E	E	K	R	R	R	G	C	
Variante	CON	CON	CON	CON	CON	CON	CON	CON	CON	CON	CON	CON	CON
SEQ ID NO: 13	L	G	P	E	C	S	R	A	V	M	K		
Variante	CON	CON	CON	CON	CON	CON	CON	CON	CON	CON	CON	CON	CON

'Cualquier aminoácido' - A (ala), R (arg), N (asn), D (asp), B (asx), C (cys), E (glu), Q (gln), Z (glx), G (gly), H (his), I (ile), L (leu), K (lys), M (met), F (phe), P (pro), S (ser), T (thr), W (trp), Y (tyr) o V (val);

'CON' - sustitución conservadora de aminoácidos

- 5 En consecuencia, una variante de KVNPQGPGPEEK (SEQ ID NO: 1) puede comprender V (val) en la posición 2, Q (gln) en la posición 5, G (gly) en la posición 6 y P (pro) en la posición 7. La variante puede comprender, además, K (lys) en la posición 1, y/o N (asn) en la posición 3, y/o P (pro) en la posición 4. Adicional o alternativamente, la variante puede comprender, además, G (gly) en la posición 8, y/o P (pro) en la posición 9, y/o E (glu) en la posición 10. Adicional o alternativamente, la variante puede comprender uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho residuos sustituidos. El(los) residuo(s) de aminoácido(s) sustituido(s) puede(n) estar en una cualquiera o más de las posiciones 1, 3, 4, 8, 9, 10, 11 y/o 12 de la SEQ ID NO: 1.
- 10 Alternativamente, una variante de KVNPQGPGPEEK (SEQ ID NO: 1) puede comprender G (gly) en la posición 6, G (gly) en la posición 8 y E (glu) en la posición 10. La variante puede comprender, además, N (asn) en la posición 3, y/o Q (gln) en la posición 5, y/o P (pro) en la posición 7. Adicional o alternativamente, la variante puede comprender uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve residuos sustituidos. El(los) residuo(s) de aminoácido(s) sustituido(s) puede(n) estar en una cualquiera o más de las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 11 y/o 12 de la SEQ ID NO: 1.
- 15 Alternativamente, una variante de KVNPQGPGPEEK (SEQ ID NO: 1) puede comprender P (pro) en la posición 7, G (gly) en la posición 8 y E (glu) en la posición 10. La variante puede comprender, además, Q (gln) en la posición 5, y/o G (gly) en la posición 6, y/o E (glu) en la posición 11. Adicional o alternativamente, la variante puede comprender uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve residuos sustituidos. El(los) residuo(s) de aminoácido(s) sustituido(s) puede(n) estar en una cualquiera o más de las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 11 y/o 12 de la SEQ ID NO: 1.
- 20 Una variante de VNPQGPGPEEK (SEQ ID NO: 2) puede comprender V (val) en la posición 1, Q (gln) en la posición 4, G (gly) en la posición 5 y P (pro) en la posición 6. La variante puede comprender, además, N (asn) en la posición 2 y/o P (pro) en la posición 3. Adicional o alternativamente, la variante puede comprender, además, G (gly) en la posición 7, y/o P (pro) en la posición 8, y/o E (glu) en la posición 9. Adicional o alternativamente, la variante puede comprender uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete residuos sustituidos. El(los) residuo(s) de aminoácido(s) sustituido(s) puede(n) estar en una cualquiera o más de las posiciones 2, 3, 7, 8, 9, 10 y/o 11 de la SEQ ID NO: 2.
- 25 Alternativamente, una variante de VNPQGPGPEEK (SEQ ID NO: 2) puede comprender G (gly) en la posición 5, G (gly) en la posición 7 y E (glu) en la posición 9. La variante puede comprender, además, N (asn) en la posición 2, y/o Q (gln) en la posición 4, y/o P (pro) en la posición 6. Adicional o alternativamente, la variante puede comprender uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho residuos sustituidos. El(los) residuo(s) de aminoácido(s) sustituido(s) puede(n) estar en cualquiera de las posiciones 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 y/o 11 de la SEQ ID NO: 2.
- 30 Alternativamente, una variante de VNPQGPGPEEK (SEQ ID NO: 2) puede comprender P (pro) en la posición 6, G (gly) en la posición 7 y E (glu) en la posición 9. La variante puede comprender, además, Q (gln) en la posición 4, y/o G (gly) en la posición 5, y/o E (glu) en la posición 10. Adicional o alternativamente, la variante puede comprender uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho residuos sustituidos. El(los) residuo(s) de aminoácido(s) sustituido(s) puede(n) estar en una o más de las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10 y/o 11 de la SEQ ID NO: 2.
- 35 Una variante de VNPQGPGPEE (SEQ ID NO: 3) puede comprender V (val) en la posición 1, Q (gln) en la posición 4, G (gly) en la posición 5 y P (pro) en la posición 6. La variante puede comprender, además, N (asn) en la posición 2, y/o P (pro) en la posición 3. Adicional o alternativamente, la variante puede comprender, además, G (gly) en la posición 7, y/o P (pro) en la posición 8, y/o E (glu) en la posición 9. Adicional o alternativamente, la variante puede comprender uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis residuos sustituidos. El(los) residuo(s) de aminoácido(s) sustituido(s) puede(n) estar en una cualquiera o más de las posiciones 2, 3, 7, 8, 9 y/o 10 de la SEQ ID NO: 3.
- 40 Alternativamente, una variante de VNPQGPGPEE (SEQ ID NO: 3) puede comprender G (gly) en la posición 5, G (gly) en la posición 7, y E (glu) en la posición 9. La variante puede comprender, además, N (asn) en la posición 2, y/o Q (gln) en la posición 4, y/o P (pro) en la posición 6. Adicional o alternativamente, la variante puede comprender uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete residuos sustituidos. El(los) residuo(s) de aminoácido(s) sustituido(s) puede(n) estar en una cualquiera o más de las posiciones 1, 2, 3, 4, 6, 8 y/o 10 de la SEQ ID NO: 3.
- 45 Alternativamente, una variante de VNPQGPGPEE (SEQ ID NO: 3) puede comprender P (pro) en la posición 6, G (gly) en la posición 7, y E (glu) en la posición 9. La variante puede comprender, además, Q (gln) en la posición 4, y/o G (gly) en la posición 5, y/o E (glu) en la posición 10. Adicional o alternativamente, la variante puede comprender uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete residuos sustituidos. El(los) residuo(s) de aminoácido(s) sustituido(s) puede(n) estar en una cualquiera o más de las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 8 y/o 10 de la SEQ ID NO: 3.
- 50 Una variante de NPQGPGPEE (SEQ ID NO: 4) puede comprender Q (gln) en la posición 3, G (gly) en la posición 4 y P (pro) en la posición 5. La variante puede comprender, además, N (asn) en la posición 1, y/o P (pro) en la posición 2. Adicional o alternativamente, la variante puede comprender, además, G (gly) en la posición 6, y/o P (pro) en la posición 7, y/o E (glu) en la posición 8. Adicional o alternativamente, la variante puede comprender uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis residuos sustituidos. El(los) residuo(s) de aminoácido(s) sustituido(s) puede(n) estar en una cualquiera o más de las posiciones 1, 2, 6, 7, 8 y/o 9 de la SEQ ID NO: 4.
- 55
- 60
- 65

Alternativamente, una variante de NPQGPGPEE (SEQ ID NO: 4) puede comprender G (gly) en la posición 4, G (gly) en la posición 6, y E (glu) en la posición 8. La variante puede comprender, además, N (asn) en la posición 1, y/o Q (gln) en la posición 3, y/o P (pro) en la posición 5. Adicional o alternativamente, la variante puede comprender uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis residuos sustituidos. El(los) residuo(s) de aminoácido(s) sustituido(s) puede(n) estar en una cualquiera o más de las posiciones 1, 2, 3, 5, 7 y/o 9 de la SEQ ID NO: 4.

Alternativamente, una variante de NPQGPGPEE (SEQ ID NO: 4) puede comprender P (pro) en la posición 5, G (gly) en la posición 6 y E (glu) en la posición 8. La variante puede comprender, además, Q (gln) en la posición 3, y/o G (gly) en la posición 4, y/o E (glu) en la posición 9. Adicional o alternativamente, la variante puede comprender uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis residuos sustituidos. El(los) residuo(s) de aminoácido(s) sustituido(s) puede(n) estar en una cualquiera o más de las posiciones 1, 2, 3, 4, 7 y/o 9 de la SEQ ID NO: 4.

Una variante de KVNPGQGPGE (SEQ ID NO: 5) puede comprender V (val) en la posición 2, Q (gln) en la posición 5, G (gly) en la posición 6 y P (pro) en la posición 7. La variante puede comprender, además, K (lys) en la posición 1, y/o N (asn) en la posición 3, y/o P (pro) en la posición 4. Adicional o alternativamente, la variante puede comprender, además, G (gly) en la posición 8, y/o P (pro) en la posición 9, y/o E (glu) en la posición 10. Adicional o alternativamente, la variante puede comprender uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis residuos sustituidos. El(los) residuo(s) de aminoácido(s) sustituido(s) puede(n) estar en una cualquiera o más de las posiciones 1, 3, 4, 8, 9 y/o 10 de la SEQ ID NO: 5.

Alternativamente, una variante de KVNPGQGPGE (SEQ ID NO: 5) puede comprender G (gly) en la posición 6, G (gly) en la posición 8 y E (glu) en la posición 10. La variante puede comprender, además, N (asn) en la posición 3, y/o Q (gln) en la posición 5, y/o P (pro) en la posición 7. Adicional o alternativamente, la variante puede comprender uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete residuos sustituidos. El(los) residuo(s) de aminoácido(s) sustituido(s) puede(n) estar en una cualquiera o más de las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 7 y/o 9 de la SEQ ID NO: 5.

Alternativamente, una variante de KVNPGQGPGE (SEQ ID NO: 5) puede comprender P (pro) en la posición 7, G (gly) en la posición 8 y E (glu) en la posición 10. La variante puede comprender, además, Q (gln) en la posición 5, y/o G (gly) en la posición 6. Adicional o alternativamente, la variante puede comprender uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete residuos sustituidos. El(los) residuo(s) de aminoácido(s) sustituido(s) puede(n) estar en una cualquiera o más de las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6 y/o 9 de la SEQ ID NO: 5.

Una variante de KVNPGQGP (SEQ ID NO: 6) puede comprender V (val) en la posición 2, Q (gln) en la posición 5, G (gly) en la posición 6 y P (pro) en la posición 7. La variante puede comprender, además, K (lys) en la posición 1, y/o N (asn) en la posición 3, y/o P (pro) en la posición 4. Adicional o alternativamente, la variante puede comprender, además, G (gly) en la posición 8, y/o P (pro) en la posición 9. Adicional o alternativamente, la variante puede comprender uno, dos, tres, cuatro o cinco residuos sustituidos. El(los) residuo(s) de aminoácido(s) sustituido(s) puede(n) estar en una cualquiera o más de las posiciones 1, 3, 4, 8 y/o 9 de la SEQ ID NO: 6.

Una variante de KVNPGQGP (SEQ ID NO: 6) puede comprender G (gly) en la posición 6 y G (gly) en la posición 8. La variante puede comprender, además, N (asn) en la posición 3, y/o Q (gln) en la posición 5, y/o P (pro) en la posición 7. Adicional o alternativamente, la variante puede comprender uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete residuos sustituidos. El(los) residuo(s) de aminoácido(s) sustituido(s) puede(n) estar en una cualquiera o más de las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 7 y/o 9 de la SEQ ID NO: 6.

Una variante de KVNPGQGP (SEQ ID NO: 6) puede comprender P (pro) en la posición 7 y G (gly) en la posición 8. La variante puede comprender, además, Q (gln) en la posición 5, y/o G (gly) en la posición 6. Adicional o alternativamente, la variante puede comprender uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete residuos sustituidos. El(los) residuo(s) de aminoácido(s) sustituido(s) puede(n) estar en una o más de las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6 y/o 9 de la SEQ ID NO: 6. Una variante de uno cualquiera de los epítomos de la presente invención como se establece en las SEQ ID NO.: 7-13 puede comprender una sustitución de aminoácidos en una o más posiciones de la secuencia del epítomo. La sustitución de aminoácidos puede ser una sustitución de aminoácidos conservadora o una sustitución de aminoácidos no conservadora, como conocen los expertos en la técnica. Las variantes pueden comprender solo sustituciones conservadoras, solo sustituciones no conservadoras o una mezcla de sustituciones conservadoras y sustituciones no conservadoras.

– Fragmentos

En la presente descripción se proporcionan fragmentos de los epítomos de GPC-1 y variantes de estos.

En algunas modalidades, un fragmento de un epítomo de la presente invención puede comprender o consistir en 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos. En consecuencia, un fragmento de un epítomo de acuerdo con la presente invención puede comprender o consistir en, por ejemplo, entre 5 y 10, entre 5 y 15, entre 5 y 20, entre 10 y 20, entre 10 y 15, entre 7 y 15, entre 7 y 13, entre 8 y 12, entre 8 y 10, entre 11 y 19, entre 12 y 18, o entre 13 y 17 aminoácidos de longitud. En general, un fragmento de un epítomo de GPC-1 completo descrito en la presente

## ES 2 805 085 T3

descripción puede poseer propiedades inmunológicas similares o en algunos casos mejoradas en comparación con el epítipo de GPC-1 completo.

5 Con relación a las modalidades anteriores, lo que incluye las expuestas en las Tablas 1-4 anteriores, la Tabla 5 más abajo proporciona ejemplos adecuados y no limitantes de los fragmentos a los que se hace referencia.

Tabla 5: Ejemplos no limitantes de fragmentos de epítipos de GPC-1 de acuerdo con la presente invención

SEQ ID NO	SECUENCIA	FRAGMENTOS ILUSTRATIVOS
10 1	SEQ ID NO: 1 KVNPQGGPPEEK (o una variante de esta como se describe en la presente descripción)	residuos 1-11, 1-10, 1-9, 1-8, 2-12,2-11, 2-10, 2-9, 2-8, 3-12, 3-11,3-10, 3-9, 3-8, 4-12, 4-11, 4-10, 4-9 o 4-8
15 2	SEQ ID NO: 2 VNPQGGPPEEK (o una variante de esta como se describe en la presente descripción)	residuos 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 2-11, 2-10, 2-9, 2-8, 2-7, 3-11, 3-10, 3-9, 3-8 o 3-7
20 3	SEQ ID NO: 3 VNPQGGPPEE (o una variante de esta como se describe en la presente descripción)	residuos 1-9, 1-8,1-7, 2-10,2-9,2-8, 2-7, 3-10, 3-9, 3-8 o 3-7
25 4	SEQ ID NO: 4 NPQGGPPEE (o una variante de esta como se describe en la presente descripción)	residuos 1-8, 1-7, 1-6, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 3-9, 3-8 o 3-7
30 5	SEQ ID NO: 5 KVNPQGGPGE (o una variante de esta como se describe en la presente descripción)	residuos 1-9, 1-8, 1-7, 2-10, 2-9, 2-8, 2-7, 3-10, 3-9, 3-8 o 3-7
35 6	SEQ ID NO: 6 KVNPQGGGP (o una variante de esta como se describe en la presente descripción)	residuos 1-8, 1-7, 1-6, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 3-9, 3-8 o 3-7
40 7	SEQ ID NO: 7 TQNARAFRD (o una variante de esta como se describe en la presente descripción)	residuos 1-8, 1-7, 1-6, 2-9, 2-8, 2-7, 3-9, 3-8 o 3-7
45 8	SEQ ID NO: 8 TQNARA (o una variante de esta como se describe en la presente descripción)	residuos 1-5, 1-4, 2-6 o 2-5
50 9	SEQ ID NO: 9 ALSTASDDR (o una variante de esta como se describe en la presente descripción)	residuos 1-8, 1-7, 1-6, 2-9, 2-8, 2-7, 3-9, 3-8 o 3-7
55 10	SEQ ID NO: 10 PRERPP (o una variante de esta como se describe en la presente descripción)	residuos 1-5, 1-4, 2-6 o 2-5
60 11	SEQ ID NO: 11 QDASDDGSGS (o una variante de esta como se describe en la presente descripción)	residuos 1-9, 1-8, 1-7, 2-10, 2-9, 2-8, 3-10, 3-9 o 3-8
65 12	SEQ ID NO: 12 CGELYTQNARAFRDLCGNPKVNPQGGPPEEKRRGC (o una variante de esta como se describe en la presente descripción)	1-residuos 1-35, 1-34, 1-33, 1-32, 1-31, 1-30, 1-29, 28, 1-27, 1-26, 1-25, 2-36, 2-35, 2-34, 2-33, 2-32, 2-31, 2-30, 2-29, 2-28, 2-27, 2-26, 2-25, 3-36, 3-35, 3-34, 3-33, 3-32, 3-31, 3-30, 3-29, 3-28, 3-27, 3-26, 3-25, 4-36, 4-35, 4-34, 4-33, 4-32, 4-31, 4-30, 4-29, 4-28, 4-27, 4-26, 4-25, 5-36, 5-35, 5-34, 5-33, 5-32, 5-31, 5-30, 5-29, 5-28, 5-27, 5-26, 5-25, 6-36, 6-35, 6-34, 6-33, 6-32, 6-31, 6-30, 6-29, 6-28, 6-27, 6-26, 6-25, 7-36, 7-35, 7-34, 7-33, 7-32, 7-31, 7-30, 7-29, 7-28, 7-27, 7-26, 7-25, 8-36, 8-35, 8-34, 8-33, 8-32, 8-31, 8-30, 8-29, 8-28, 8-27, 8-26, 8-25, 9-36, 9-35, 9-34, 9-33, 9-32, 9-31, 9-30, 9-29, 9-28, 9-27, 9-26, 9-25, 10-36, 10-35, 10-34, 10-33, 10-32, 10-31, 10-30, 10-29, 10-28, 10-27, 10-26 o 10-25
70 13	SEQ ID NO: 13 LGPECSRAVMK (o una variante de esta como se describe en la presente descripción)	residuos 1-10, 1-9, 1-8, 1-7, 2-11, 2-10, 2-9, 2-8, 2-7, 3-11, 3-10, 3-9, 3-8 o 3-7

– Polipéptidos de fusión

Ciertas modalidades de la presente invención proporcionan epítomos de GPC-1 en forma de polipéptidos de fusión. Por ejemplo, dos o más epítomos completos seleccionados de la Tabla 1, dos o más segmentos de epítomos seleccionados de la Tabla 2, una combinación de dos o más epítomos completos seleccionados de la Tabla 3, o una combinación de un epítomo completo de la Tabla 1 y uno cualquiera o más segmentos de epítomos seleccionados de la Tabla 2, pueden unirse para formar los polipéptidos de fusión.

Los polipéptidos de fusión pueden prepararse mediante el uso de técnicas estándar conocidas por los expertos en la técnica, lo que incluye, por ejemplo, conjugación química. Los polipéptidos de fusión pueden expresarse, además, como un polipéptido recombinante en un sistema de expresión. Por ejemplo, las secuencias de ADN que codifican los componentes polipeptídicos del polipéptido de fusión pueden ensamblarse por separado y enlazarse en un vector de expresión apropiado. El extremo 3' de la secuencia de ADN que codifica un componente polipeptídico puede enlazarse, con o sin un enlazador peptídico, al extremo 5' de una secuencia de ADN que codifica el segundo componente polipeptídico para que los marcos de lectura de las secuencias estén en marco. Esto puede permitir la traducción en un único polipéptido de fusión que retiene la actividad biológica de ambos componentes polipeptídicos.

Puede emplearse una secuencia enlazadora para separar el primer y el segundo componente polipeptídico de la proteína de fusión mediante una distancia suficiente para asegurar que cada componente polipeptídico se pliegue en estructuras secundarias y/o terciarias apropiadas. Los ejemplos no limitantes de enlazadores adecuados incluyen péptidos/polipéptidos, cadenas de alquilo u otras moléculas espaciadoras convenientes como conocen los expertos en la técnica. Las secuencias enlazadoras de péptidos adecuadas pueden seleccionarse de acuerdo con factores que incluyen la capacidad de adoptar una conformación extendida flexible, la incapacidad de adoptar una estructura secundaria que podría interactuar con epítomo(s) funcional(es) en los componentes polipeptídicos de los polipéptidos de fusión, y/o una falta de residuos hidrófobos y/o cargados que puedan reaccionar con epítomo(s) funcional(es) en los componentes polipeptídicos del polipéptido de fusión.

A manera de ejemplo no limitante solamente, las secuencias enlazadoras de péptidos pueden contener residuos Gly, Asn y/o Ser. Adicional o alternativamente, también pueden usarse en las secuencias enlazadoras de péptidos otros aminoácidos casi neutros tales como Thr y Ala. Otros ejemplos de secuencias de aminoácidos que pueden emplearse útilmente como enlazadoras incluyen las descritas en la patente de Estados Unidos núm. 4,935,233; patente de Estados Unidos núm. 4,751,180; Murphy y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8258-8262, 1986; y Maratea y otros, Gene 40:39-46, 1985). La secuencia enlazadora puede ser generalmente de 1 a aproximadamente 50 aminoácidos de longitud. En consecuencia, las secuencias enlazadoras pueden ser de 5, 10, 15, 20, 30, 40, entre 10 y 50, entre 10 y 40, entre 10 y 30, entre 20 y 30, entre 1 y 5, o entre 5 y 10 aminoácidos de longitud. Los polipéptidos de fusión de acuerdo con la presente invención pueden no requerir una secuencia enlazadora si los componentes polipeptídicos primero y segundo del polipéptido de fusión tienen regiones de aminoácidos N-terminales no esenciales que pueden usarse para separar los dominios funcionales y prevenir la interferencia estérica.

– Polinucleótidos, vectores y células huésped

La presente invención proporciona, además, polinucleótidos que codifican los epítomos de GPC-1 de la presente invención, segmentos de los epítomos de GPC-1 y proteínas de fusión que comprenden epítomos de GPC-1 y/o segmentos de estos.

Los polinucleótidos pueden clonarse en un vector. El vector puede comprender, por ejemplo, una secuencia de ADN, ARN o ADN complementario (ADNc) que codifica los epítomos de GPC-1, segmento(s) del epítomo GPC-1 y/o proteínas de fusión. El vector puede ser un vector plasmídico, un vector viral o cualquier otro vehículo adecuado adaptado para la inserción de secuencias extrañas, su introducción en las células y la expresión de las secuencias introducidas. Típicamente, el vector es un vector de expresión y puede incluir secuencias de procesamiento y de control de la expresión tales como un promotor, un potenciador, sitios de unión al ribosoma, señales de poliadenilación y secuencias de terminación de la transcripción.

En la presente descripción se describen, además, células huésped transformadas por dichos vectores. Por ejemplo, los polinucleótidos de la invención pueden clonarse en un vector que se transforma en una célula huésped bacteriana, por ejemplo, *E. coli*.

Los métodos para la construcción de vectores y su transformación en células huésped se conocen generalmente en la técnica, y se describen, por ejemplo, en Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2da ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, Nueva York, y, Ausubel F.M. y otros. (Eds) Current Protocols in Molecular Biology (2007), John Wiley and Sons, Inc.

– Producción

5 Los epítomos de GPC-1 de la presente invención, los segmentos de los epítomos de GPC-1 y las proteínas de fusión que comprenden los epítomos de GPC-1 y/o segmentos de estos pueden fabricarse de acuerdo con metodologías estándar bien conocidas por los expertos en la técnica.

10 Los epítomos, segmentos y proteínas de fusión pueden prepararse mediante el uso de cualquiera de una variedad de técnicas sintéticas y/o recombinantes bien conocidas. Los polipéptidos pueden, por ejemplo, generarse por medios sintéticos mediante el uso de metodologías bien conocidas por los expertos en la técnica. En un ejemplo no limitante, pueden usarse técnicas de fase sólida disponibles comercialmente (por ejemplo, el método de síntesis de fase sólida Merrifield) en el que los aminoácidos se añaden secuencialmente a una cadena de aminoácidos en crecimiento (Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85:2149-2146, 1963). El equipo para la síntesis automatizada de los epítomos, segmentos y proteínas de fusión descritos en la presente descripción está disponible comercialmente (por ejemplo, Perkin Elmer/Applied BioSystems Division (Foster City, California)), y puede usarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

20 Adicional o alternativamente, los epítomos, segmentos y proteínas de fusión pueden producirse mediante cualquier otro método disponible para un experto en la técnica. Por ejemplo, pueden usarse medios recombinantes en los que los ácidos nucleicos que codifican el(los) epítomo(s), segmento(s) y/o proteína(s) de fusión seleccionado(s) pueden insertarse en un vector de expresión mediante el uso de cualquiera de una variedad de procedimientos conocidos en la técnica (por ejemplo, Sambrook y otros, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2da ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Sambrook y Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ra edición (15 de enero de 2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN: 0879695765; Ausubel y otros, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates y Wiley Interscience, NY (1989)). La construcción de vectores de expresión adecuados que contienen ácidos nucleicos que codifican epítomo(s), segmento(s) y/o proteína(s) de fusión seleccionado(s) emplea técnicas de ligamiento estándar conocidas por los expertos en la técnica.

30 Las secuencias de ácido nucleico ligadas pueden unirse operativamente a elementos reguladores transcripcionales o traduccionales adecuados que faciliten la expresión del(de los) epítomo(s), segmento(s) y/o proteína(s) de fusión. Los elementos reguladores responsables de la expresión de proteínas pueden ubicarse en dirección 5' con respecto a la región codificante para el polipéptido. Los codones de parada que finalizan las señales de traducción y terminación de la transcripción pueden estar presentes en dirección 3' en la secuencia de ácido nucleico que codifica el(los) epítomo(s), segmento(s) y/o proteína(s) de fusión. Después de la construcción de un ácido nucleico que codifica el(los) polipéptido(s) de interés con los elementos reguladores unidos operativamente, el casete de expresión resultante puede introducirse en una célula huésped y puede(n) expresarse el(los) polipéptido(s) codificado(s).

40 De acuerdo con la presente invención, los epítomos de GPC-1, los segmentos de los epítomos de GPC-1 y las proteínas de fusión que comprenden los epítomos de GPC-1 y/o segmentos de estos, están "aislados". Un polipéptido "aislado" es uno que se extrae de su entorno original. Por ejemplo, una proteína o polipéptido de origen natural al que se hace referencia en la presente descripción se considera aislado si se separa de algunos o todos los materiales que coexisten en el sistema natural. Los polipéptidos aislados a los que se hace referencia en la presente descripción también pueden purificarse. Por ejemplo, los polipéptidos aislados pueden ser al menos aproximadamente 90 % puros, al menos aproximadamente 95 % puros o al menos aproximadamente 99 % puros.

45 Los polinucleótidos y los ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención se conocen generalmente en la técnica y se describen, por ejemplo, en Ausubel F.M. y otros (Eds) Current Protocols in Molecular Biology (2007), John Wiley and Sons, Inc; Sambrook y otros (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2da ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, Nueva York; y Maniatis y otros, Molecular Cloning (1982), 280-281. Los polinucleótidos pueden prepararse, por ejemplo, mediante técnicas de síntesis química, por ejemplo, los métodos de fosfodiéster y fosfotriéster (ver, por ejemplo, Narang S.A. y otros (1979) Meth. Enzymol. 68:90; Brown, E.L. (1979) y otros, Meth. Enzymol. 68:109; y la Patente de Estados Unidos núm. 4356270), el método de dietilfosforamidita (ver Beaucage S.L. y otros (1981) Tetrahedron Letters, 22:1859-1862). Un método para sintetizar oligonucleótidos sobre un soporte sólido modificado se describe en la Patente de Estados Unidos núm. 4458066.

55 – Soportes

60 Los epítomos y los polipéptidos de fusión de acuerdo con la presente invención pueden unirse a un soporte. El soporte puede ser, por ejemplo, un material insoluble o una matriz que retiene el epítomo y lo excluye de moverse libremente en la masa de una mezcla de reacción. Los soportes adecuados para inmovilizar o localizar epítomos y polipéptidos de fusión se conocen bien por los expertos en la técnica. El soporte puede seleccionarse de una amplia variedad de matrices, polímeros y similares en una variedad de formas, lo que incluye perlas convenientes para su uso en microensayos, placas de plástico y vidrio con pocillos individuales, así como también otros materiales compatibles con las condiciones de reacción. En ciertas modalidades preferidas, el soporte puede ser un material plástico, tal como perlas plásticas u obleas, o el del pocillo o tubo en el que se realiza un ensayo particular (por ejemplo, un ELISA).

65



## Entidades de unión

En la presente descripción se describen entidades de unión capaces de unirse específicamente a los epítomos de GPC-1 descritos en la presente descripción.

La entidad de unión puede ser cualquier molécula capaz de unirse específicamente a un epítomo de GPC-1 como se describe en la presente descripción. Los ejemplos no limitantes de entidades de unión incluyen polipéptidos, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, improntas moleculares, lectinas y compuestos de captura. La entidad de unión puede ser un agente que puede unirse a un epítomo de GPC-1 de la presente invención o, alternativamente, a una región diferente de GPC-1, y también modificar una interacción de unión entre el epítomo y otra entidad de unión diferente tal como, por ejemplo, un anticuerpo como se describe en la presente descripción.

Las entidades de unión tales como los anticuerpos capaces de unirse específicamente a los epítomos de GPC-1 de la presente invención pueden unirse a un epítomo objetivo dado, a una combinación de segmentos de epítomo o a una combinación de epítomos, preferentemente, por encima de a otras moléculas no objetivo. Por ejemplo, si la entidad de unión ("molécula A") es capaz de "unirse específicamente" o "específicamente unirse" a un epítomo de GPC-1 objetivo dado ("molécula B"), la molécula A tiene la capacidad de discriminar entre la molécula B y cualquier otro número de parejas de unión alternativas potenciales. En consecuencia, cuando se expone a una pluralidad de moléculas diferentes pero igualmente accesibles como posibles parejas de unión, la molécula A se unirá selectivamente a la molécula B y otras posibles parejas de unión alternativas permanecerán sustancialmente sin unirse por la molécula A. En general, la molécula A se unirá, preferentemente, a la molécula B al menos 10 veces, preferentemente, 50 veces, con mayor preferencia, 100 veces, y con la máxima preferencia, más de 100 veces más frecuentemente que otras posibles parejas de unión. La molécula A puede ser capaz de unirse a moléculas que no son la molécula B a un nivel débil pero detectable. Esto se conoce comúnmente como unión de fondo y puede distinguirse fácilmente de la unión específica a la molécula B, por ejemplo, mediante el uso de un control apropiado.

En el conocimiento de los epítomos específicos de GPC-1 proporcionados en la presente descripción, los expertos en la técnica pueden generar entidades de unión sin esfuerzo inventivo. Por ejemplo, las preparaciones de anticuerpos policlonales y monoclonales que se unen específicamente a los epítomos de GPC-1 de la presente invención pueden prepararse mediante el uso de técnicas conocidas.

Cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpos mediante líneas celulares continuas en cultivo puede usarse en la preparación de anticuerpos monoclonales dirigidos hacia un epítomo de GPC-1 objetivo. La metodología general se describe en Harlow y Lane (eds.), (1988), "Antibodies-A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. Las metodologías específicas incluyen la técnica de hibridoma desarrollada originalmente por Kohler y otros, (1975), "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity", *Nature*, 256:495-497, así como también la técnica de trioma, la técnica de hibridoma de células B humanas (Kozbor y otros, (1983), "The Production of Monoclonal Antibodies from Human Lymphocytes", *Immunology Today*, 4:72-79), y la técnica de hibridoma EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole y otros, (1985), en "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", págs. 77-96, Alan R. Liss, Inc.). Las líneas celulares inmortales productoras de anticuerpos pueden crearse mediante técnicas distintas a la fusión, tales como la transformación directa de linfocitos B con ADN oncogénico o la transfección con el virus de Epstein-Barr (ver, por ejemplo, M. Schreier y otros, (1980), "Hybridoma Techniques", Cold Spring Harbor Laboratory; Hammerling y otros, (1981), "Monoclonal Antibodies and T-cell Hybridomas", Elsevier/North-Holland Biochemical Press, Amsterdam; Kennett y otros, (1980), "Monoclonal Antibodies", Plenum Press).

En resumen, un medio para producir un hibridoma a partir del cual se produce el anticuerpo monoclonal, un mieloma u otra línea celular autoperpetuante puede fusionarse con linfocitos obtenidos a partir del bazo de un mamífero hiperinmunizado con una porción de unión al factor de reconocimiento de este, o factor de reconocimiento, o una porción de unión a ADN específica de origen de este. Los hibridomas que producen un anticuerpo monoclonal capaz de unirse específicamente a un epítomo de GPC-1 de la presente invención se identifican por su capacidad de inmunorreaccionar con el(los) epítomo(s) presentados.

Puede producirse un anticuerpo monoclonal útil en la práctica de la invención al iniciar un cultivo de hibridoma monoclonal que comprende un medio nutriente que contiene un hibridoma que secreta moléculas de anticuerpo de la especificidad de antígeno apropiada. El cultivo se mantiene en condiciones y durante un período de tiempo suficiente para que el hibridoma secreta las moléculas de anticuerpo en el medio. A continuación, se recolecta el medio que contiene el anticuerpo. Las moléculas de anticuerpo pueden aislarse después mediante técnicas bien conocidas.

De manera similar, existen diversos procedimientos conocidos en la técnica que pueden usarse para la producción de anticuerpos policlonales. Para la producción de anticuerpos policlonales contra una combinación dada de epítomos de GPC-1, pueden inmunizarse diversos animales hospedadores mediante inyección con los epítomos, lo que incluye, pero no se limita a, conejos, pollos, ratones, ratas, ovejas, cabras, etcétera. Además, la molécula objetivo puede conjugarse con un portador inmunogénico (por ejemplo, albúmina de suero bovino (BSA) o hemocianina de lapa californiana (KLH)). Además, pueden usarse diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, lo que incluye, pero no se limita a, adyuvante de Freund (completos e incompletos), geles minerales tales como hidróxido de

aluminio, sustancias tensioactivas tales como risolectina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianinas de lapa californiana, dinitrofenol y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (bacilo Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*.

5 La detección del anticuerpo deseado puede lograrse mediante una variedad de técnicas conocidas en la técnica. Los ensayos adecuados para la unión inmuno-específica de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas), inmunoensayos sándwich, ensayos inmunoradiométricos, reacciones de precipitación por difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, inmunoensayos *in situ*, transferencias de Western, reacciones de precipitación, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del  
10 complemento, ensayos de inmunofluorescencia, ensayos de proteína A, ensayos de inmunoelectroforesis y similares (ver, por ejemplo, Ausubel y otros, (1994), "Current Protocols in Molecular Biology", Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York). La unión de anticuerpos puede detectarse en virtud de un marcador detectable sobre el anticuerpo primario. Alternativamente, el anticuerpo puede detectarse en virtud de su unión con un anticuerpo secundario o reactivo que se marca apropiadamente. Se conocen en la técnica una variedad de métodos para la detección de la  
15 unión en un inmunoensayo y se incluyen en el alcance de la presente invención.

Los anticuerpos (o fragmentos de estos) generados contra epítipo(s) de GPC-1 específicos de interés tienen afinidad de unión por el(los) epítipo(s). Preferentemente, los anticuerpos (o fragmentos de estos) tienen una afinidad o aidez de unión superior a aproximadamente  $10^5 \text{ M}^{-1}$ , con mayor preferencia, superior a aproximadamente  $10^6 \text{ M}^{-1}$ , aún con mayor preferencia, superior a aproximadamente  $10^7 \text{ M}^{-1}$  y, con la máxima preferencia, superior a aproximadamente  $10^8 \text{ M}^{-1}$ .

En términos de obtener una cantidad adecuada de un anticuerpo de acuerdo con la presente invención, puede(n) fabricarse el(los) anticuerpo(s) mediante el uso de fermentación discontinua con medio sin suero. Después de la  
25 fermentación, el anticuerpo puede purificarse mediante un procedimiento de varias etapas que incorpora cromatografía y etapas de inactivación/eliminación viral. Por ejemplo, el anticuerpo puede separarse primero por cromatografía de afinidad con proteína A y después tratarse con solvente/detergente para inactivar cualquier virus envuelto en lípidos. Puede usarse una purificación adicional, típicamente mediante cromatografía de intercambio aniónico y catiónico para eliminar proteínas residuales, solventes/detergentes y ácidos nucleicos. El anticuerpo purificado puede purificarse adicionalmente y formularse en solución salina al 0,9 % mediante el uso de columnas de  
30 filtración en gel. La preparación a granel formulada puede después esterilizarse, filtrarse para eliminar los virus y dispensarse.

Los ejemplos no limitantes de anticuerpos capaces de unirse a uno o múltiples epítopos de GPC-1 de la presente invención incluyen:

(i) anticuerpo MIL38 tal como se depositó bajo los términos del Tratado de Budapest en Cellbank Australia en 214 Hawkesbury Road, Westmead, NSW 2145, Australia el 22 de agosto de 2014 bajo el núm. de acceso CBA20140026;

(ii) anticuerpo anti-glicano 1/GPC1 (ab137604): un policlonal de conejo (IgG) específico para GPC-1 humano y disponible comercialmente en abcam® (ver: <http://www.abcam.com/glypican-1-gpc1-antibody-ab137604.html>);

(iii) MAB2600| anticuerpo anti-glicano-1, clon 4D1: un monoclonal de ratón (IgG<sub>k</sub>) específico para GPC-1 humano y de rata y disponible comercialmente en Millipore (ver: [http://www.emdmillipore.com/AU/en/product/MM\\_NF-MAB2600?cid=BI-XX-BRC-A-BIOC-ANTI-B033-1308](http://www.emdmillipore.com/AU/en/product/MM_NF-MAB2600?cid=BI-XX-BRC-A-BIOC-ANTI-B033-1308));

(iv) anticuerpo anti-glicano 1 de cabra (AA 24-530): un policlonal de cabra específico para GPC-1 humano y disponible comercialmente de LifeSpan BioSciences, Inc. (ver <https://www.lsbio.com/antibodies/anti-gpc1-antibody-glypican-antibody-aa24-530-icc-wb-western-flow-ls-c330760/341104>).

#### Composiciones y Kits

55 Las composiciones y kits descritos en la presente descripción comprenden:

- uno o más epítopos de GPC-1, variantes o fragmentos de estos como se describe en la presente descripción (por ejemplo, la Tabla 1); y/o
- 60 – uno o más segmentos de epítopos de GPC-1, variantes o fragmentos de estos como se describe en la presente descripción (por ejemplo, la Tabla 2); y/o
- una o más combinaciones de epítopos de GPC-1 como se describe en la presente descripción (por ejemplo, la Tabla 3); y/o

65

- una o más proteínas de fusión que comprenden epítipo(s) de GPC-1, segmento(s) de epítipos de GPC-1, y/o variantes o fragmentos de estos, como se describe en la presente descripción (ver la subsección anterior titulada "Polipéptidos de fusión"); y/o
- 5     – una o más entidades de unión como se describe en la presente descripción (ver la sección anterior titulada "Entidades de unión").

Las composiciones pueden comprender adicionalmente un portador, adyuvante y/o diluyente aceptable. Los portadores, diluyentes y adyuvantes pueden ser "aceptables" en términos de ser compatibles con los otros ingredientes de la composición, y/o "farmacéuticamente aceptables" en que en general no son perjudiciales para ningún receptor de estos. Los portadores, diluyentes y adyuvantes adecuados se conocen bien por los expertos en la técnica (ver, por ejemplo, Gilman y otros (Eds.) Goodman y Gilman: the pharmacological basis of therapeutics, 8va edición, Pergamon Press (1990); Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co.: Easton, Pa., 17ma Ed. (1985)). Las composiciones pueden, en algunas modalidades, usarse para fines de diagnóstico o investigación.

Los kits pueden ser kits fragmentados o combinados. Un "kit fragmentado" se refiere a un sistema de suministro que comprende dos o más recipientes separados que contienen cada uno una subporción del total de componentes del kit. Cualquier sistema de suministro que comprenda dos o más recipientes separados que contengan cada uno una subporción de los componentes totales del kit se incluye dentro del significado del término kit fragmentado. Un "kit combinado" se refiere a un sistema de suministro que contiene todos los componentes del kit en un solo recipiente (por ejemplo, en una sola caja que contiene cada uno de los componentes deseados). Los kits pueden, en algunas modalidades, usarse para fines de diagnóstico o investigación.

#### Métodos de diagnóstico

Los epítipos de GPC-1 de la presente invención, los segmentos de los epítipos de GPC-1 y las proteínas de fusión que comprenden los epítipos de GPC-1 y/o segmentos de estos, pueden usarse en métodos de diagnóstico. Específicamente, los presentes inventores han descubierto que el glipicano-1 es un nuevo marcador para el cáncer de próstata (solicitud de patente provisional de Estados Unidos núm. 61/928/776 titulada "Cell Surface Prostate Cancer Antigen for Diagnosis", Walsh y otros – no publicado).

En consecuencia, la presente invención proporciona métodos para el diagnóstico, pronóstico o probabilidad de desarrollar cáncer de próstata en sujetos basados en la detección de epítipo(s) de GPC-1, segmentos de epítipos de GPC-1 y/o variantes y fragmentos de los epítipos/segmentos de epítipos como se describe en la presente descripción. Adicional o alternativamente, las variantes y fragmentos de los epítipos de GPC-1 y/o fragmentos de epítipos de GPC-1 pueden detectarse en los métodos de diagnóstico.

En general, los métodos comprenden determinar el nivel de epítipo(s) de GPC-1 y/o segmentos de epítipos de GPC-1 en una muestra biológica de un sujeto a analizar. Adicional o alternativamente, el nivel de variante(s) y fragmento(s) de los epítipos de GPC-1 y/o segmentos de estos en la muestra biológica también puede determinarse al llevar a cabo los métodos. Los ejemplos no limitantes de epítipos de GPC-1, segmentos de epítipos de GPC-1 y variantes y fragmentos incluyen los mencionados en la sección titulada "Epítipos" (ver en particular las Tablas 1-3 y la descripción asociada de variantes y fragmentos).

Los métodos pueden comprender, además, determinar los niveles de antígeno prostático específico (PSA), también conocido como gamma-seminoproteína o calicreína-3 (KLK3), en la muestra biológica, y opcionalmente, comparar el nivel de PSA detectado con el de un control.

En algunas modalidades, el nivel de epítipo(s) de GPC-1, segmentos de epítipo de GPC-1, y/o variantes y fragmentos de los epítipos/segmentos de epítipos detectados en la muestra biológica del sujeto puede compararse con los niveles determinados como presentes en una muestra de control. Los niveles en la muestra de control pueden determinarse antes, durante o después de determinar el nivel presente en la muestra biológica del sujeto. A manera de ejemplo no limitante, los niveles presentes en la muestra de control pueden determinarse en base a los presentes en una muestra biológica equivalente de un individuo o en base a los niveles medios presentes en muestras biológicas a partir de una población de individuos. Es posible que se haya determinado que el individuo o los individuos no tienen cáncer y/o que se ha determinado que no tienen cáncer de próstata. En general, la detección de niveles aumentados en la muestra biológica del sujeto en comparación con los del control puede tomarse como indicativo de que el sujeto tiene cáncer de próstata, o una mayor probabilidad de desarrollar cáncer de próstata. Por ejemplo, un aumento de al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 % o al menos 60 % puede indicar que el sujeto tiene cáncer de próstata, o una mayor probabilidad de desarrollar cáncer de próstata. Alternativamente, la detección de niveles equivalentes o disminuidos en la muestra biológica del sujeto en comparación con los del control puede considerarse como indicativo de que el sujeto no tiene cáncer de próstata, o no tiene una mayor probabilidad de desarrollar cáncer de próstata.

En algunas modalidades, el(los) epítipo(s) de GPC-1, los segmentos de epítipos de GPC-1, y/o las variantes y fragmentos de los epítipos/segmentos de epítipos como se describe en la presente descripción se usan como

controles positivos en los métodos de diagnóstico de la presente invención. Por ejemplo, pueden usarse en un ensayo determinado para confirmar que el ensayo tal como se realiza es capaz de detectar el(los) epítipo(s) de GPC-1, segmentos de epítipos de GPC-1, y/o variantes y fragmentos.

5 En algunas modalidades, los métodos de diagnóstico de la presente invención usan proteína(s) de fusión de la presente invención. Se proporcionan ejemplos no limitantes de proteínas de fusión adecuadas en la subsección titulada "Proteínas de fusión". La(s) proteína(s) de fusión puede(n) usarse como control positivo en los métodos de detección.

10 La muestra biológica puede ser una muestra de tejido (por ejemplo, una muestra de biopsia de tejido prostático) o una muestra de fluido corporal.

La muestra de fluido corporal puede ser una muestra de sangre, suero, plasma u orina.

15 Ejemplos no limitantes de cánceres de próstata que pueden detectarse con la presente invención incluyen neoplasia intraepitelial prostática, adenocarcinoma, leiomioma y rhabdomioma.

20 Sin limitación con respecto a los métodos de detección específicos y solo a manera de ejemplo no limitante, la detección de los epítipos de GPC-1, segmentos de epítipos de GPC-1 y variantes y fragmentos puede realizarse mediante ensayos estándar conocidos por los expertos en la técnica, lo que incluye, pero no se limita a, análisis de transferencia de Western, ensayos de inmunosorción ligados a enzimas (ELISA), clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), una prueba de biopelícula o una prueba de anillo de afinidad (ver, por ejemplo, la solicitud de Estados Unidos núm. 2013/016,736). Puede usarse en los ensayos una entidad de unión de acuerdo con la presente invención.

25 En algunas modalidades, la entidad de unión es un anticuerpo. En otras modalidades, la entidad de unión no es un anticuerpo. En algunas modalidades, el anticuerpo se selecciona de uno o más de:

30 (i) anticuerpo MIL38 tal como se depositó bajo los términos del Tratado de Budapest en Cellbank Australia en 214 Hawkesbury Road, Westmead, NSW 2145, Australia el 22 de agosto de 2014 bajo el núm. de acceso CBA20140026;

35 (ii) anticuerpo anti-glicoproteína 1/GPC1 (ab137604): un policlonal de conejo (IgG) específico para GPC-1 humano y disponible comercialmente en abcam® (ver: <http://www.abcam.com/glypican-1-gpc1-antibody-ab137604.html>);

(iii) anticuerpo anti-glicoproteína-1 MAB2600, clon 4D1: un monoclonal de ratón (IgG<sub>k</sub>) específico para GPC-1 humano y de rata y disponible comercialmente en Millipore (ver: [http://www.emdmillipore.com/AU/en/product/MM\\_NF-MAB2600?cid=BI-XX-BRC-A-BIOC-ANTI-B033-1308](http://www.emdmillipore.com/AU/en/product/MM_NF-MAB2600?cid=BI-XX-BRC-A-BIOC-ANTI-B033-1308));

40 (iv) anticuerpo anti-glicoproteína 1 de cabra (AA 24-530): un policlonal de cabra específico para GPC-1 humano y disponible comercialmente de LifeSpan BioSciences, Inc. (ver <https://www.lsbio.com/antibodies/anti-gpc1-antibody-glypican-antibody-aa24-530-icc-wb-western-flow-ls-c330760/341104>).

45 En algunas modalidades, el anticuerpo no se selecciona de uno o más de:

50 (i) anticuerpo MIL38 tal como se depositó bajo los términos del Tratado de Budapest en Cellbank Australia en 214 Hawkesbury Road, Westmead, NSW 2145, Australia el 22 de agosto de 2014 bajo el núm. de acceso CBA20140026;

(ii) anticuerpo anti-glicoproteína 1/GPC1 (ab137604): un policlonal de conejo (IgG) específico para GPC-1 humano y disponible comercialmente en abcam® (ver: <http://www.abcam.com/glypican-1-gpc1-antibody-ab137604.html>);

55 (iii) anticuerpo anti-glicoproteína-1 MAB2600, clon 4D1: un monoclonal de ratón (IgG<sub>k</sub>) específico para GPC-1 humano y de rata y disponible comercialmente en Millipore (ver: [http://www.emdmillipore.com/AU/en/product/MM\\_NF-MAB2600?cid=BI-XX-BRC-A-BIOC-ANTI-B033-1308](http://www.emdmillipore.com/AU/en/product/MM_NF-MAB2600?cid=BI-XX-BRC-A-BIOC-ANTI-B033-1308));

60 (iv) anticuerpo anti-glicoproteína 1 de cabra (AA 24-530): un policlonal de cabra específico para GPC-1 humano y disponible comercialmente de LifeSpan BioSciences, Inc. (ver <https://www.lsbio.com/antibodies/anti-gpc1-antibody-glypican-antibody-aa24-530-icc-wb-western-flow-ls-c330760/341104>).

65 En algunas modalidades, la entidad de unión es una población de anticuerpos que comprende el anticuerpo MIL38 (CBA20140026) y que no comprende un anticuerpo anti-glicoproteína 1 (GPC-1) capaz de unirse a un epítipo que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de una cualquiera o una pluralidad de: TQNARA (SEQ ID

NO: 8), ALSTASDDR (SEQ ID NO: 9), PRERPP (SEQ ID NO: 10), QDASDDGSGS (SEQ ID NO: 11), LGPECSRAVMK (SEQ ID NO: 13) y TQNARAFRD (SEQ ID NO: 7).

**Ejemplos**

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

10 Ejemplo 1: identificación y caracterización de un epítipo de glipicano-1 unido por el anti-glipicano 1 humano murino (MIL38-AM4)

1.1 Materiales y métodos

15 Se prepararon conjuntos empíricos que abarcan la secuencia de referencia con diferentes restricciones conformacionales, y el anticuerpo se sondeó en la matriz de péptidos.

– Anticuerpos

20 El anticuerpo monoclonal anti-glipicano 1 humano murino MIL38-AM4 se proporcionó como se expone en la Tabla 6 más abajo.

Tabla 6: descripción del anticuerpo usado

Nombre	Origen	Concentración	Almacenamiento	Estado
MIL38-AM4*	Ratón	4,6 mg/ml (100 µl)	-20 °C/ 73	OK
* producido por células de hibridoma tal como se depositaron en Cellbank Australia con el núm. de acceso CBA20140026				

30 – Péptidos

La siguiente secuencia de glipicano-1 humano (GPC-1) se usó como base para generar una biblioteca de péptidos estructurados.

35 P35052 (GPC1\_HUMANO)

```

1   MELRARGWWL LCAAAALVAC ARGDPASKSR SCGEVRQIYG AKGFSLSDVP 50
51  QAEISGEHLR ICPQGYTCCT SEMEENLANR SHAELETALR DSSRVLQAML 100
40  101 ATQLRSFDDH FQHLLNDSER TLQATFPGAF GELYTQNARA FRDLYSELRL 150
    151 YYRGANLHLE ETLAEFWARL LERLFFKQLHP QLLLPDDYLD CLGKQAEALR 200
    201 PFGEAPREL RLRATRAVAA RSFVQGLGVA SDVVRKVAQV PLGPECSRAV 250
    251 MKLVYCAHCL GVPGARPCPD YCRNVLKGCL ANQADLDAEW RNLLDSMVL I 300
45  301 TDKFWGTSGV ESVIGSVHTW LAEAINALQD NRDTLTAKVI QGCGNPKVNP 350
    351 QGPGPEEKRR RGKLA PRERP PSGTLEKLV S EAKAQLRDVQ DFWISLPGTL 400
    401 CSEKMALSTA SDDRCWNGMA RGRYLPEVMG DGLANQINNP EVEVDITKPD 450
    451 MTIRQQIMQL KIMTNRLRSA YNGNDVDFQD ASDDGSGSGS GDGCLDDLCS 500
50  501 RKVSRKSSSS RTPLTHALPG LSEQEGQKTS AASCPQPPTF LLPLLLFLAL 550
    551 TVARPRWR                                     558
    
```

**(SEQ ID NO: 14)**

55 La Figura 1A muestra la representación de la cadena B tal como se presenta bajo el identificador del Protein Data Bank (ID PDB) 4AD7 (<http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/4AD7>).

– Tecnología de péptidos enlazados químicamente sobre armazones (CLIPS)

60 A continuación, se describen los principios generales de la tecnología CLIPS usada.

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

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

El tamizaje de la biblioteca CLIPS comienza con la conversión de la proteína objetivo en una biblioteca de hasta 10 000 constructos de péptidos superpuestos, mediante el uso de un diseño de matriz combinatoria. Sobre un portador sólido, se sintetiza una matriz de péptidos lineales, que posteriormente se conforman en constructos CLIPS definidos espacialmente. Los constructos que representan ambas partes del epítipo discontinuo en la conformación correcta se unen al anticuerpo con alta afinidad, que se detecta y cuantifica. Los constructos que presentan el epítipo incompleto se unen al anticuerpo con menor afinidad, mientras que los constructos que no contienen el epítipo no se unen en absoluto. La información de afinidad se usa en pantallas iterativas para definir la secuencia y la conformación de los epítipos en detalle.

La proteína objetivo que contiene un epítipo conformacional discontinuo se convierte en una biblioteca matricial. Los péptidos combinatorios se sintetizan en una miniplaca patentada y se convierten químicamente en constructos CLIPS definidos espacialmente. Se cuantifica la unión de anticuerpos.

– Síntesis de péptidos

Para reconstruir epítipos discontinuos de la molécula objetivo, se sintetizó una biblioteca de péptidos estructurados. Esto se realizó mediante el uso de la tecnología de péptidos enlazados químicamente sobre armazones (CLIPS). La tecnología CLIPS permitió la generación de péptidos estructurados en bucles simples, bucles dobles, bucles triples, pliegues en forma de láminas, pliegues en forma de hélice y sus combinaciones. Las plantillas CLIPS se acoplaron a los residuos de cisteína. Las cadenas laterales de múltiples cisteínas en los péptidos se acoplaron a una o dos plantillas CLIPS. Por ejemplo, una solución 0,5 mM de la plantilla CLIPS T2 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. La plantilla 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 mientras estaban completamente cubiertas en solución. Por último, las matrices de péptidos se lavaron extensamente con exceso de H<sub>2</sub>O y se sonicaron en tampón de disrupción que contiene SDS al 1 por ciento/betamercaptoetanol al 0,1 por ciento en PBS (pH 7,2) a 70 °C durante 30 minutos, seguido por sonicación en H<sub>2</sub>O durante otros 45 minutos. Los CLIPS T3 que portan péptidos se prepararon de manera similar pero con tres cisteínas.

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

Conjunto 1

Marcador	lin
Tipo de imitación	Péptidos lineales
Descripción	Péptidos lineales de longitud 15 con una superposición de 14 que cubren la secuencia de referencia (SEQ ID NO: 14).

Conjunto 2

Marcador	bucle
Tipo de imitación	Péptidos en forma de bucle
Descripción	Péptidos de longitud 17, con residuos de cisteína en las posiciones 1 y 17. Las posiciones 2 - 16 contienen los 15 mer lineales del conjunto 1 en los que las cisteínas se reemplazan por alanina. Después de la síntesis, los péptidos se restringen por un enlazador P2 CLIPS™ para restringir la forma.

Conjunto 3

Marcador hél\_i3

Tipo de imitación Péptidos helicoidales

Descripción Péptidos de longitud 15, con una superposición de 14 derivados a partir de la secuencia de referencia (SEQ ID NO: 14). Los residuos de cisteína se reemplazaron por alanina. Después, las posiciones 3 y 7 se reemplazaron por cisteína, que estaban conectadas por un P2 CLIPS™. Esta conexión i, i+4 ('grapado') indujo la nucleación de la hélice en secuencias que eran propensas al plegamiento helicoidal.

Conjunto 4

Marcador hél\_i7

Tipo de imitación Péptidos helicoidales

Descripción Péptidos de longitud 15, con una superposición de 14 derivados a partir de la secuencia de referencia (SEQ ID NO: 14). Los residuos de cisteína se reemplazaron por alanina. Después, las posiciones 3 y 11 se reemplazaron por cisteína, que estaban conectadas por un P2 CLIPS™. Esta conexión i, i+7 ('grapado') indujo la nucleación de la hélice en secuencias propensas al plegamiento helicoidal.

Conjunto 5

Marcador lámina

Tipo de imitación Péptidos en forma de lámina

Descripción Péptidos de longitud 15, con una superposición de 14 derivados a partir de la secuencia de referencia (SEQ ID NO: 14). Los residuos de cisteína se reemplazaron por alanina. Después, las posiciones 6 y 9 se reemplazaron por cisteína, que estaban conectadas por un P2 CLIPS™. En péptidos propensos al plegamiento de la lámina β, esta forma se estabilizó.

– Tamizaje por ELISA

La unión del anticuerpo a cada uno de los péptidos sintetizados se probó en un ELISA basado en PEPSCAN. Las matrices de péptidos se incubaron con solución de anticuerpo primario (durante toda la noche a 4 °C). Después del lavado, las matrices de péptidos se incubaron con una dilución 1/1000 de un conjugado de peroxidasa de anticuerpo (SBA, núm. cat. 2010-05) durante una hora a 25 °C. Después del lavado, se añadieron el sustrato de peroxidasa de 2,2'-azino-di-3-etilbenzotiazolina sulfonato (ABTS) y 2 µl/ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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) - cámara y un sistema de procesamiento de imágenes.

– Procesamiento de datos

Los valores obtenidos de la cámara CCD variaron de 0 a 3000 mAU, similar a un lector ELISA de placas de 96 pocillos estándar. Los resultados se cuantificaron y almacenaron en la base de datos de Peplab. Ocasionalmente, un pocillo contenía una burbuja de aire, lo que daba como resultado un valor falso positivo. Las placas se inspeccionaron manualmente y los valores provocados por una burbuja de aire se puntuaron como 0.

– Control de calidad de la 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 tamizaron con el anticuerpo 57.9 (*ref.* Posthumus y otros, J. Virology, 1990, 64:3304-3309).

– Detalles del tamizaje

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

Tabla 7: condiciones de tamizaje

	dilución	tampón de muestra	preacondicionamiento
MIL38-AM4 en suero*	1 µg/ml	SQ 50 %	SQ 50 %
MIL38-AM4*	10 µg/ml	SQ 50 %	SQ 50 %

\* producido por células de hibridoma tal como se depositaron en Cellbank Australia con el núm. de acceso CBA20140026

## 1.2 Resultados

– Resultados experimentales primarios y determinación de la relación señal/ruido

En la Figura 2 se muestra una descripción gráfica del conjunto de datos completo de los resultados de ELISA sin procesar generados por el tamizaje. Aquí, un diagrama de caja representa cada conjunto de datos e indica la señal 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 obtuvieron diferentes distribuciones de datos de ELISA. Los datos permitieron la identificación de un epítipo.

La matriz se incubó con MIL38-AM4 a diluciones de 1 µg/ml y 10 µg/ml, en condiciones normales de rigurosidad. Se observó una respuesta dependiente de la concentración (Figuras 3A y 3B). A 10 µg/ml no se observó saturación, lo que indica que ninguno de los péptidos representó el epítipo completo. Se identificaron dos grupos de respuestas que no son adyacentes en la estructura primaria. Surgieron dos núcleos comunes: <sup>135</sup>TQNARAFRD<sub>143</sub> (SEQ ID NO: 7) y <sup>348</sup>VNPQGGPPEEK<sub>358</sub> (SEQ ID NO: 2), donde el último es claramente dominante con respecto al primero.

En el modelo tridimensional (3D) derivado del identificador del Protein Data Bank (ID PDB) 4AD7 (<http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/4AD7>) (Figura 4), el tramo <sup>348</sup>VNPQGGPPEEK<sub>358</sub> (SEQ ID NO: 2) no se resolvió, ni estaba en otro archivo de coordenadas pdb disponible públicamente (4ACR, 4BWE), lo que indica que probablemente sea flexible. El tramo <sup>135</sup>TQNARAFRD<sub>143</sub> (SEQ ID NO: 7) se encuentra adyacente a este bucle perdido, como es evidente por las posiciones de V348 y G362, que se resuelven en el modelo 3D.

Es común ver la unión a imitaciones incompletas que cumplen parcialmente los requisitos de anticuerpos similares a la unión que observamos para MIL38-AM4 a los péptidos en esta matriz. Postulamos un epítipo discontinuo, que consiste en contribuciones principales del bucle flexible <sup>348</sup>VNPQGGPPEEK<sub>358</sub> (SEQ ID NO: 2), y contribuciones minoritarias de (residuos de) la hélice <sup>135</sup>TQNARAFRD<sub>143</sub> (SEQ ID NO: 7).

## 1.3 Resumen y discusión

Este estudio tuvo como objetivo mapear el epítipo del anti glipicano 1 humano murino (MIL38-AM4). Se prepararon conjuntos empíricos que abarcan la secuencia de referencia con diferentes restricciones conformacionales, y el anticuerpo se sondeó en la matriz de péptidos. La unión significativa indicó un epítipo discontinuo, que consiste en contribuciones mayoritarias del bucle flexible <sup>348</sup>VNPQGGPPEEK<sub>358</sub> (SEQ ID NO: 2) y contribuciones minoritarias de (residuos de) la hélice <sup>135</sup>TQNARAFRD<sub>143</sub> (SEQ ID NO: 7).

Ejemplo 2: identificación y caracterización de epítopos adicionales de glipicano-1 unidos por otros anticuerpos anti-glipicano-1

## 2.1 Materiales y métodos

La Tabla 8 más abajo proporciona información sobre los anticuerpos usados en este estudio. Los primeros tres anticuerpos enumerados están disponibles comercialmente.



Tabla 8: descripción de los anticuerpos usados

Nombre	Origen	Concentración	Ubicación	Estado
Anti-glicicano 1 (GPC1) (AA 24-530) <sup>^</sup>	cabra	1 mg/ml	4 °C/11	OK
Anticuerpo anti-glicicano 1/GPC1 (ab137604)*	conejo	0,97 mg/ml	-20 °C/ 73	OK
Mab2600 Merck Millipore <sup>†</sup> (Ac anti-glicicano-1, clon 4D1)	ratón	1 mg/ml	4 °C/11	OK
MIL38-AM3 <sup>§</sup>	ratón	1,25 mg/ml	-20 °C/ 73	usado

<sup>^</sup> Disponible comercialmente de: *antibodies-online* (<http://www.antibodies-online.com>); *Lifespan Biosciences, Inc.* (<https://www.lsbio.com>)  
Disponible comercialmente de *abcam*<sup>®</sup> (<http://www.abcam.com>)  
<sup>†</sup> Disponible comercialmente de Merck Millipore (<http://www.emdmillipore.com>)  
<sup>§</sup> Una de las dos poblaciones distintas de anticuerpos producidas por hibridoma mixto depositadas en la Colección Americana de Cultivos Tipo de Tejidos (ATCC) con el núm. de acceso HB11785

## 5 – Péptidos

La secuencia de glicicano-1 humano (GPC-1) definida por la SEQ ID NO: 14 se usó como base para generar una biblioteca de péptidos estructurados.

10 La Figura 1A muestra la representación de la cadena B tal como se presenta bajo el identificador del Protein Data Bank (ID PDB) 4AD7 (<http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/4AD7>).

– Tecnología de péptidos enlazados químicamente sobre armazones (CLIPS)

15 Los principios generales de la tecnología CLIPS usada en estos experimentos se exponen en el Ejemplo 1 anterior.

– Síntesis de péptidos

20 La síntesis de péptidos se realizó mediante el uso de los métodos mencionados en el Ejemplo 1. Los péptidos CLIPS y lineales sintetizados químicamente se sintetizaron de acuerdo con los diseños mostrados en el Ejemplo 1 (conjuntos 1-5).

– Tamizaje por ELISA

25 La unión del anticuerpo a cada uno de los péptidos sintetizados se probó en un ELISA basado en PEPSCAN, como se expone en el Ejemplo 1.

– Procesamiento de datos y control de calidad de la síntesis

30 El procesamiento de datos y el control de calidad de la síntesis se realizaron según el Ejemplo 1.

– Detalles del tamizaje

35 La Tabla 9 resume las condiciones de unión de anticuerpos. Para el tampón Pepsan y Preacondicionamiento (SQ), los números indican la cantidad relativa de proteína competidora (una combinación de suero de caballo y ovoalbúmina). También se usó P/Tw (PBS-Tween) para reducir la rigurosidad de la unión.

Tabla 9: condiciones de tamizaje

Muestra	Concentración	Tampón de muestra	Prerrecubrimiento
Anticuerpo anti-glicicano 1/GPC1 (ab137604)*	1/1000	SQ	SQ
Anticuerpo anti-glicicano 1/GPC1 (ab137604)*	1/10 000	SQ	SQ
Anti-glicicano 1 (GPC1) (AA 24-530)	1 µg/ml	SQ	SQ
Mab 2600 Merck Millipore (Ac anti-glicicano-1, clon 4D1)	10 ng/ml	SQ	SQ
Anti-glicicano 1 (GPC1) (AA 24-530)	0,01 µg/ml	SQ	SQ
MIL38-AM3	1 µg/ml	SQ 10 %	SQ 10 %
MIL38-AM3	10 µg/ml	SQ 10 %	SQ 10 %
MIL38-AM3	2,5 µg/ml	P/Tw	SQ 0,1 %

50

## 2.2 Resultados

- Resultados experimentales primarios y determinación de la relación señal/ruido

En la Figura 5 se muestra una descripción gráfica del conjunto completo de datos de resultados de ELISA sin procesar generados por el tamizaje. Aquí, un diagrama de caja representa cada conjunto de datos e indica la señal 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. Los datos permitieron la identificación de un epítipo para los sueros monoclonales y policlonales, pero no para MIL38-AM3.

- 10 – MIL38-AM3

Incluso cuando se probó a altas concentraciones (10 µg/ml) y a rigurosidad reducida (PBS-Tween) no pudo detectarse MIL38-AM3. La muestra también se probó con un anticuerpo secundario diferente (anti-IgG de ratón de oveja HRP; GE Healthcare, NXA931), pero nuevamente no se obtuvo ningún resultado.

- 15 Como confirmación, probamos un ELISA directo, en el que MIL38-AM3 estaba recubierto sobre la placa. Mediante el uso de anti-IgG de ratón de conejo - HRP (Southern Biotech) no pudo detectarse el anticuerpo.

- Anticuerpo anti Glipicano1/GPC1 de conejo ab137604

- 20 El anti-GPC1 de conejo produce 3 señales principales, como puede verse en el panel correspondiente en la Figura 6. Estas señales corresponden a los tramos <sup>348</sup>VNPQGGPPEEK<sub>358</sub> (SEQ ID NO: 2), <sup>366</sup>PRERPP<sub>371</sub> (SEQ ID NO: 10) y <sup>478</sup>QDASDDGSGS<sub>487</sub> (SEQ ID NO: 11).

- AcM (Mab) 2600 de ratón (Millipore)

- 25 El anticuerpo 2600 de ratón reconoce un pico claro en todos los conjuntos de péptidos, que comparten el núcleo común <sup>242</sup>LGPECSRAVMK<sub>252</sub> (SEQ ID NO: 13). Esto puede verse en el panel correspondiente en la Figura 6.

- Anti-GPC-1 de cabra (GPC1)

- 30 El anti-GPC-1 de cabra produce 2 señales principales, como puede verse en el panel correspondiente en la Figura 6. Estas señales corresponden a los tramos <sup>348</sup>VNPQGGPPEEK<sub>358</sub> (SEQ ID NO: 2) y <sup>408</sup>ALSTASDDR<sub>414</sub> (SEQ ID NO: 9).

### 2.3 Resumen y discusión

- 35 Este estudio tuvo como objetivo perfilar tres anticuerpos anti-glipicano 1 disponibles comercialmente y un AcM adicional (MIL38-AM3) en las mismas matrices. Los anticuerpos se sondearon en una matriz de péptidos existente como se expone en el Ejemplo 1. Todos los anticuerpos anti GPC-1 disponibles en el mercado podrían mapearse mediante el uso de estas matrices. El anticuerpo MIL38-AM3 resultó refractario al mapeo, debido a la naturaleza discontinua del epítipo o a la degradación de la muestra, y no produjo señal en ninguna de las matrices.

- 40 El anti GPC-1 de conejo reconoce al menos tres tramos en el glipicano 1, <sup>348</sup>VNPQGGPPEEK<sub>358</sub> (SEQ ID NO: 2), <sup>366</sup>PRERPP<sub>371</sub> (SEQ ID NO: 10), y <sup>478</sup>QDASDDGSGS<sub>487</sub> (SEQ ID NO: 11). Dos de estos tramos se resuelven en el archivo de coordenadas 4AD7.pdb, como se muestra en la Figura 7A. Como se trata de una preparación de anticuerpos policlonales, no puede evaluarse si los epítipos son lineales o son parte de un epítipo complejo.

- 45 El AcM 2600 anti glipicano de ratón reconoce el tramo <sup>242</sup>LGPECSRAVMK<sub>252</sub> (SEQ ID NO: 13) en todos los conjuntos de péptidos de la matriz. La localización del epítipo en el archivo de coordenadas 4AD7.pdb se representa en la Figura 7B.

- 50 El anti glipicano 1 de cabra reconoce al menos dos tramos en el glipicano 1, <sup>348</sup>VNPQGGPPEEK<sub>358</sub> (SEQ ID NO: 2) y <sup>408</sup>ALSTASDDR<sub>414</sub> (SEQ ID NO: 9). Como se trata de una preparación de anticuerpos policlonales, no puede evaluarse si los epítipos son lineales o son parte de un epítipo complejo. Ninguno de los tramos se resuelve en el archivo de coordenadas disponible.

- 55 Las preparaciones policlonales de conejo y cabra reconocen un tramo <sup>348</sup>VNPQGGPPEEK<sub>358</sub> (SEQ ID NO: 2) en el glipicano 1, que también forma parte del sitio de unión (probablemente discontinuo) del AcM MIL38-AM4. Ambas preparaciones policlonales también reconocen epítipos adicionales en el glipicano 1, pero no puede evaluarse si estos epítipos forman un epítipo discontinuo o si son manifestaciones de la naturaleza policlonal de la muestra.
- 60 Ninguno de los AcP reconoce el tramo <sup>135</sup>TQNARA<sub>140</sub>, que se cree contribuye a la unión a MIL38-AM4.

El AcM 2600 de ratón reconoce un epítipo que no se comparte por ningún otro anticuerpo anti-GPC-1 probado hasta ahora.

Ejemplo 3: identificación y caracterización de epítomos adicionales de glipicano-1 unidos por otros anticuerpos anti-glipicano-1

3.1 Materiales y métodos

La Tabla 10 más abajo proporciona información sobre los anticuerpos usados en este estudio. Se usaron tres anticuerpos anti-glipicano 1, cada uno de los cuales se usó en experimentos anteriores como se describe en el Ejemplo 1 y/o el Ejemplo 2 anterior.

Tabla 10: descripción de los anticuerpos usados

Nombre	Origen	Concentración	Ubicación	Estado
Anti-glipicano 1 (GPC1) (AA 24-530) <sup>^</sup>	cabra	1 mg/ml	4 °C/11	OK
Anticuerpo anti-glipicano 1/GPC1 (ab137604)*	conejo	0,97 mg/ml	-20 °C/ 73	OK
MIL38-AM4 <sup>†</sup>	ratón	4,6 mg/ml	-20 °C/ 73	OK

<sup>^</sup> Disponible comercialmente de: antibodies-online (<http://www.antibodies-online.com>); Lifespan Biosciences, Inc. (<https://www.lsbio.com>)  
<sup>\*</sup> Disponible comercialmente de abeam® (<http://www.abcam.com>)  
<sup>†</sup> Producido por células de hibridoma depositadas en Cellbank Australia con el núm. de acceso CBA20140026

– Péptidos

La secuencia del glipicano-1 humano (GPC-1) en la que se basó este estudio se define en la SEQ ID NO: 14. Se usaron las siguientes secuencias de residuos:

residuos GPC1 #344-366 GNPQVNPQGGPPEEKRRRGKLAP (SEQ ID NO: 15)

residuos GPC1 #131-149 GELYTQNARAFRDLYSELR (SEQ ID NO: 16)

– Síntesis de péptidos

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

Conjunto 1

Tipo de imitación: Imitación de epítomos discontinuos  
 Marcador: MAT.A, MAT.B  
 Descripción: Imitaciones de péptidos restringidos de longitud variable. A partir de las dos secuencias de partida (SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 16) se prepararon todos los péptidos 10 a 22 y 10 a 18 mer con paso de progresión 4, y estos se emparejaron. En los extremos y entre los dos péptidos se colocaron cisteínas. Estas se enlazaron por un CLIPS T3.

Conjunto 2

Tipo de imitación: Péptidos lineales  
 Marcador: RN.PKVNPQGGPPEEKRR (SEQ ID NO: 17)  
 Descripción: Análisis de sustitución, a partir de la secuencia de bases PKVNPQGGPPEEKRR (SEQ ID NO: 18), todos los aminoácidos individuales se reemplazaron por aminoácidos todos de origen natural, excepto la cisteína.

Conjunto 3

Tipo de imitación: Péptidos restringidos.  
 Marcador: BUCLE RN.PKVNPQGGPPEEKRR (SEQ ID NO: 17),  
 hélice 3 RN.ELCTQNCRAFRDLYS (SEQ ID NO: 19)  
 Descripción: BUCLE RN.ELCTQNCRAFRDLYS (SEQ ID NO: 19)  
 Análisis de sustitución, a partir de las secuencias de bases como se indica en los nombres de los marcadores, todos los aminoácidos individuales se reemplazaron por aminoácidos todos de origen natural, excepto la cisteína.

– Tamizaje por ELISA

La unión del anticuerpo a cada uno de los péptidos sintetizados se probó en un ELISA basado en PEPSCAN, como se expone en el Ejemplo 1.

– Procesamiento de datos y control de calidad de la síntesis

El procesamiento de datos y el control de calidad de la síntesis se realizaron según el Ejemplo 1.

- Análisis de mapa de calor

5 A continuación, se presenta una breve descripción general de la metodología del mapa de calor usada.

Un mapa de calor es una representación gráfica de datos donde los valores tomados por una variable en un mapa bidimensional se representan como colores. Para péptidos CLIPS de doble bucle, dicho mapa bidimensional puede derivarse de las secuencias independientes del primer y segundo bucles. Por ejemplo, las secuencias de una serie dada de 16 péptidos CLIPS son efectivamente permutaciones de 4 subsecuencias únicas en el bucle 1 y 4 subsecuencias únicas en el bucle 2. Por lo tanto, los datos de ELISA observados pueden trazarse en una matriz 4x4, donde cada coordenada X corresponde a la secuencia del primer bucle, y cada coordenada Y corresponde a la secuencia del segundo bucle.

15 Para facilitar aún más la visualización, los valores de ELISA pueden reemplazarse con un gradiente continuo de sombreado. En este caso, los valores extremadamente bajos son de color claro, los valores extremadamente altos son de color más oscuro y los valores promedio son de color negro. Cuando este mapa de gradiente se aplica a una matriz de datos, se obtiene un mapa de calor sombreado.

- 20 - Detalles del tamizaje

La Tabla 11 resume las condiciones de unión de anticuerpos. Para el tampón Pepscan y Preacondicionamiento (SQ), los números indican la cantidad relativa de proteína competidora (una combinación de suero de caballo y ovoalbúmina).

Tabla 11: condiciones de tamizaje

suero	dilución	tampón de muestra	preacondicionamiento
Anti-glipicano 1 (GPC1) (AA 24-530)	10 ng/ml	SQ	SQ
Anticuerpo anti glipicano 1/GPC1 (ab137604)	1/2500	SQ	SQ
MIL-38 AM4	10 µg/ml	SQ 10 %	SQ 50 %

### 3.2 Resultados

- 40 - Resultados experimentales primarios y determinación de la relación señal/ruido

En la Figura 8 se muestra una descripción gráfica del conjunto de datos completo de los resultados de ELISA sin procesar generados por el tamizaje. Aquí, un diagrama de caja representa cada conjunto de datos e indica la señal 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.

- Ac policlonal de conejo 137604

50 En el Ejemplo 2, se encontró que el tramo <sup>348</sup>VNPQGGPPEEK<sub>358</sub> (SEQ ID NO: 2) es suficiente para unir algo de IgG del Ac policlonal de conejo 137604. En este estudio, todos los constructos que contienen <sup>348</sup>VNPQGGPPEE<sub>357</sub> (SEQ ID NO: 3) se unieron nuevamente por IgG a partir de esta muestra a dilución 1/2500. En las matrices del Conjunto 1 no existe aumento de señal en constructos específicos.

55 A partir del análisis de sustitución en la Figura 9 puede verse que los residuos P353, G354 y E356 son esenciales. Se permiten sustituciones limitadas en las posiciones Q351, G352 y E357.

- AntiGPC-1 policlonal de cabra

60 En el Ejemplo 2, el tramo <sup>348</sup>VNPQGGPPEEK<sub>358</sub> (SEQ ID NO: 2) también fue suficiente para unir algo de IgG del antiGPC-1 policlonal de cabra. Este anticuerpo reconoce el mismo bucle que el policlonal de conejo, pero lo hace con una especificidad fina ligeramente diferente. En el diagrama de letras de la Figura 10 puede verse que los residuos más críticos son G352, G354 y E356, y que se permite una sustitución limitada en las posiciones N349, Q351 y P353. En las matrices del Conjunto 1 se ve aumento de señal. Aunque el tramo alrededor de los residuos 140-149 no estaba

implicado en el mapeo primario de este anticuerpo, los distintos constructos que incluyen este tramo son mejores cebos para la unión de algunas IgG en este policlón.

– Anticuerpo MIL38-AM4

5 En los ejemplos 1 y 2 se estableció que MIL38-AM4 se une al glicano en el tramo <sup>348</sup>VNPQGGPPEEK<sub>358</sub> (SEQ ID NO: 2), y también se une al tramo <sup>135</sup>TQNARA<sub>140</sub> (SEQ ID NO: 8), lo que se tomó como una indicación de un epítipo discontinuo.

10 Los constructos en bucle que contienen el tramo principal resaltan los residuos que son más críticos para la unión. De la Figura 10 puede verse que los residuos V348, Q351, G352 y P353 no toleran el reemplazo, con requerimientos significativos para K347, N349 y P350, y en menor medida de G354, P355 y E356.

15 Optimización de una imitación para reconocimiento por MIL38-AM4 mediante la adición de residuos del intervalo 135 - 143 a las matrices de bucles principales del Conjunto 1.

20 El requerimiento para V348 y los residuos circundantes fue nuevamente evidente en estas series. Existió unión adicional en los conjuntos de matriz que culminó en la señal óptima para CGELYTQNARAFRDLCGNPKVNPQGGPPEEKRRRGC con restricción T3 (SEQ ID NO: 12) (Figura 12).

– Similitudes y diferencias

25 Los anticuerpos se unen o no a constructos similares, como puede verse en los gráficos de dispersión de la Figura 13. Sin embargo, muchos constructos son vistos exclusivamente por una de las preparaciones (puntos a lo largo de los ejes, o en las esquinas inferiores derecha y superior izquierda).

– Conclusiones

30 En el seguimiento de los Ejemplos 1 y 2, se perfiló el epítipo conformacional del anticuerpo MIL 38-AM4. Se descubrió que los anticuerpos policlonales AB137604 (conejo) y anti GPC-1 24-530 (cabra) reconocen un epítipo similar. Estos se contrastaron y compararon en las mismas matrices.

35 Los dos líderes obtenidos en el Ejemplo 1 que apuntan a un epítipo discontinuo para MIL 38 - AM4 se usaron para generar una matriz en la que los bucles tienen diferentes longitudes. Además, se realizaron análisis de sustitución completa de las secuencias líder individuales. Todas las matrices se probaron con los tres anticuerpos enumerados anteriormente.

40 Para el reconocimiento de glicano 1, todos los anticuerpos investigados en este estudio se unen a un epítipo que consiste exclusiva o principalmente en el bucle flexible entre los residuos 347 y 358. Sin embargo, sus especificidades finas difieren, lo que puede tener implicaciones para sus propiedades funcionales, que a su vez puede influir en la selectividad *in vivo* o la aplicabilidad en pruebas discriminatorias.

45 El epítipo del (algunas especies de IgG presentes en) policlonal de conejo Ab 137604 es el tramo lineal <sup>348</sup>VNPQGGPPEE<sub>357</sub> (SEQ ID NO: 3). No existe indicación de la presencia de anticuerpos que reconozcan un epítipo conformacional.

50 El mismo bucle flexible también es visto por el (algunas especies de IgG en) policlonal de cabra anti GPC-1. Existe cierta preferencia por imitaciones estructuradas, aunque esto no es importante. Es muy posible que no todos los anticuerpos en esta preparación vean el bucle flexible de la misma manera. El anticuerpo monoclonal MIL38-AM4 se une principalmente al glicano 1 en el bucle entre los residuos 347 - 355, pero este anticuerpo se beneficia claramente de la adición de residuos del intervalo 135 - 143 al péptido. Las imitaciones que se producen todavía son subóptimas, lo que se refleja en el hecho de que se necesitan concentraciones de anticuerpo 1000 veces más altas para obtener intensidades de señal similares a las registradas para el Ac de conejo 137604, lo que demuestra aún más los requerimientos adicionales planteados en el sustrato de unión.

55 Esto no tiene implicaciones para la afinidad hacia la proteína objetivo, que se determinará por métodos cuantitativos (por ejemplo, Biacore). De hecho, la exquisita selectividad distingue los anticuerpos que pueden usarse *in vivo* sin provocar efectos secundarios.

60

Tabla 12: Epítomos de los anticuerpos en este estudio

Anticuerpo	Epítopo	Residuos importantes	más Conformación sensible
5 Anticuerpo anti-glipicano 1 de conejo/GPC1 (ab137604)	1 de <sup>348</sup> VNPQGGP <sub>357</sub> E <sub>357</sub> (SEQ ID NO: 3)	P353, G354, E356	N
Anti-glipicano 1 de cabra (GPC1) (AA 24-530)	349NPQGGP <sub>357</sub> E <sub>357</sub> (SEQ ID NO: 4)	G352, G354, E356	?
10 MIL38-AM4	347KVNPQGGP <sub>355</sub> (SEQ ID NO: 6)	V348, Q351, G352, P353	γ

En base a los resultados presentados anteriormente, la Tabla 13 más abajo representa un resumen de las sustituciones toleradas en las secuencias de los epítomos analizadas.

15

Tabla 13: Resumen de sustituciones toleradas en las secuencias de epítopos

Núm. de residuo en la SEQ ID347 NO: 14	348	349	350	351	352	353	354	355	356 E	357 E	358
	V	N	P	Q	G	P	G	P			K
Sustituciones toleradas en el epítipo del Ac MIL38-AM4	WRL YF X	HPD	RKWSHN	X	X	X	DE NQKRA	MAIKRQSTY	✓	✓	✓
Sustituciones toleradas en el epítipo de Ac anti-glicoproteína 1 de cabra (GPC1) (AA 24-530)	✓	H	✓	NMTSR	X	A	X	NO RNQVIL	X	✓	✓
Sustituciones toleradas en el epítipo del anticuerpo anti-glicoproteína 1/GPC1 de conejo (ab137604)	✓	✓	✓	YAEVMFLTR	ASTHWYFM	X	X	✓	X	QDFHM	✓

✓ Significa que puede tolerarse cualquier sustitución de aminoácidos en esta posición  
X Significa que no puede tolerarse la sustitución de aminoácidos en esta posición  
A (ala), R (arg), N (asn), D (asp), B (asx), C (cys), E (glu), Q (gln), Z (gln), G (gly), H (his), I (ile), L (leu), K (lys), M (met), F (phe), P (pro), S (ser), T (thr), W (trp), Y (tyr) o V (val)

Ejemplo 4: Los anticuerpos MIL38 y anti-glicano-1 (anti-GPC-1) muestran una reactividad superpuesta en las transferencias de Western 2D.

5 El anticuerpo anti-GPC-1 de conejo ab137604 mostró reactividad con la proteína central del glicano-1 a un peso molecular de aproximadamente 60 kDa, el mismo peso molecular detectado por MIL38. Para confirmar que MIL38 reconoció glicano-1, los extractos MPEK DU-145 de cáncer de próstata se sometieron a electroforesis y a transferencia de Western 2D.

10 Los extractos de proteínas de membrana (MPEK) de células de cáncer de próstata DU-145 se separaron en gel 2D (gradiente de pI horizontal y masa molecular vertical). Las transferencias de Western mediante el uso del anticuerpo MIL38 y los anticuerpos policlonales de conejo rGPC-1 comerciales muestran una reactividad superpuesta que marca una proteína de 60 Kd (encerrada en un círculo en la Figura 14). El carril D (Figura 14) es una separación unidimensional para los extractos DU-145 como un control. El carril M (Figura 14) es un carril de separación unidimensional para marcadores de tamaño molecular como controles.

15 Como se muestra en la Figura 14, el anticuerpo MIL38 y los anticuerpos anti-GPC-1 mostraron una reactividad superpuesta al detectar una proteína con un peso molecular de 60 kDa y puntos isoeléctricos que varían de 5 a 7.

20 Ejemplo 5: MIL38 se detecta en inmunoprecipitados de anti-GPC-1 y viceversa.

Se usaron anticuerpos MIL38 o anti-GPC-1 de conejo para inmunoprecipitar sus respectivos antígenos a partir de extractos de MPEK DU-145 o C3 (negativo para MIL38). Los inmunoprecipitados (IP) se sometieron a transferencia de Western con anticuerpo MIL38 o anti-GPC-1 (Figura 15).

25 Se detectó una banda reactiva GPC-1 de 60 kDa en IP de MIL38 en ensayo de transferencia con anti-GPC-1, mientras que se detectó una banda reactiva MIL38 de 60 kDa en IP de anti-GPC-1 en ensayo de transferencia con MIL38. No se detectó reactividad con los controles secundarios solamente. Además, la inmunoprecipitación con el anticuerpo MIL38 resultó en una depleción casi completa de los antígenos MIL38 y anti-GPC-1, lo que sugiere fuertemente que el antígeno de MIL38 es el glicano-1.

30 Cada uno de los anticuerpos MIL38 y anti-GPC-1 de conejo se usó para inmunoprecipitar sus antígenos a partir de los extractos de proteína de membrana celular de cáncer de próstata DU-145 o C3 (negativo para MIL38). Se muestran las transferencias de Western de las inmunoprecipitaciones detectadas ya sea con anticuerpo MIL38 o con anti-GPC-1. La Figura 15A representa la detección por GPC1 de inmunoprecipitados de MIL38 (izquierda) y la detección por MIL38 de inmunoprecipitados de GPC1 (derecha). La Figura 15B representa la detección por MIL38 de inmunoprecipitados de MIL38 como control. Los carriles son: Magic Mark-marcador de proteína comercial como control; MPEK DU145-extracto de proteína de membrana de cáncer de próstata (no inmunoprecipitado); DU145 FT-flujo continuo de cáncer de próstata a partir de inmunoprecipitación; DU145 IP-inmunoprecipitado mediante el uso de anticuerpo; C3 MPEK-extracto de proteína de membrana de control (negativo para MIL38) (no inmunoprecipitado); C3 FT- flujo continuo a partir de inmunoprecipitación; elución IP C3- inmunoprecipitado mediante el uso de anticuerpos (negativo para MIL38). MIL38 puede detectar el inmunoprecipitado a partir del anticuerpo rGPC1 y viceversa. MIL38 también puede unirse a todos los controles, lo que incluye el MPEK DU145 y a la IP realizada por MIL38.

45 Ejemplo 6: GPC-1 puede detectarse por MIL38 en muestras de plasma de cáncer de próstata y en extractos de membrana de pacientes con cáncer de próstata.

Las muestras de plasma de un paciente normal (042) y un paciente con cáncer de próstata (046) se inmunoprecipitaron con anticuerpo MIL38 y la muestra IP se sometió a transferencia de Western con anticuerpos MIL38 y anti-GPC-1 (Figura 16A).

50 Ambos anticuerpos detectaron bandas específicas de aprox. 70 kDa en ambas muestras de plasma. Las señales fueron marcadamente más altas (bandas más oscuras) para los anticuerpos MIL38 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 glicano-1 puede estar elevada en pacientes con cáncer de próstata.

55 Para determinar si el antígeno de MIL38 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 de Western mediante el uso del anticuerpo MIL38 (Figura 16B). El extracto de cáncer de próstata demostró una expresión mucho mayor del antígeno de MIL38 que la muestra de próstata normal.

60 Ejemplo 7: Detección del antígeno de MIL38 en orina del paciente.

MIL38 puede detectar células en la orina de pacientes con cáncer de próstata. Para probar la sensibilidad y especificidad de este método de detección, se obtuvieron 125 muestras de orina de la misma edad. Las células se separaron por centrifugación de la orina y se analizaron mediante el ensayo de inmunofluorescencia indirecta para

65



## ES 2 805 085 T3

MIL38. Se analizaron un total de 47 controles sanos, 37 con hipertrofia prostática benigna (BPH) y 41 cánceres de próstata confirmados por biopsia.

5 La prueba de análisis de inmunofluorescencia para MIL38 (IFA) demostró una sensibilidad del 71 % y una especificidad del 73 % en la identificación de cánceres de próstata dentro de la cohorte. La prueba mostró un 71 % de sensibilidad y un 76 % de especificidad en la identificación de cánceres de próstata en comparación con los pacientes con BPH (Tabla 14).

10 Tabla 14: 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

25 <110> Minomic International Ltd  
 <120> Epítapos de glipicano y usos de estos  
 <130> P098197C  
 <160> 22  
 <170> PatentIn versión 3.5  
 <210> 1  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 1

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

40 <210> 2  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 2

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

50 <210> 3  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 3

55 Val Asn Pro Gln Gly Pro Gly Pro Glu Glu  
 1 5 10

60 <210> 4  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 4

65 Asn Pro Gln Gly Pro Gly Pro Glu Glu  
 1 5

ES 2 805 085 T3

5 <210> 5  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 5

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

10 <210> 6  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 15 <400> 6

Lys Val Asn Pro Gln Gly Pro Gly Pro  
 1 5

20 <210> 7  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 25 <400> 7

Thr Gln Asn Ala Arg Ala Phe Arg Asp  
 1 5

30 <210> 8  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 35 <400> 8

Thr Gln Asn Ala Arg Ala  
 1 5

40 <210> 9  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 45 <400> 9

Ala Leu Ser Thr Ala Ser Asp Asp Arg  
 1 5

50 <210> 10  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 55 <400> 10

Pro Arg Glu Arg Pro Pro  
 1 5

60 <210> 11  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 65 <400> 11

ES 2 805 085 T3

5  
 <210> 12  
 <211> 36  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 12

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

15  
 Cys Gly Glu Leu Tyr Thr Gln Asn Ala Arg Ala Phe Arg Asp Leu Cys  
 1 5 10 15  
 Gly Asn Pro Lys Val Asn Pro Gln Gly Pro Gly Pro Glu Glu Lys Arg  
 20 25 30  
 Arg Arg Gly Cys  
 35

20  
 <210> 13  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 13

25  
 Leu Gly Pro Glu Cys Ser Arg Ala Val Met Lys  
 1 5 10

30  
 <210> 14  
 <211> 558  
 <212> PHT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 14

35  
 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  
 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  
 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  
 85 90 95  
 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  
 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

65

ES 2 805 085 T3

5 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  
 10 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  
 15 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  
 20 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  
 25 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  
 30 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  
 35 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  
 40 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  
 45 Pro Leu Thr His Ala Leu Pro Gly Leu Ser Gln 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  
 Leu Leu Phe Leu Ala Leu Thr Val Ala Arg Pro Arg Trp Arg  
 545 550 555

50 <210> 15  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 55 <400> 15

60 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

65 <210> 16  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 16

ES 2 805 085 T3

Gly Gln Leu Tyr Thr Gln Asn Ala Arg Ala Phe Arg Asp Leu Tyr Ser  
 1 5 10 15  
 5 Glu Leu Arg  
 <210> 17  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 10 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del glipicano-1 de homo sapiens marcada  
 <400> 17  
 Arg Asn Pro Lys Val Asn Pro Gln Gly Pro Gly Pro Glu Glu Lys Arg  
 15 1 5 10 15  
 Arg  
 <210> 18  
 <211> 15  
 20 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 18  
 Pro Lys Val Asn Pro Gln Gly Pro Gly Pro Glu Glu Lys Arg Arg  
 25 1 5 10 15  
 <210> 19  
 <211> 17  
 30 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: secuencia del glipicano-1 de homo sapiens marcada  
 <400> 19  
 35 Arg Asn Glu Leu Cys Thr Gln Asn Cys Arg Ala Phe Arg Asp Leu Tyr  
 1 5 10 15  
 Ser  
 40 <210> 20  
 <211> 238  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
 <400> 20  
 45 Met Gly Ile Lys Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Phe Val Tyr Met Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Trp Leu Ser Gly Val Asp Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln  
 20 25 30  
 50 Lys Phe Met Ser Thr Ser Ile Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys  
 35 40 45  
 Ala Ser Gln Asn Val Gly Ser His Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro  
 50 55 60  
 Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser  
 65 70 75 80  
 Gly Val Thr Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 85 90 95  
 60 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  
 Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro  
 130 135 140  
 65

ES 2 805 085 T3

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

15 <210> 21  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 21

20 Thr Gln Asn Ala Arg Ala Phe Arg Asp Leu Tyr Ser  
 1 5 10

25 <210> 22  
 <211> 1739  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 22

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

35

## REIVINDICACIONES

1. Un epítopo o segmento de epítopo aislado para un anticuerpo anti-glicoproteína 1 (GPC-1) ubicado dentro de una porción del bucle flexible de GPC-1 definido por una secuencia de aminoácidos KVNPPQGGPPEEK (SEQ ID NO: 1), en donde el epítopo o segmento de epítopo aislado consiste en:
- (i) KVNPPQGGPPEEK (SEQ ID NO: 1);
- (ii) un fragmento de KVNPPQGGPPEEK (SEQ ID NO: 1) que consiste en VNPQGGPPEEK (SEQ ID NO: 2), VNPQGGPPEE (SEQ ID NO: 3), NPQGGPPEE (SEQ ID NO: 4), KVNPPQGGPPE (SEQ ID NO: 5) o KVNPPQGGPP (SEQ ID NO: 6);
- (iii) una variante de la SEQ ID NO: 3 con una sustitución en una cualquiera de:
- posición 1, en donde V (val) se sustituye con cualquier otro aminoácido,
- posición 2, en donde N (asn) se sustituye con cualquier otro aminoácido,
- posición 3, en donde P (pro) se sustituye con cualquier otro aminoácido,
- posición 4, en donde Q (gln) se sustituye con uno cualquiera de Y (tyr), A (ala), E (glu), V (val), M (met), F (phe), L (leu), I (ile), T (thr) o R (arg),
- posición 5, en donde G (gly) se sustituye con A (ala), S (ser), T (thr), H (his), W (trp), Y (tyr), F (phe) o M (met),
- posición 8, en donde P (pro) se sustituye con cualquier otro aminoácido, o
- posición 10, en donde E (glu) se sustituye con Q (gln), D (asp), F (phe), H (his) o M (met),
- (iv) una variante de la SEQ ID NO: 4 con una sustitución en una cualquiera de:
- posición 1, en donde N (asn) se sustituye con H (his),
- posición 2, en donde P (pro) se sustituye con cualquier otro aminoácido,
- posición 3, en donde Q (gln) se sustituye con uno cualquiera de N (asn), M (met), T (thr), S (ser) o R (arg),
- posición 5, en donde P (pro) se sustituye con A (ala),
- posición 7, en donde P (pro) se sustituye con uno cualquiera de A (ala), D (asp), C (cys), E (glu), Z (gln), G (gly), H (his), K (lys), M (met), F (phe), P (pro), S (ser), T (thr), W (trp), o Y (tyr), o
- posición 9, en donde E (glu) se sustituye con cualquier otro aminoácido; o
- (v) una variante de la SEQ ID NO: 5 o la SEQ ID NO: 6 con una sustitución solo en una cualquiera de:
- posición 1, en donde K (lys) se sustituye con uno cualquiera de W (trp), R (arg), L (leu), Y (tyr) o F (phe);
- posición 3, en donde N (asn) se sustituye con uno cualquiera de H (his), P (pro) o D (asp);
- posición 4, en donde P (pro) se sustituye con uno cualquiera de R (arg), K (lys), W (trp), S (ser), H (his) o N (asn);
- posición 8, en donde G (gly) se sustituye con uno cualquiera de D (asp), E (glu), N (asn), Q (gln), K (lys), R (arg) o A (ala); o
- posición 9, en donde P (pro) se sustituye con uno cualquiera de M (met), A (ala), I (ile), K (lys), R (arg), Q (gln), S (ser), T (thr) o Y (tyr).
2. Un epítopo aislado que consiste en un primer segmento de acuerdo con la reivindicación 1 y un segundo segmento, en donde:

- (i) el primer segmento es: el fragmento de KVNPPQGGPPEEK (SEQ ID NO: 1) que consiste en VNPQGGPPEEK (SEQ ID NO: 2), KVNPPQGGPPE (SEQ ID NO: 5) o KVNPPQGGPP (SEQ ID NO: 6); la variante de KVNPPQGGPPE (SEQ ID NO: 5); o la variante de KVNPPQGGPP (SEQ ID NO: 6); y
- 5 (ii) el segundo segmento consiste en una secuencia de aminoácidos TQNARA (SEQ ID NO: 8).
3. El epítipo de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el segundo segmento consiste en una secuencia de aminoácidos TQNARAFRD (SEQ ID NO: 7).
- 10 4. Un epítipo aislado que consiste en un primer segmento de acuerdo con la reivindicación 1 y un segundo segmento, en donde:
- (i) el primer segmento es: el fragmento de KVNPPQGGPPEEK (SEQ ID NO: 1) que consiste en NPQGGPPEE (SEQ ID NO: 4); o la variante de NPQGGPPEE (SEQ ID NO: 4); y
- 15 (ii) el segundo segmento consiste en una secuencia de aminoácidos ALSTASDDR (SEQ ID NO: 9).
5. Un epítipo aislado que consiste en un primer segmento de acuerdo con la reivindicación 1 y un segundo segmento, en donde:
- 20 (i) el primer segmento es: el fragmento de KVNPPQGGPPEEK (SEQ ID NO: 1) que consiste en VNPQGGPPEE (SEQ ID NO: 3); y
- (ii) el segundo segmento del epítipo consiste en:
- 25 una secuencia de aminoácidos PRERPP (SEQ ID NO: 10) o  
una secuencia de aminoácidos QDASDDGSGS (SEQ ID NO: 11).
- 30 6. Un epítipo aislado que consiste en un primer segmento de acuerdo con la reivindicación 1, un segundo segmento y un tercer segmento en donde:
- (i) el primer segmento es: el fragmento de KVNPPQGGPPEEK (SEQ ID NO: 1) que consiste en VNPQGGPPEE (SEQ ID NO: 3); y
- 35 (ii) el segundo segmento consiste en una secuencia de aminoácidos PRERPP (SEQ ID NO: 10), y el tercer segmento consiste en una secuencia de aminoácidos QDASDDGSGS (SEQ ID NO: 11).
- 40 7. Un epítipo aislado que comprende el segmento del epítipo de acuerdo con la reivindicación 1, y que consiste en la secuencia de aminoácidos CGELYTQNARAFRDLCGNPKVNPPQGGPPEEKRRRGC (SEQ ID NO: 12).
8. Un ácido nucleico que codifica el epítipo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 45 9. Un método para detectar cáncer de próstata en un sujeto, el método comprende detectar la presencia de un epítipo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en una muestra biológica de un sujeto, y determinar que el sujeto tiene cáncer de próstata o una mayor probabilidad de desarrollar cáncer de próstata basado en la cantidad del epítipo detectado en la muestra.
- 50 10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la detección de la presencia del epítipo en la muestra comprende poner en contacto la muestra con una entidad de unión capaz de unirse específicamente a un epítipo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la entidad de unión es una población de anticuerpos.
- 55 12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la población de anticuerpos comprende uno o más de: anticuerpo MIL38 (CBA20140026), anticuerpo policlonal anti-GPC-1 de conejo (ab137604, abcam), anticuerpo monoclonal anti-glipicano de ratón 2600 clon 4D1 (Millipore) o anticuerpo anti-glipicano 1 de cabra (AA 24-530).
- 60 13. Una proteína de fusión que comprende el epítipo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
14. El uso del epítipo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o la proteína de fusión de acuerdo con la reivindicación 13, como un elemento de control positivo en un método para detectar el GPC-1.



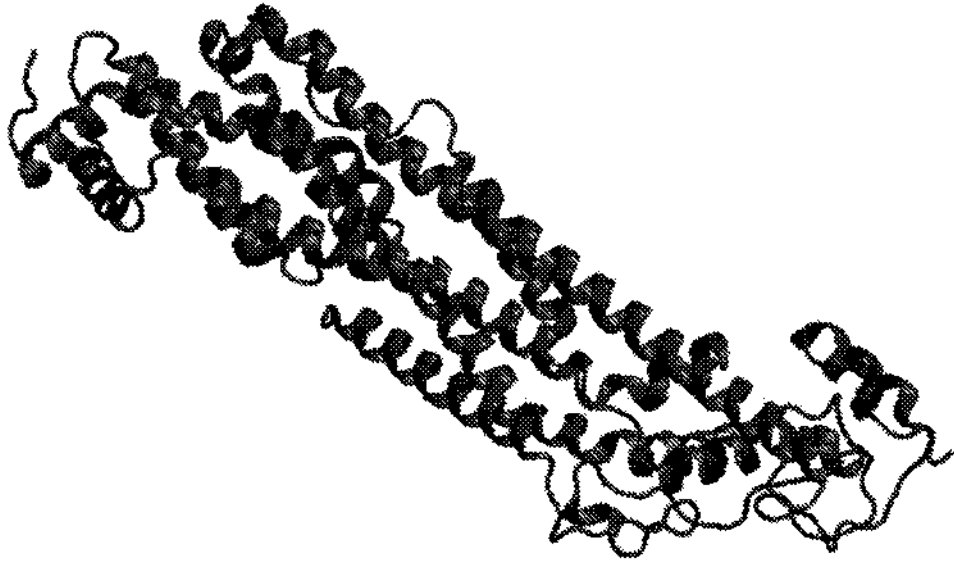


FIGURA 1

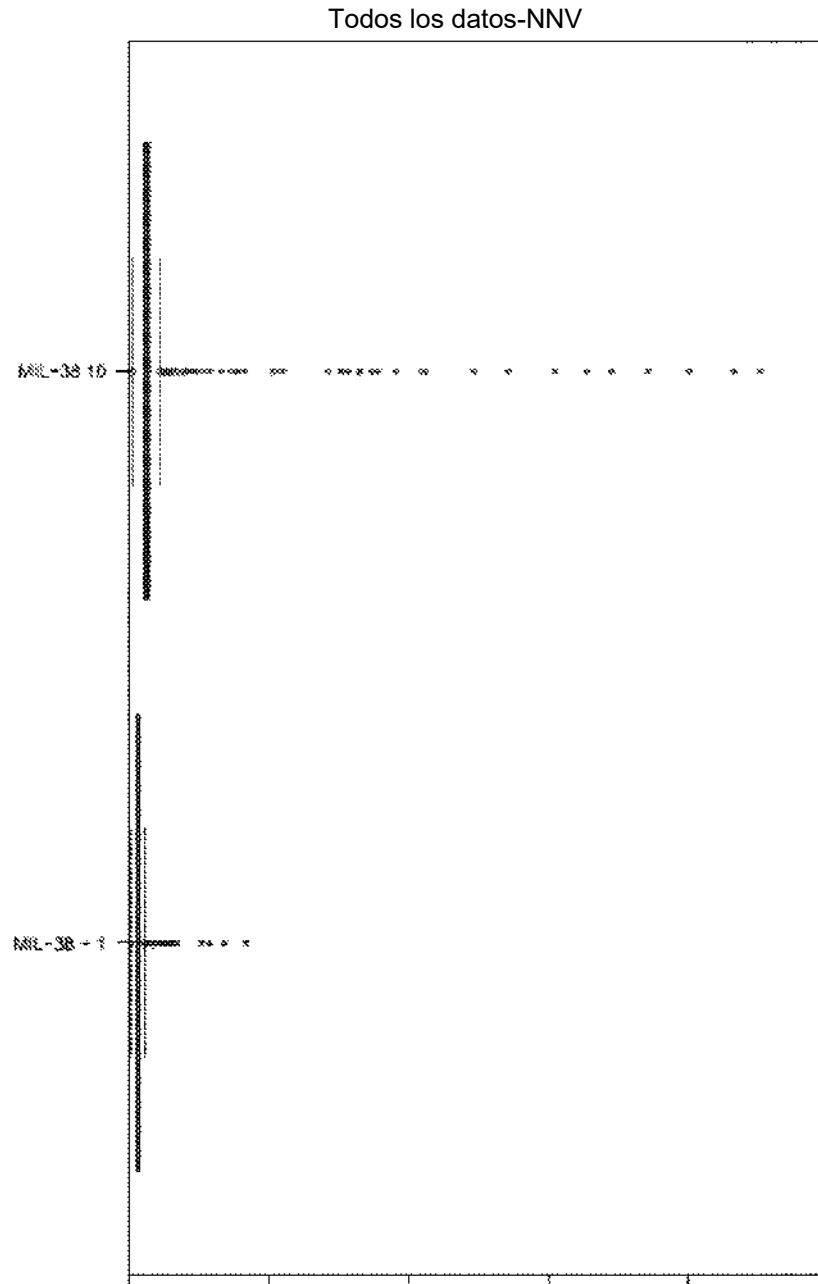


FIGURA 2

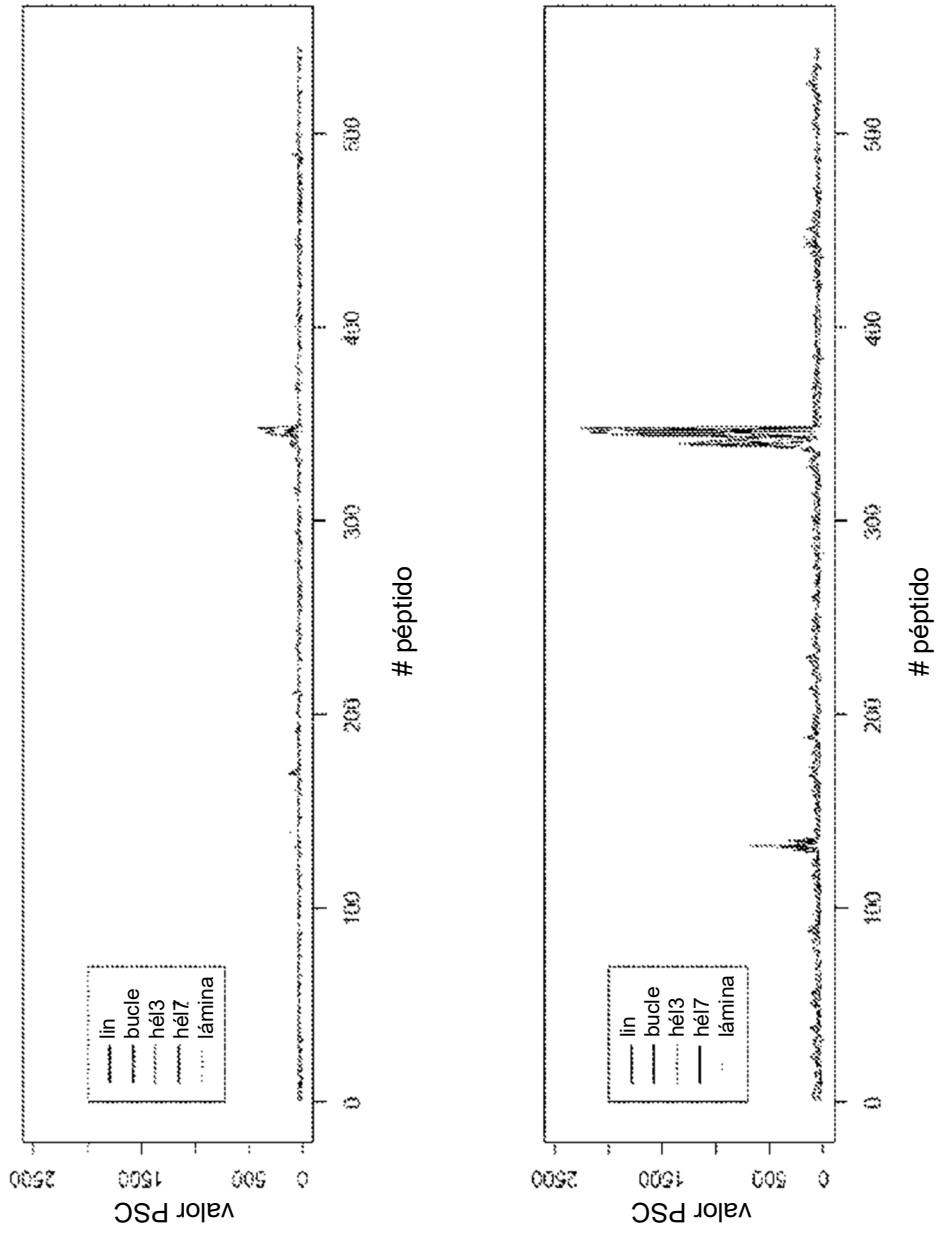


FIGURA 3

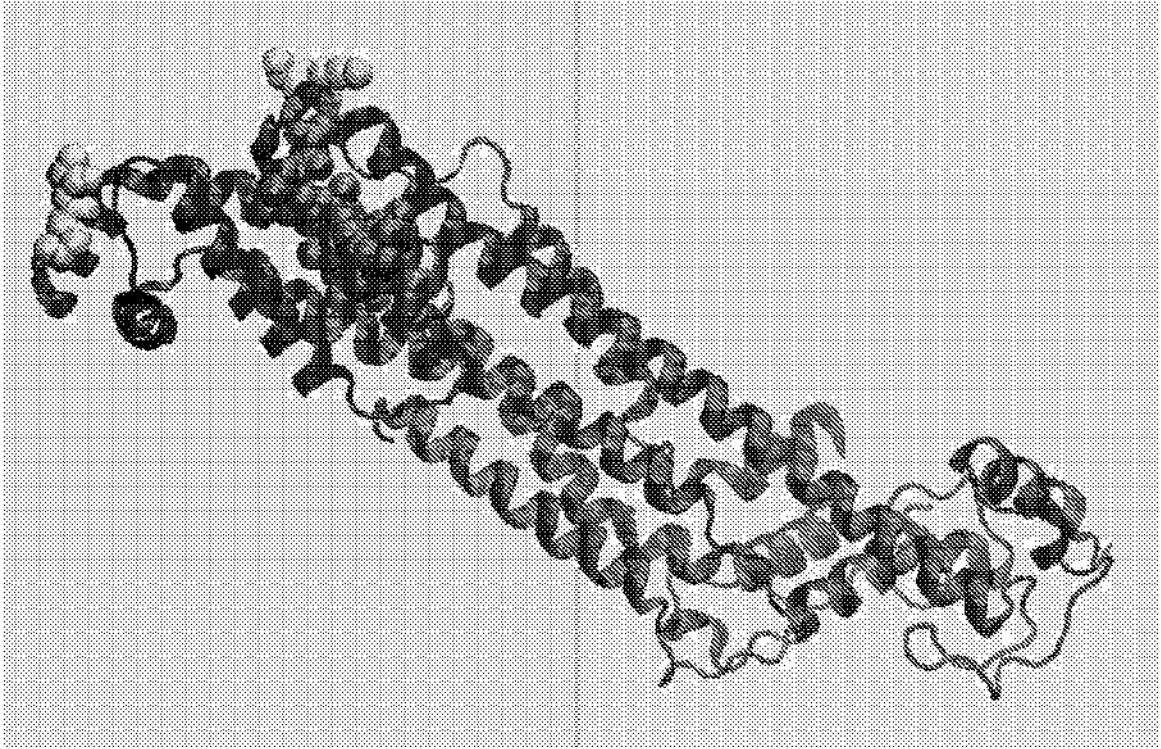


FIGURA 4

Todos los datos-NNV

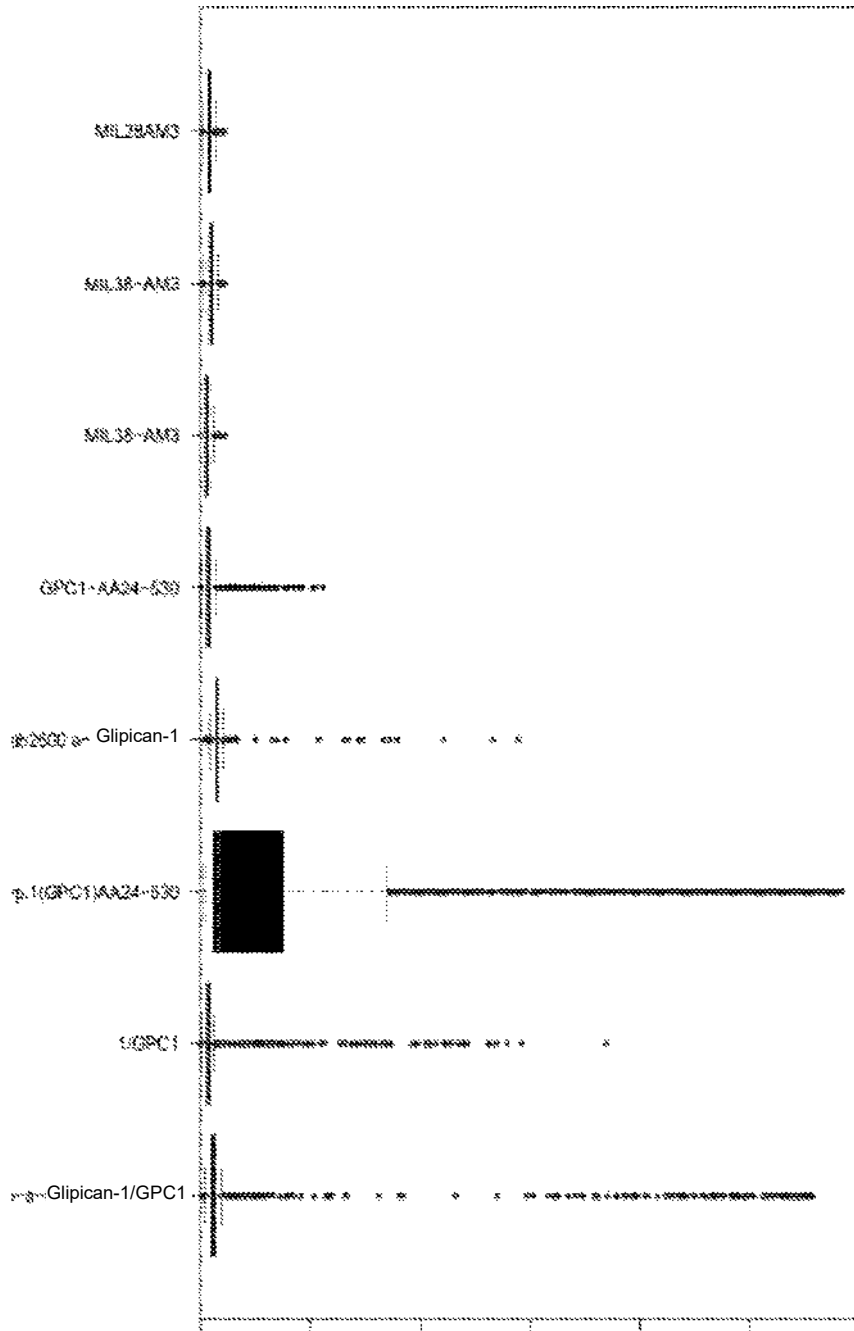


FIGURA 5

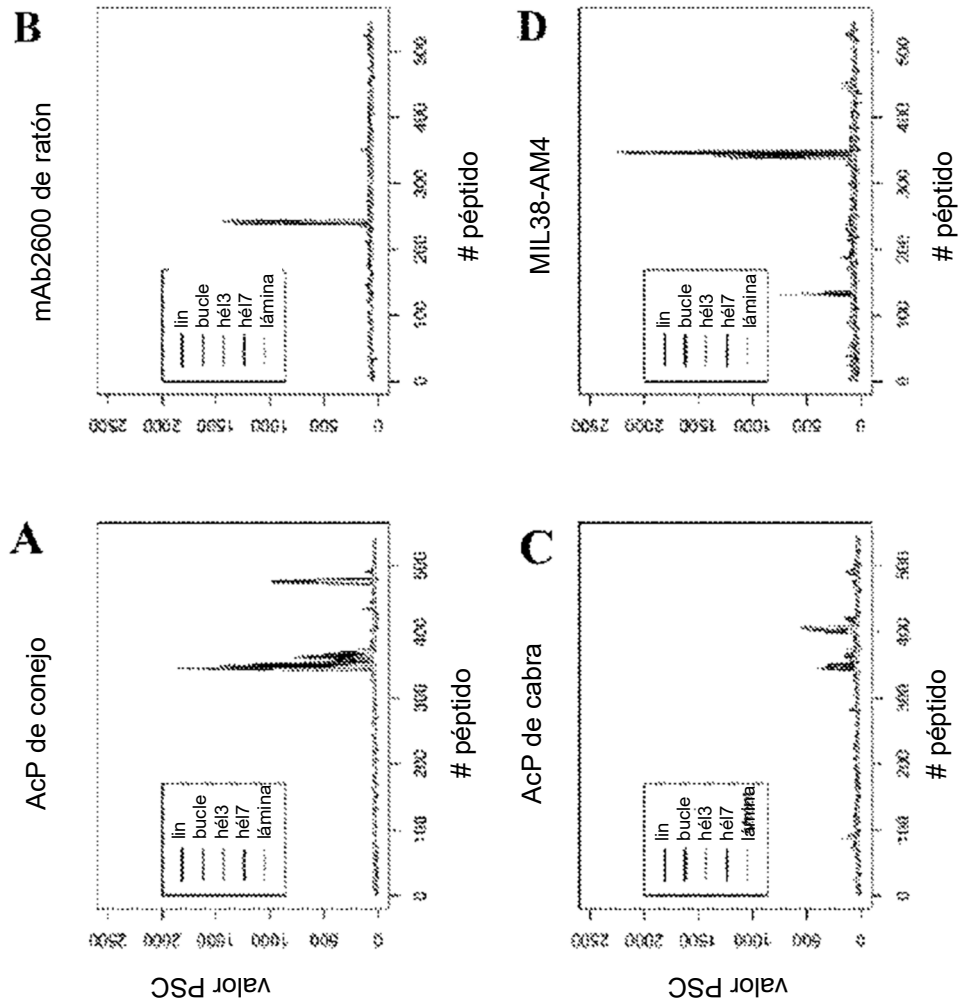


FIGURA 6

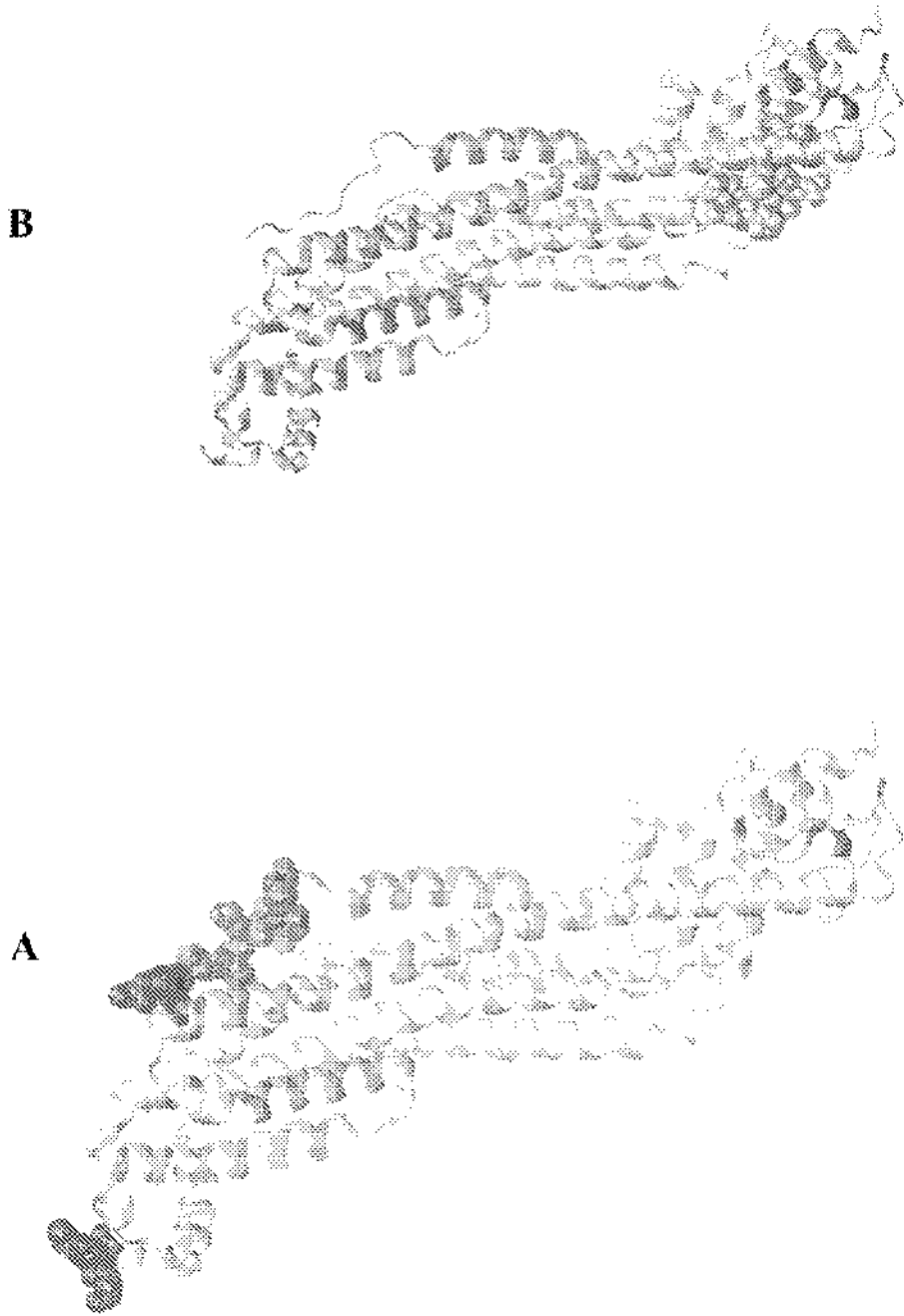


FIGURA 7

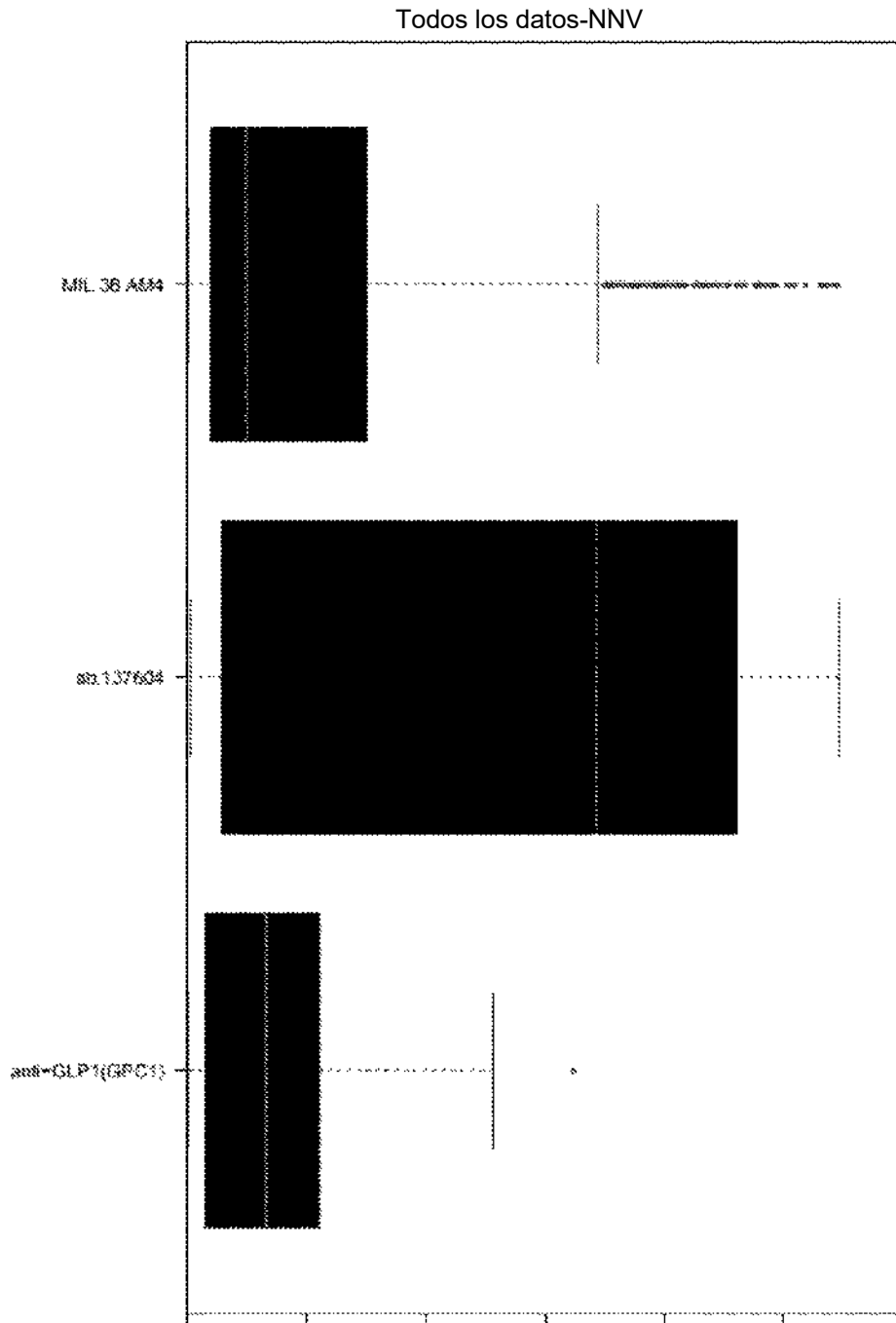
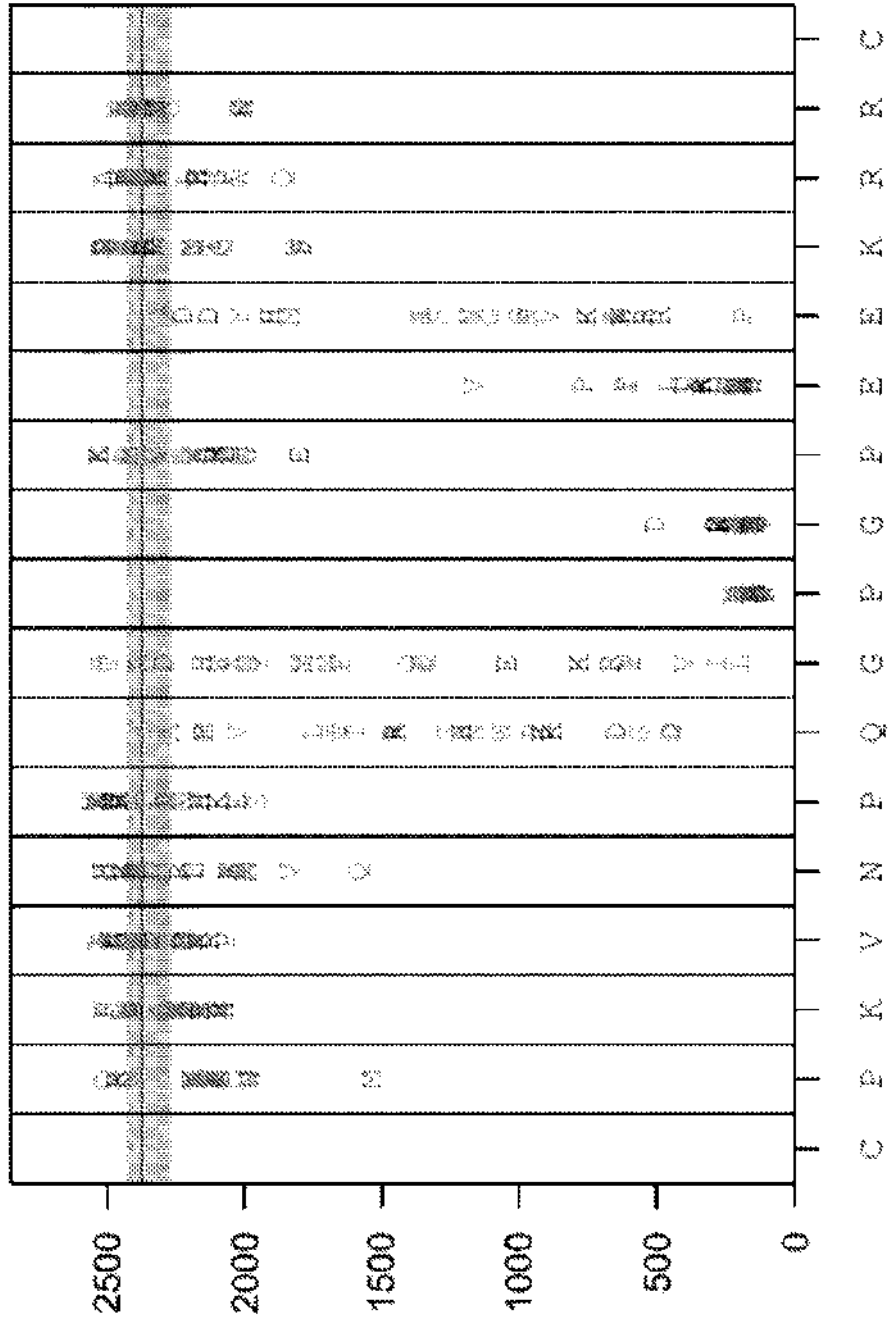


FIGURA 8



sb.137604 - RN.PKVNPGGFGPEEKRR\_ BUCLE (SEQ ID NO: 17)



(SEQ ID NO: 22)

FIGURA 9

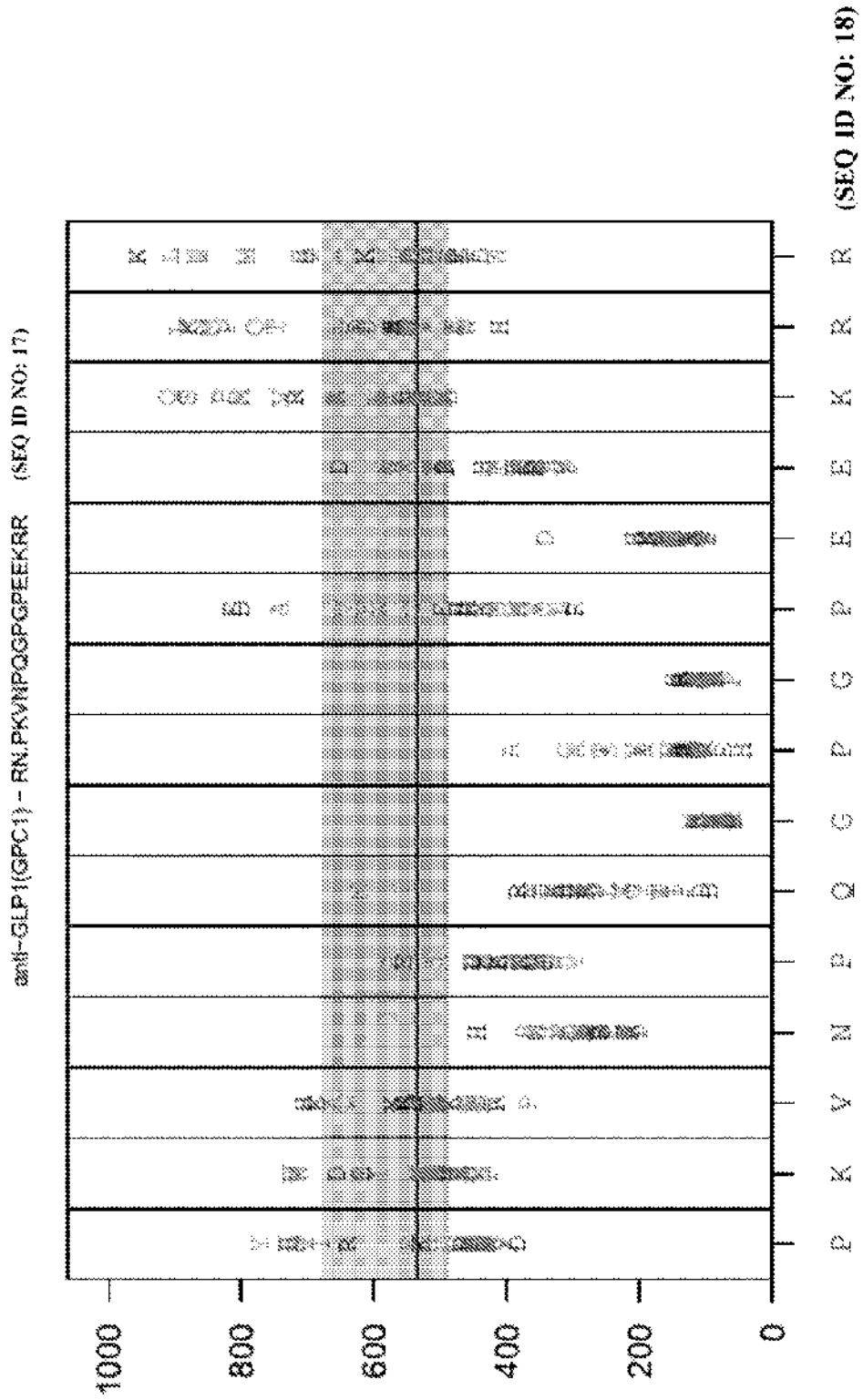


FIGURA 10

MIL 38 AM4 - RN PKVNFQGGPPEEKR (SEQ ID NO: 17)

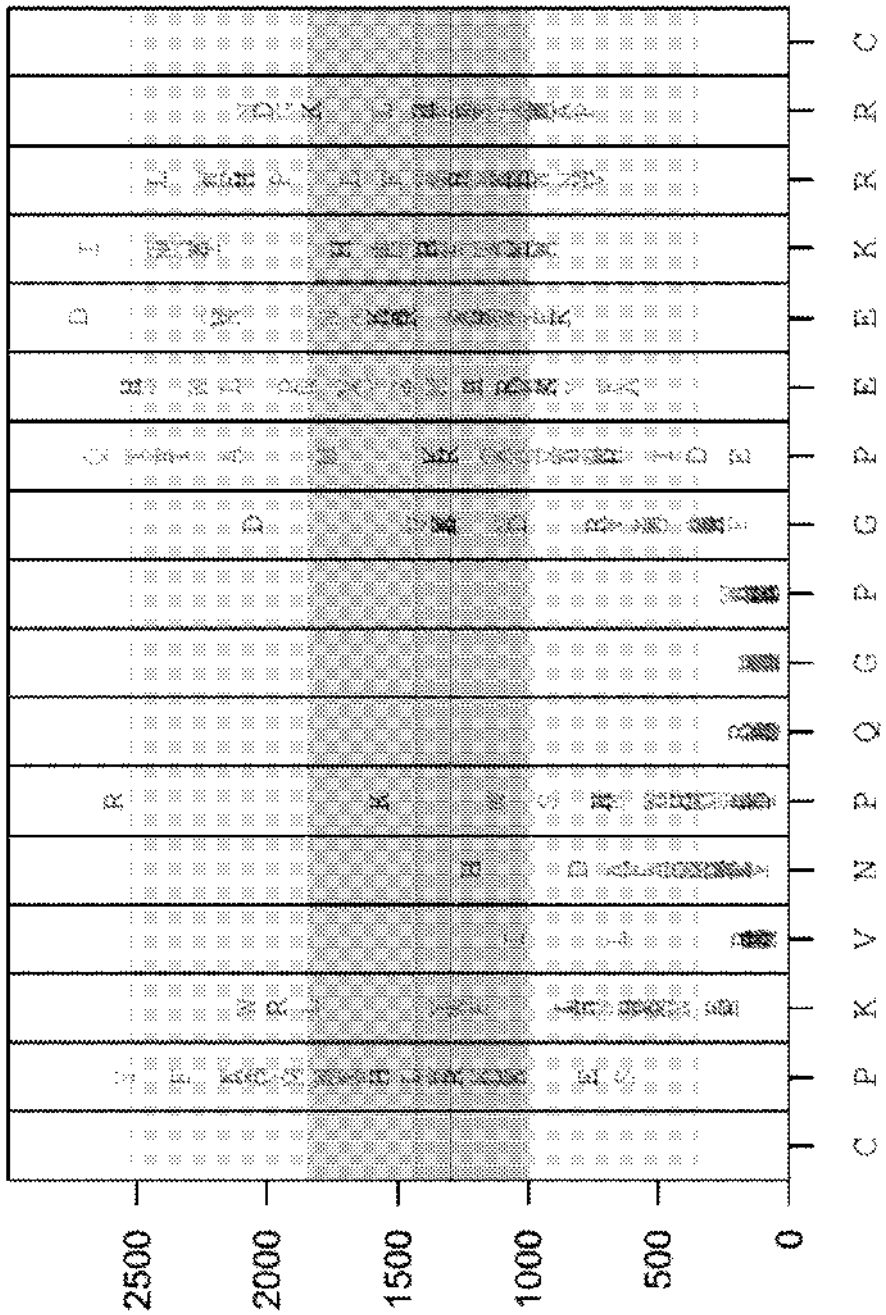


FIGURA 11

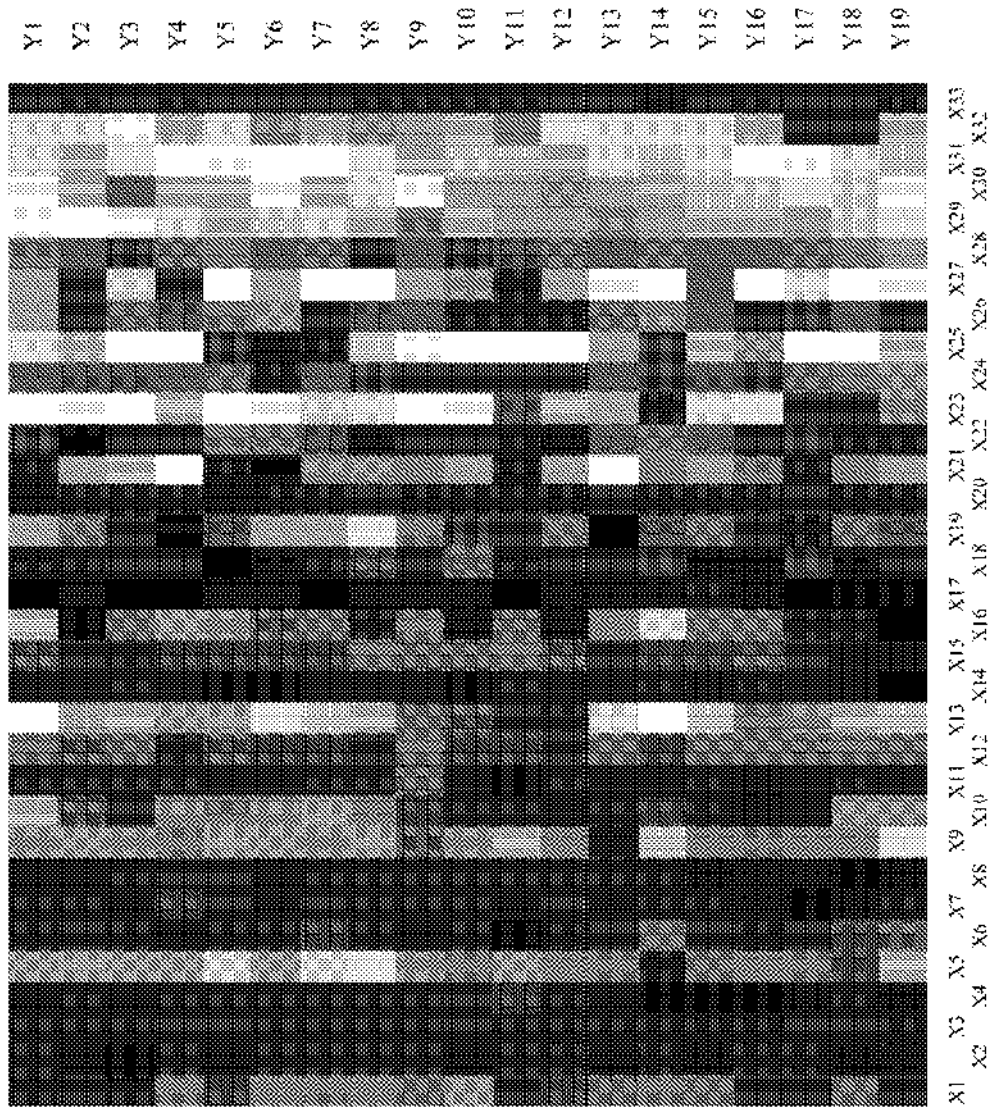


FIGURA 12

W 1 6 3 5 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

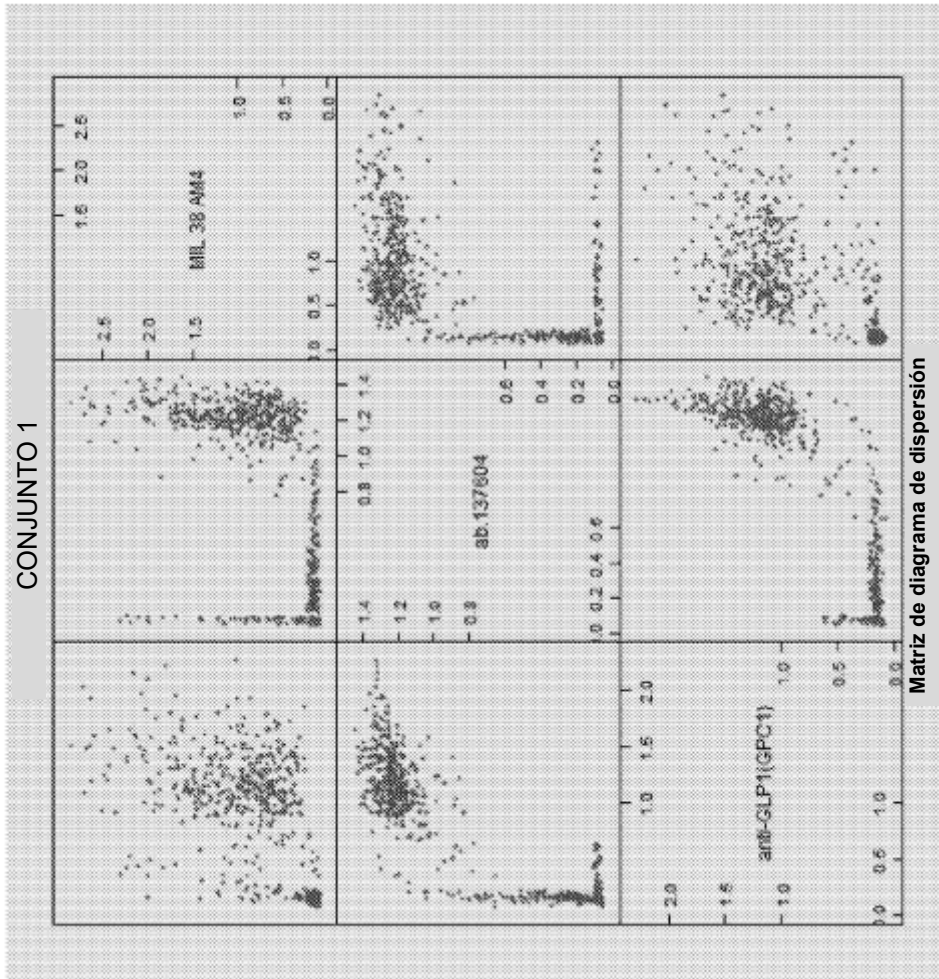
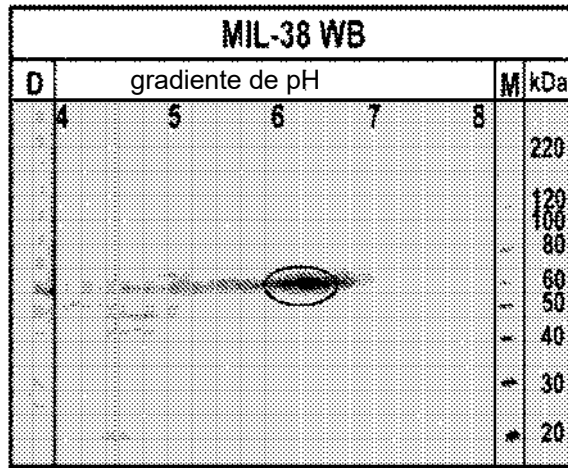
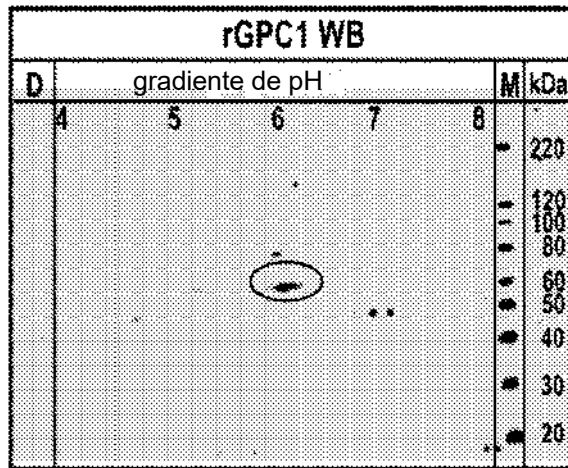


FIGURA 13



30 segundos de exposición



1 min de exposición

FIGURA 14

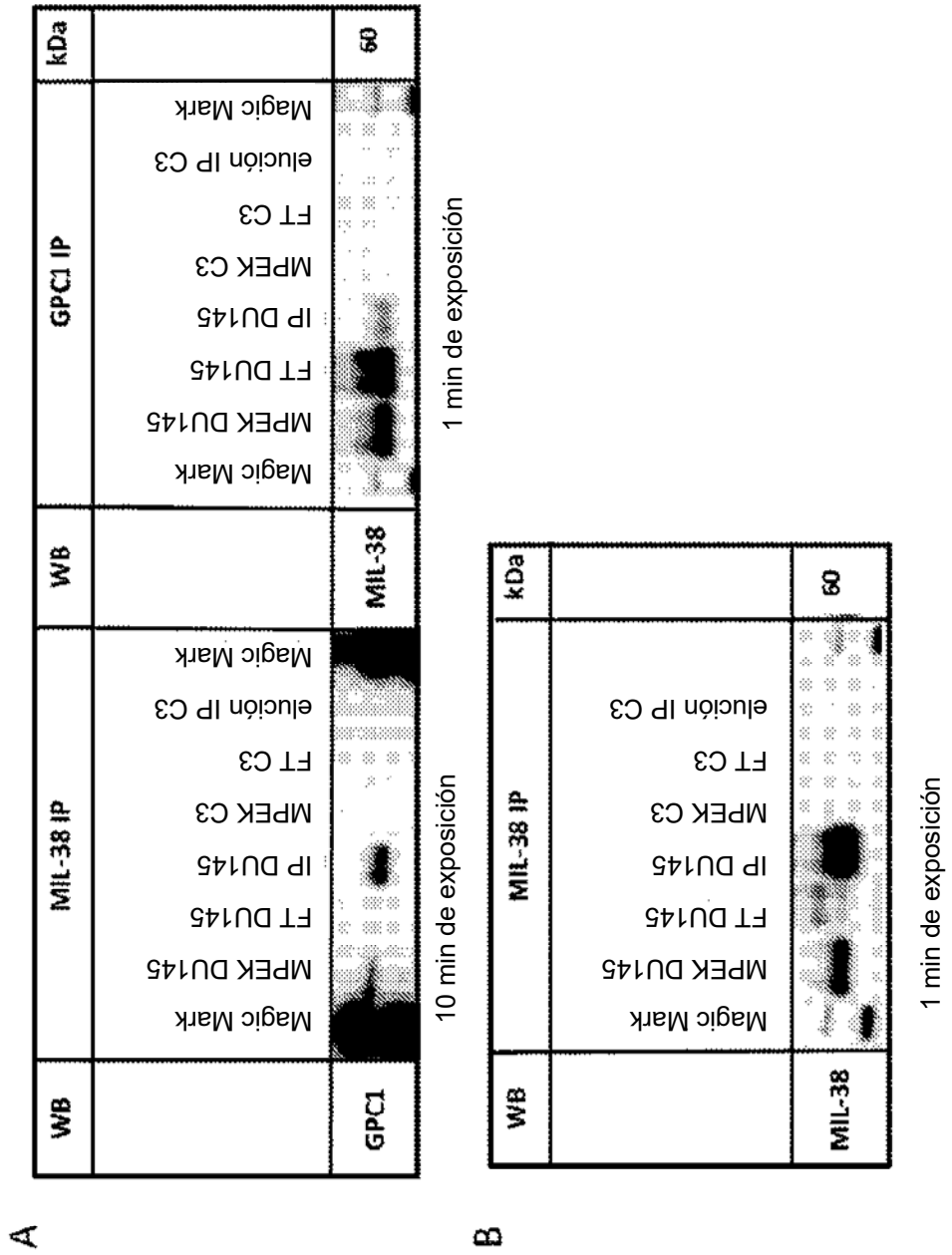


FIGURA 15

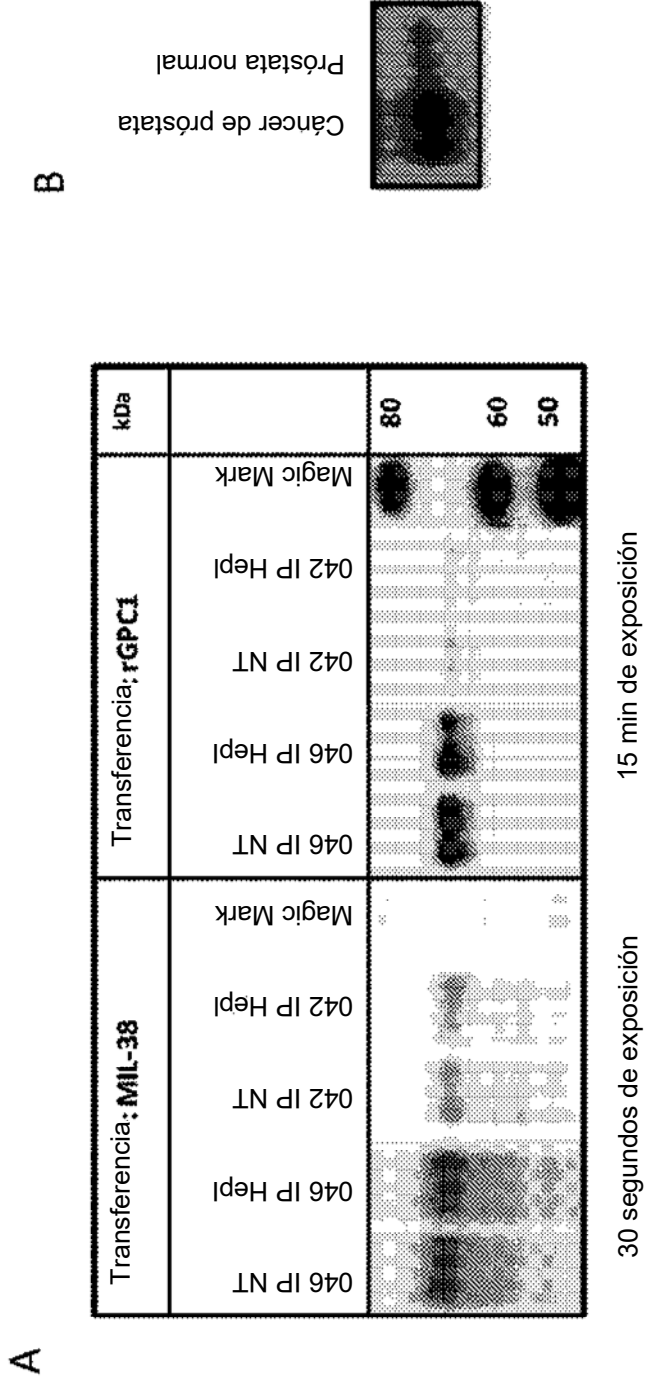


FIGURA 16