

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 823 798**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.12.2014** **PCT/US2014/073013**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.07.2016** **WO16108894**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.12.2014** **E 14909690 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2020** **EP 3240566**

54 Título: **Anticuerpos humanizados específicos de alfa-enolasa y procedimientos de usos en la terapia del cáncer**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.05.2021

73 Titular/es:

**DEVELOPMENT CENTER FOR BIOTECHNOLOGY
(50.0%)
No. 101 Lane 169 Kangning St.
New Taipei City 221 , TW y
NATIONAL HEALTH RESEARCH INSTITUTES
(50.0%)**

72 Inventor/es:

**TSAI, SHIH-CHONG;
YUAN, TA-TUNG;
TSENG, SHIH-CHI;
LAI, JIANN-SHIUN;
WU, CHIA-CHENG;
HUANG, CHAO-YANG;
TSAI, YA-WEI;
LOK, YING-YUNG;
WU, CHUNG-HSIUN;
SHIH, NENG-YAO;
LIU, KO-JIUNN y
CHEN, LI-TZONG**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 823 798 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos humanizados específicos de alfa-enolasa y procedimientos de usos en la terapia del cáncer

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un anticuerpo humanizado o un fragmento de unión de este, que se une específicamente a la proteína alfa-enolasa humana (ENO1). La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento del cáncer de pulmón, mama, páncreas, hígado, colorrectal, o próstata, comprendiendo la composición farmacéutica dicho anticuerpo humanizado o un fragmento de unión de este. Además, la presente invención se refiere a un vector de expresión que codifica dicho anticuerpo, o el fragmento de unión de este, y a una célula que contiene dicho vector de expresión.

15 **Antecedentes de la invención**

Los tumores son el resultado de la proliferación aberrante, desenfrenada de una sola célula, lo que genera un clon de células transformadas. El cáncer se caracteriza por el crecimiento autónomo de las células tumorales y la capacidad de hacer metástasis a sitios distantes.

20 Las células tumorales pueden expresar antígenos únicos que pueden reconocerse por el sistema inmunológico. Los antígenos asociados a tumores incluyen, pero no se limitan a, oncogenes mutados, proteínas celulares normales mutadas, proteínas celulares expresadas de manera aberrante, proteínas anormales de la superficie celular, y proteínas virales oncogénicas. El sistema inmunológico considera estos antígenos asociados a tumores como no propios y puede producir anticuerpos para erradicar estas células tumorales portadoras de antígenos extraños, sin afectar a las células sanas. Por lo tanto, la identificación de antígenos inmunogénicos asociados a tumores puede usarse como objetivos para aplicaciones terapéuticas o de pronóstico clínico en el tratamiento del cáncer.

30 Ciertas neoplasias pueden identificarse por derrame pleural, que es un exceso de fluido en el espacio entre el pulmón y la pared torácica. El carcinoma de pulmón, el carcinoma de mama, y el linfoma causan aproximadamente 75 % de todos los derrames pleurales malignos. El derrame pleural maligno puede enriquecerse con infiltrados linfocíticos y células tumorales. Se han encontrado autoanticuerpos o inmunocomplejos asociados a tumores, tales como anticuerpos anti-p53, antinucleares, y anti-c-Myc, en los líquidos de derrame y se asocian con un pronóstico precario. Además se han identificado varios antígenos asociados a tumores de pulmón en derrames malignos, que incluyen fragmentos de citoqueratina 19, enolasa específica de neuronas (ENO2), antígeno de carcinoma de células escamosas, y HLA-I soluble, etc.

40 La alfa-enolasa (enolasa-1, ENO1) es una proteína funcional múltiple, que se encontró por primera vez como una enzima clave de las vías de la glucólisis. En condiciones normales, ENO1 se expresa en el citosol. Sin embargo, también se encuentra que ENO1 se expresa en las superficies celulares de muchas células cancerosas tales como un receptor de plasminógeno y en células hematopoyéticas activadas, tales como neutrófilos, linfocitos y monocitos. Se conoce que la regulación positiva de las proteínas receptoras del plasminógeno puede inducir una respuesta en cascada del sistema de activación del plasminógeno uroquinasa (uPAS).

45 El sistema activador del plasminógeno uroquinasa (uPAS) consiste en el activador del plasminógeno uroquinasa (uPA), su receptor afín (uPAR) y dos inhibidores específicos, el inhibidor de activador del plasminógeno 1 (PAI-1) y el inhibidor de activador del plasminógeno 2 (PAI-2). El activador del plasminógeno uroquinasa convierte la proenzima del plasminógeno en una proteasa serina activa, plasmina. La plasmina se involucra en una serie de procedimientos de remodelación tisular, tal como la remodelación de la membrana basal (BM) y la matriz extracelular (ECM), que es necesaria en la progresión y metástasis tumoral. Además, se ha demostrado que el uPAS puede involucrarse en la evolución neoplásica, afectando la angiogénesis tumoral, la proliferación de células malignas, la adhesión y migración, la intravascularización, y el crecimiento en el sitio metastásico.

50 Específicamente, la activación del plasminógeno puede resultar en degradaciones de la matriz extracelular, que a su vez pueden conducir a un aumento de la metástasis de las células cancerosas y la infiltración de células inmunes. En otras palabras, la expresión de ENO1 en las superficies de las células cancerosas como un receptor de plasminógeno puede aumentar las actividades de invasión de las células cancerosas. Por lo tanto, ENO1 es un objetivo potencial para la terapia del cáncer.

60 El documento de patente núm. US 2011/182907 A1 divulga anticuerpos anti-ENO1 y variantes humanizadas de estos. El documento de patente núm. WO 2010/032899 A2 divulga los anticuerpos anti-ENO1 humana. K.-C. Hsiao y otros: "Surface [alpha]-Enolase Promotes Extracellular Matrix Degradation and Tumor Metastasis and Represents a New Therapeutic Target", PLOS ONE, vol. 8, tema 7, 2013, páginas 1-15, divulga un anticuerpo anti-ENO1 murino. A. Redlitz y otros: "The Role of an Enolase-Related Molecule in Plasminogen Binding to Cells", Eur. J. Biochem., vol. 227, núm. 1-2, 1995, páginas 407-415, divulga que los anticuerpos anti-ENO1 que se unen a ENO1-R426-K434 C-terminal inhiben la unión del plasminógeno a ENO1. A. Díaz-Ramos y otros: "Requirement of Plasminogen Binding to Its Cell-Surface Receptor alpha-Enolase for Efficient Regeneration of Normal and Dystrophic Skeletal Muscle", PLOS

ONE, vol. 7, tema 12, páginas 1-13, divulga el efecto del anticuerpo anti-ENO1 denominado Mab 11G1 en la generación de actividad de plasmina pericelular. R. Lopez-Aleman y otros: "Inhibition of cell surface mediated plasminogen activation by a monoclonal antibody against [alpha]-Enolase: Inhibition of Cell Surface Mediated Plasminogen Activation", American Journal of Hematology, vol. 72, núm. 4, 2003, páginas 234-242, divulga un anticuerpo anti-ENO1 denominado Mab 11G1 producido en ratones. M. Capello, " [alpha]-enolase: a promising therapeutic and diagnostic tumor target", FEBS Journal, vol. 278, núm. 7, 2011, páginas 1064-1074, divulga el papel de ENO 1 en el cáncer y la metástasis. M. Kügler y otros: "Stabilization and humanization of a single-chain Fv antibody fragment specific for human lymphocyte antigen CD19 by designed point mutations and CDR-grafting onto a human framework", Protein Engineering, Design & Selection, vol. 22, núm. 3, 2009, páginas 135-147, divulga la estabilización y humanización de un fragmento de anticuerpo scFv específico para CD 19 que usa el marco aceptor humano más estable huVk3-huVH3. S. Jung, "Improving in vivo folding and stability of a single-chain Fv antibody fragment by loop grafting", Protein Engineering, vol. 10, núm. 8, 1997, páginas 959-966, divulga el injerto de CDR de un anticuerpo de unión a fluoresceína en el marco del anticuerpo humanizado 4D5. M.-P. Lefranc y otros: "Use of IMGT(R) databases and tools for antibody engineering and humanization", Molecular typing of blood cell antigens en: Methods in Molecular Biology, ISSN 1064-3745; vol. 1310; Humana Press, US, vol. 907, 2012, páginas 3-37, divulga una estrategia de humanización mediante el uso de la base de datos IMGT. T. Kuramochi y otros: "Humanization and Simultaneous Optimization of Monoclonal Antibody", Antibody-drug conjugates en: Methods in Molecular Biology, ISSN 1064-3745; vol. 1045; vol. 1060, 2014, páginas 123-137, divulga una estrategia para humanizar anticuerpos monoclonales de optimización de manera simultánea en la que para seleccionar una secuencia marco humana pueden usarse varias bases de datos tales como IMGT, V Base, EMBL o NCBI. El documento de patente núm. WO 2015/094330 A1 constituido antes de la técnica de conformidad con el Art. 54(3) EPC y divulga anticuerpos humanizados que comprenden las HCDR y LCDR del anticuerpo anti-ENO1 designado EN10.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un anticuerpo humanizado, o un fragmento de unión de este, de acuerdo con la reivindicación 1, a una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento del cáncer de pulmón, mama, páncreas, hígado, colorrectal, o próstata de acuerdo con la reivindicación 8, a un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 9 y a una célula que contiene dicho vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 10. Las realizaciones preferentes de la invención se definen en las reivindicaciones subordinadas 2 a 7 y 11. Como se usa en la presente memoria, el término "agentes de unión dirigidos" (por ejemplo, anticuerpos, o fragmentos de unión de estos) significa agentes que se unen específicamente a ENO1 humana, inhibiendo de ese modo la unión de ligando (por ejemplo, plasminógeno) a ENO1. Al inhibir la unión del plasminógeno a ENO1, los agentes de unión dirigidos de la invención pueden inhibir la activación del plasminógeno, lo que conduce a la degradación reducida de la matriz extracelular, que a su vez previene o reduce la disociación de las células cancerosas de la matriz extracelular. Por lo tanto, los agentes de unión dirigidos de acuerdo con las realizaciones de la invención se pueden usar para inhibir el crecimiento tumoral y la metástasis. Los mecanismos mediante los cuales puede lograrse esto pueden incluir, pero no se limitan a, la inhibición de la unión de un ligando (tal como el plasminógeno) a su receptor ENO1, o la abrogación de las interacciones entre el receptor ENO1 y sus ligandos, reduciendo de ese modo la eficacia concentración de ENO1.

Como se usa en la presente memoria, un agente de unión dirigido es un anticuerpo humanizado que puede unirse a ENO1 humana para prevenir que sus ligandos se unan (por ejemplo, plasminógeno) a ENO1. La prevención de la unión del plasminógeno al receptor puede prevenir la activación del plasminógeno. Esto resulta en la inhibición del sistema de activación del plasminógeno uroquinasa (uPAS) en la matriz extracelular de las células cancerosas.

Preferentemente, el anticuerpo humanizado de acuerdo con la presente invención puede unirse a ENO1 con altas afinidades, tal como con una K_d de menos de 0,3 nM. Tales agentes de unión fuertes pueden inhibir ENO1 con altas eficiencias.

Como se usa en la presente memoria, un agente de unión dirigido es un anticuerpo humanizado que puede unirse a ENO1 humana e inhibir la actividad de plasmina inducida en células cancerosas con altas eficiencias, tales como inhibición de 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 %. Los ensayos de inhibición pueden realizarse induciendo la expresión de ENO1 (por lo tanto, activación del plasminógeno) en una célula cancerosa (tal como las células de linfoma humano U937) mediante el tratamiento con un inductor, tal como el lipopolisacárido (LPS) (por ejemplo, 10 microgramos/mL, durante 5 horas). La inhibición de tal actividad de plasmina inducida puede ensayarse con un anticuerpo a una concentración adecuada. Mediante el uso de un anticuerpo de la invención, tal inhibición puede detectarse a concentraciones de anticuerpos tan bajas como 20 microgramos/ml o menos.

El agente de unión dirigido es un anticuerpo que puede unirse a ENO1 humana. Un anticuerpo de ese tipo puede usarse para inhibir la actividad de invasión de una célula cancerosa. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención pueden inhibir más del 40 %, 50 %, 60 %, o 70 % de la actividad de invasión de las células de linfoma humano U937 a concentraciones de anticuerpos tan bajas como 50 microgramos/ml o menos.

Preferentemente, el agente de unión dirigido es un anticuerpo que puede unirse a ENO1 humana para inhibir la degradación de la matriz extracelular, inhibiendo de ese modo la disociación de las células cancerosas de la matriz

extracelular. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede inhibir más del 40 %, 50 %, o 60 % de la disociación mediada por plasminógeno de las células CL1-5 del colágeno o fibronectina a concentraciones de anticuerpos tan bajas como 50 microgramos/ml o menos.

- 5 Preferentemente, el agente de unión dirigido (es decir, un anticuerpo humanizado) comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 1, 10 u 11.

Preferentemente, el agente de unión dirigido (es decir, un anticuerpo humanizado) comprende una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 2 o 9.

- 10 El agente de unión dirigido (es decir, un anticuerpo) puede comprender una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que tiene una región determinante de complementariedad (CDR) que comprende una de las secuencias de CDR incluidas en las secuencias 1, 10 u 11. Cabe señalar que los expertos en la técnica pueden realizar fácilmente las determinaciones de CDR. Ver por ejemplo, Kabat y otros, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", Quinta Edición, Publicación NIH 91-3242, Bethesda Md. (1991), vols. 1-3.

- 15 El agente de unión dirigido (es decir, un anticuerpo) puede comprender una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que tiene una región determinante de complementariedad (CDR) que comprende una de las secuencias de CDR incluidas en la secuencia 2 o 9 (Figura 6B).

- 20 El agente de unión dirigido es un anticuerpo humanizado, o un fragmento de unión de este, en el que el anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal.

- 25 Preferentemente, el anticuerpo humanizado que puede unirse a la proteína ENO1 humana comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que comprende cualquiera de las secuencias de LCDR1, LCDR2 o LCDR3 incluidas en la SEQ ID NO: 9 (Figura 6B).

- 30 Preferentemente, el anticuerpo humanizado puede unirse a la proteína ENO1 humana que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que comprende dos cualesquiera de las secuencias LCDR1, LCDR2 o LCDR3 incluidas en la secuencia 2 o 9 (es decir, LCDR1 y LCDR2, LCDR1 y LCDR3 o LCDR2 y LCDR3).

- 35 Preferentemente, el anticuerpo humanizado que puede unirse a la proteína ENO1 humana comprende secuencias de aminoácidos de cadena ligera que comprenden secuencias de LCDR1, LCDR2 y LCDR3 incluidas en la secuencia 2 o 9 (Figura 6B). De acuerdo con ciertas realizaciones de la invención, un anticuerpo puede ser un anticuerpo humanizado o un anticuerpo monoclonal completamente humano.

- 40 Preferentemente, el anticuerpo humanizado que puede unirse a la proteína ENO1 humana comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende cualquiera de las secuencias de HCDR1, HCDR2 o HCDR3 incluidas en la secuencia 1, 10 u 11 (Figura 6A y Figura 6B).

- 45 Con mayor preferencia, el anticuerpo humanizado que puede unirse a la proteína ENO1 humana comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende dos cualesquiera de las secuencias HCDR1, HCDR2 o HCDR3 incluidas en la secuencia 1, 10 u 11 (Figura 6A y Figura 6B). (es decir, HCDR1 y HCDR2, HCDR1 y HCDR3 o HCDR2 y HCDR3).

- Con la máxima preferencia, el anticuerpo humanizado que puede unirse a la proteína ENO1 humana comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que comprende las secuencias HCDR1, HCDR2 y HCDR3 incluidas en la secuencia 1, 10 u 11 (Figura 6A y Figura 6B).

- 50 El anticuerpo humanizado que puede unirse a la proteína ENO1 humana puede comprender una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que tiene una CDR que comprende una de las secuencias de CDR incluidas en la secuencia 2 o 9 (Figura 6B). Preferentemente, el anticuerpo humanizado puede unirse a la proteína ENO1 humana y puede comprender una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que tiene una CDR que comprende una de las secuencias mostradas en la secuencia 1, 10 u 11. Con mayor preferencia, el anticuerpo humanizado que puede unirse a la proteína ENO1 humana comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que tiene una de las secuencias de CDR incluidas en la secuencia 1, 10 u 11, y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que tiene una de las secuencias de CDR incluidas en la secuencia 2 o 9.

- 60 El agente de unión dirigido (es decir, un anticuerpo) puede competir por la unión del plasminógeno a la proteína ENO1 humana. Preferentemente, dicho agente de unión dirigido comprende una secuencia de aminoácidos de cadena pesada que tiene al menos una de las secuencias de CDR incluidas en la secuencia 1, 10 u 11, y una secuencia de aminoácidos de cadena ligera que tiene al menos una de las secuencias de CDR incluidas en la secuencia 2 o 9.

- 65 Otras realizaciones de la invención se refieren a una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de un sujeto (por ejemplo, ser humano o animal) que padece una enfermedad o enfermedad ENO1 seleccionada del grupo

de cánceres de pulmón, mama, páncreas, hígado, colorrectal, y próstata. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir seleccionar un sujeto que necesite un tratamiento para una enfermedad neoplásica o no neoplásica, y administrar al sujeto una dosis terapéuticamente eficaz de un anticuerpo (que puede ser un anticuerpo monoclonal humanizado o completamente humano) que se une específicamente a la proteína ENO1.

Preferentemente, el anticuerpo humanizado puede unirse a ENO1 humana con afinidad muy alta (es decir, K_d baja). Por ejemplo, un anticuerpo humanizado que es capaz de unir ENO1 con una K_d menos de aproximadamente 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} o aproximadamente 10^{-11} M, o cualquier intervalo o valor más entre ellos. Las mediciones de afinidad y/o avidéz pueden realizarse mediante el uso de ELISA y/o BIACORE, como se describe en la presente memoria o de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica.

Se apreciará que las realizaciones de la invención no se limitan a ninguna forma particular de un anticuerpo o procedimiento de generación o producción. Por ejemplo, el anticuerpo anti-ENO1 puede ser un anticuerpo de longitud completa (por ejemplo, que tiene una región Fc humana intacta) o un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un Fab, Fab' o F(ab')₂, FV o Dab (los Dab son las unidades de unión funcionales más pequeñas de los anticuerpos humanos). Además, el anticuerpo puede fabricarse a partir de una célula producida de manera recombinante que se ha transformado o transfectado con un gen o genes que codifican el anticuerpo humanizado.

Otras realizaciones de la invención se refieren a vectores que tienen moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican un anticuerpo anti-ENO1 humanizado o una célula huésped transformada con cualquiera de tales moléculas de ácido nucleico.

Preferentemente, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención tienen una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-ENO1 humanizado. La composición puede comprender además un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. Aún en otras realizaciones, el anticuerpo anti-ENO1, o un fragmento de este, se conjuga con un agente terapéutico. El agente terapéutico puede ser, por ejemplo, una toxina o un radioisótopo.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra los resultados de ELISA de la unión de ENO1 por el mAb EN10 aislado de ascitis de hibridoma. La purificación con sulfato de amonio, la purificación en columna de proteína A, y la purificación por SDS-PAGE se realizaron como se describe en el Ejemplo 1. Estos datos muestran la K_d del mAb EN10 anticuerpo anti-ENO1 humana.

La Figura 2 muestra los resultados del ensayo fibrinolítico U937 del mAb EN10. La inducción de la expresión de ENO1 por LPS en la línea celular de linfoma U937 humano y el ensayo de actividad de plasmina se realizaron como se describe en el Ejemplo 2. Este resultado muestra que el mAb EN10 atenúa las actividades del receptor de plasminógeno de la proteína ENO1 inducible.

La Figura 3 muestra los resultados de las actividades de invasión de las células U937 tratadas con diferentes concentraciones de mAb EN10 aislado de hibridoma, después de que la expresión de ENO1 en la superficie celular se indujo por LPS. Se realizaron procedimientos detallados como se describe en el Ejemplo 3. Estos datos muestran que el mAb EN10 inhibe la actividad de invasión de las células U937 de manera dependiente de la dosis.

La Figura 4 muestra que el mAb EN10 reconoce el ENO1 de la superficie celular en las células U937 tratadas con LPS. Se realizaron procedimientos detallados como se describe en el Ejemplo 4. El histograma indica que ENO1 está muy expresado en la superficie de U937 después de que se administraron las células con LPS.

La Figura 5A representa la secuencia de aminoácidos de la región de cadena pesada variable del mAb EN10 (SEQ ID NO: 1). Se indican las regiones marco (FR1, FR2, FR3, y FR4) y las CDR (HCDR1, HCDR2, y HCDR3). La clonación del mAb EN10 se realizó como se describe en el Ejemplo 5.

La Figura 5B representa la secuencia de aminoácidos de la región de cadena ligera variable del mAb EN10 (SEQ ID NO: 2). Se indican las regiones marco (FR1, FR2, FR3, y FR4) y las CDR (LCDR1, LCDR2, y LCDR3). La clonación del mAb EN10 se realizó como se describe en el Ejemplo 5.

La Figura 6A muestra el análisis de secuencia realizado para la humanización de las secuencias VL (secuencia ID NO: 9) y VH (secuencias ID NO: 10) de mAb ENO10 hum 4D5. En la primera línea que muestra debajo la numeración de residuos de acuerdo con el esquema de Kabat, la plantilla se muestra con subrayado, y las CDR de Kaba se muestran debajo de las líneas. Para determinar los marcos de VL y VH de mAb EN10 hum 4D5 se realizaron como se describe en el Ejemplo 6.

La Figura 6B muestra el análisis de secuencia realizado para la humanización de las secuencias VL (secuencia ID NO: 9) y VH (secuencias ID NO: 11) de mAb EN10 hum IMGT. En la primera línea que muestra debajo la numeración de residuos de acuerdo con el esquema de Kabat, la plantilla se muestra con subrayado, y las CDR de Kaba se muestran debajo de las líneas. Para determinar los marcos de VL y VH de mAb EN10 hum IMGT, se realizaron como se describe en el Ejemplo 6.

La Figura 7A muestra un vector de expresión para la generación del quimérico ratón-humano y ediciones humanizadas de mAb EN10. Los procedimientos detallados para la purificación de las diferentes ediciones de anticuerpos mAb EN10 se describen en el Ejemplo 7.

La Figura 7B representa los resultados del uso de anticuerpos quiméricos EN10, mAb EN10 hum 4D5 y mAb EN10 hum IMGT para determinar la afinidad de unión y las constantes cinéticas del mAb EN10. Se realizaron

procedimientos detallados de expresión del anticuerpo quimérico, purificación y análisis de la Kd como se describe en el Ejemplo 7. El resultado de la Kd de mAb EN10 hum IMGT no es significativo con el mAb EN10 quimérico ratón-humano.

Figura 8 y Figura 8B representan los resultados del ensayo fibrinolítico U937 de anticuerpos mAb EN10 hum 4D5 y mAb EN10 hum IMGT. La inducción de la expresión de ENO1 por LPS en la línea celular de linfoma U937 humano y el ensayo de actividad de plasmina se realizaron como se describe en el Ejemplo 2. Los datos muestran que, al igual que el mAb EN10, tanto el mAb EN10 hum 4D5 como mAb EN10 hum IMGT atenúan la actividad del receptor de plasminógeno de la proteína ENO1 inducible.

Las Figuras 9A y 9B muestran los resultados de las actividades de invasión de las células U937 tratadas con diferentes concentraciones de anticuerpos mAb EN10 hum 4D5 y mAb EN10 hum IMGT, respectivamente, después de que la expresión de ENO1 en la superficie de las células se indujo por LPS. Se realizaron procedimientos detallados como se describe en el Ejemplo 9. Estos datos muestran que después de la humanización, los anticuerpos mAb EN10 hum 4D5 y mAb EN10 hum IMGT tienen actividad para inhibir la actividad de invasión de las células U937 de manera dependiente de la dosis.

La Figura 10A muestra la actividad de adhesión de las células de carcinoma de pulmón CL1-5 a las proteínas de la matriz. El ensayo de adhesión se realizó como se describe en el Ejemplo 10. Estos datos muestran que las células CL1-5 tienen actividades superiores de adhesión al colágeno y fibronectina.

La Figura 10B muestra los resultados de la inhibición de la disociación de las células CL1-5 de la fibronectina tratadas con el mAb EN10 hum 4D5. El ensayo de adhesión asociado a las células se realizó como se describe en el Ejemplo 10. Estos datos muestran que el mAb EN10 hum 4D5 inhibe la actividad de disociación celular de CL1-5 de la fibronectina de manera dependiente de la dosis.

La Figura 10C muestra los resultados de la inhibición de la disociación de las células CL1-5 del colágeno tratadas con el mAb EN10 hum 4D5. El ensayo de adhesión asociado a las células se realizó como se describe en el Ejemplo 10. Estos datos muestran que el mAb EN10 hum 4D5 inhibe la actividad de disociación celular de CL1-5 del colágeno de manera dependiente de la dosis.

Figura 11A y Figura 11B describe los efectos de citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos de los anticuerpos mAb EN10 hum 4D5 y mAb EN10 hum IMGT. La administración de los anticuerpos humanizados y los efectos de lisis celular de la línea celular de cáncer de pulmón de CL1-5 se realizaron como se describe en el Ejemplo 11. Los datos muestran que ambos anticuerpos EN10 humanizados crean nuevas actividades de ADCC.

La Figura 12 muestra los efectos inhibidores de los anticuerpos mAb EN10 hum 4D5 y mAb EN10 hum IMGT. La administración de mAb EN10 hum 4D5 y mAb EN10 hum IMGT y el retraso del crecimiento tumoral mediante tratamiento con anticuerpos se realizaron como se describe en el Ejemplo 12. Los datos muestran que la administración dos veces por semana de ambos mAb EN10 humanizados tiene una eficacia en el modelo de ratón de xenoinjerto CL1-5.

La Figura 13A muestra el análisis de secuencia realizado para la optimización de codones de las secuencias VL (secuencia ID NO: 9) y VH (secuencias ID NO: 10) del mAb EN10 hum IMGT expresado en la línea celular CHOS. Se realizaron procedimientos detallados como se describe en el Ejemplo 13.

La Figura 13B representa un vector de expresión para la generación de anticuerpo humanizado de EN10 hum IMGT en la línea celular estable CHOS. Se realizaron procedimientos detallados como se describe en el Ejemplo 13.

La Figura 13C muestra la productividad de los 6 clones estables de CHOS superiores que expresaron el anticuerpo mAb EN10 hum IMGT. Los procedimientos detallados se realizaron como se describe en el Ejemplo 13. Nuestros datos muestran que después de la optimización de codones y la selección de una sola colonia, las velocidades de producción de estos 6 clones mejores están cerca de 1 g/L/15 días.

La Figura 13D muestra los títulos de anticuerpos de los 15 clones estables mejores, que expresaron el anticuerpo mAb EN10 hum IMGT. Los procedimientos detallados se realizaron como se describe en el Ejemplo 13.

La Figura 13E muestra los títulos de los 6 clones estables mejores que expresaron anticuerpo mAb EN10 hum IMGT. Los procedimientos detallados se realizaron como se describe en el Ejemplo 13.

La Figura 13F muestra la SDS PAGE de los anticuerpos aislados de los 6 clones estables mejores que expresan el anticuerpo mAb EN10 hum IMGT. Los procedimientos detallados se realizaron como se describe en el Ejemplo 13. Nuestros datos muestran que todos estos clones expresan mAb EN10 hum IMGT intacto.

Definiciones

A menos que se defina de cualquier otra forma, los términos científicos y técnicos usados en la presente memoria tendrán los significados que se entienden comúnmente por aquellos con experiencia ordinaria en la técnica. Además, a menos que se requiera de cualquier otra forma por el contexto, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos en plural incluirán el singular. Generalmente, las nomenclaturas usadas en relación con, y técnicas de, cultivo de tejidos y células, biología molecular, y la química e hibridación de proteínas y oligo- o polinucleótidos descritas en la presente memoria son aquellas bien conocidas y usadas comúnmente en la técnica.

Las técnicas estándar se usan para el ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos, y cultivo de tejido y transformación (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y técnicas de purificación se realizan de acuerdo con la memoria descriptiva del fabricante o como comúnmente se realizan en la técnica o como

se describen en la presente memoria. Las técnicas y procedimientos anteriores se realizan generalmente de acuerdo con los procedimientos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describen en diversas referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente memoria descriptiva. Ver por ejemplo, Sambrook y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3ra ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2001)). Las nomenclaturas utilizadas en relación con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, química analítica, química orgánica sintética, y química medicinal y farmacéutica descritas en la presente memoria son aquellas bien conocidas y usados comúnmente en la técnica. Las técnicas estándar se usan para las síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación, y suministro, y tratamiento de los pacientes.

Según se utiliza de acuerdo con la presente divulgación, se entenderá que los siguientes términos, a menos que se indique de cualquier otra forma, tienen los siguientes significados: El término "y/o" como se usa en la presente memoria se debe tomar como una divulgación específica de cada una de las dos características específicas o componentes con o sin el otro. Por ejemplo "A y/o B" debe tomarse como una divulgación específica de cada uno de (i) A, (ii) B, y (iii) A y B, justo como si cada uno se estableciera individualmente en la presente memoria.

Un antagonista puede ser un polipéptido, ácido nucleico, carbohidrato, lípido, compuesto de peso molecular pequeño, un oligonucleótido, un oligopéptido, ARN interferente (iARN), antisentido, una proteína recombinante, un anticuerpo, o conjugados o proteínas de fusión de estos. Para una revisión de iARN, consulte Milhavet O, Gary DS, Mattson M P. (*Pharmacol Rev.* 2003 diciembre; 55(4):629-48. Revisión.) y para el enfoque antisentido, ver Opalinska JB, Gewirtz A M. (*Sci STKE.* 28 de octubre de 2003; 2003 (206): pe47).

La activación o expresión aberrante relacionada con la enfermedad de "ENO1" puede ser cualquier adhesión celular anormal, indeseable o patológica, por ejemplo, adhesión celular relacionada con un tumor. Las enfermedades relacionadas con la adhesión celular incluyen, pero no se limitan a, tumores no sólidos tal como leucemia o linfoma, y también tumores sólidos tales como melanoma, cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma hepatocelular (hígado), gástrico, de cabeza y cuello, sistema hepático, estómago, mama, ovario, pulmón, pulmón, útero, vulva, colorrectal, y páncreas.

El término ENO1 se refiere a la molécula de heterodímero enolasa que consiste en una ENO1 y ENO2 o ENO3.

Como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo" se refiere general y ampliamente a inmunoglobulinas, autoanticuerpos, anticuerpos monoclonales, y anticuerpos policlonales, así como a fragmentos activos de estos. El fragmento puede ser activo porque se une al antígeno afín, o puede activarse porque es biológicamente funcional. Los anticuerpos de la invención pueden ser quiméricos, humanizados, o humanos, mediante el uso de técnicas conocidas en la técnica.

Como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo monoclonal" se refiere a anticuerpos que son química e inmunológicamente homogéneos, generalmente producidos por hibridomas. Ver *A Laboratory Manual*, Harlow y Lane, eds., Cold Spring Harbor, N.Y. (1988).

Como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo policlonal" se refiere a anticuerpos que se producen por más de un clon de células plasmáticas que sintetizan anticuerpos (linfocitos B) en respuesta al mismo antígeno. Generalmente se producen por el animal después de que se inmuniza con el antígeno.

Como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo quimérico" se refiere a anticuerpos que contienen secuencias de más de una fuente. Por ejemplo, tales anticuerpos pueden contener secuencias de fuentes no humanas que después se modifican mediante la introducción de secuencias humanas.

Como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo en el que se introducen porciones mínimas de un anticuerpo no humano en un anticuerpo que de cualquier otra forma sería humano.

Como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo humano" se refiere a un anticuerpo en el que esencialmente cada parte de la proteína es esencialmente no inmunogénica en humanos, con solo cambios o variaciones menores de secuencia.

Como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo específico de alfa-enolasa" se refiere a un anticuerpo que tiene una alta especificidad para ENO1 de mamífero, pero no a ENO2 o ENO3.

Como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo específico de ENO1" se refiere a un anticuerpo que se une a la proteína alfa-enolasa.

El término "neutralizante" cuando se refiere a un agente de unión dirigido, tal como un anticuerpo, se refiere a la capacidad de dicho agente de unión dirigido a eliminar, o reducir significativamente, la actividad de un antígeno objetivo. En consecuencia, un anticuerpo "neutralizante" contra ENO1 es capaz de eliminar o reducir

significativamente la actividad de ENO1. Un anticuerpo neutralizante contra ENO1 puede, por ejemplo, actuar al bloquear la unión de ENO1 al plasminógeno. Al bloquear esta unión, la disociación celular mediada por plasminógeno se elimina de manera significativa, o completamente. Idealmente, un anticuerpo neutralizante contra ENO1 mejora la adhesión celular.

El término "polinucleótido aislado", como se usa en la presente memoria, significará un polinucleótido que se ha aislado de su entorno natural. Tales polinucleótidos pueden ser genómicos, de ADNc, o sintéticos. Los polinucleótidos aislados preferentemente no se asocian con la totalidad o una porción de los polinucleótidos con los que se asocian en la naturaleza. Los polinucleótidos aislados pueden enlazarse operativamente a otro polinucleótido al que no está enlazado en la naturaleza. Además, los polinucleótidos aislados preferentemente no se producen en la naturaleza como parte de una secuencia mayor.

El término "proteína aislada" al que se hace referencia en la presente memoria significa una proteína que se ha aislado de su entorno natural. Tales proteínas pueden derivarse de ADN genómico, ADNc, ADN recombinante, ARN recombinante, u origen sintético o alguna de sus combinaciones, que en virtud de su origen, o fuente de derivación, la "proteína aislada" (1) no se asocia con proteínas encontradas en la naturaleza, (2) está libre de otras proteínas de la misma fuente, por ejemplo, libre de proteínas murinas, (3) se expresa por una célula de una especie diferente, o (4) no se encuentra en la naturaleza.

El término "polipéptido" se usa en la presente memoria como un término genérico para referirse a la proteína nativa, fragmentos, o análogos de una secuencia de polipéptido. Por lo tanto, proteína nativa, fragmentos, y análogos son especies del género polipéptido. Los polipéptidos de acuerdo con la invención comprenden las moléculas de inmunoglobulina de cadena pesada humana y las moléculas de inmunoglobulina de cadena ligera kappa humana, así como fragmentos y análogos de estos.

El término "de origen natural" como se usa en la presente memoria como se aplica a un objeto se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, la secuencia de un polipéptido o polinucleótido que está presente en un organismo (se incluyen virus) que se pueden aislar a partir de una fuente en la naturaleza y que no se ha modificado intencionalmente por el hombre en el laboratorio o de otra forma es de origen natural.

El término "enlazada operativamente" como se usa en la presente memoria se refiere a posiciones de componentes así descritos que están en una relación que les permite funcionar de la manera deseada. Por ejemplo, una secuencia de control "enlazada operativamente" a una secuencia de codificación se conecta de tal manera que la expresión de la secuencia de codificación se logra bajo condiciones compatibles con las secuencias de control.

El término "polinucleótido" como se refiere en la presente memoria significa una forma polimérica de nucleótidos de al menos 10 bases en longitud, ya sea ribonucleótidos o desoxinucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido, o el heterodúplex ARN-ADN. El término incluye formas de ADN de cadena doble y sencilla.

El término "oligonucleótido" referido en la presente memoria incluye los nucleótidos de origen natural, y modificados enlazados entre sí mediante enlaces de origen natural, y de origen no natural. Los oligonucleótidos son un subconjunto de polinucleótidos que comprenden generalmente una longitud de 200 bases o menos. Preferentemente, los oligonucleótidos son de 10 a 60 bases de longitud y con la máxima preferencia 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 a 40 bases de longitud. Los oligonucleótidos son generalmente de cadena sencilla, por ejemplo para sondas; aunque los oligonucleótidos pueden ser doble cadena, por ejemplo para su uso en la construcción de un mutante génico. Los oligonucleótidos pueden ser oligonucleótidos sentido o antisentido.

El término "nucleótidos de origen natural" al que se hace referencia en la presente memoria incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. El término "nucleótidos modificados" al que se hace referencia en la presente memoria incluye nucleótidos con grupos de azúcares modificados o sustituidos y similares. El término "enlaces oligonucleotídicos" al que se hace referencia en la presente memoria incluye enlaces oligonucleotídicos tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilitioato, fosforaniladato, fosforoamidato y similares. Ver, por ejemplo, LaPlanche y otros, Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec y otros, J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984); Stein y otros, Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988); Zon y otros, Anti-Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon y otros, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, págs. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec y otros, Patente de Estados Unidos. Núm. 5,151,510; Uhlmann and Peyman Chemical Reviews 90:543 (1990). Un oligonucleótido puede incluir un marcador para la detección, si se desea.

El término "región CDR" o "CDR" pretende indicar las regiones hipervariables de las cadenas pesadas o ligeras de la inmunoglobulina como se define por Kabat y otros, 1991 (Kabat, EA y otros, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ta edición. Departamento de Salud y Servicios Humanos de Estados Unidos, Servicio Público, NIH, Washington) y ediciones posteriores. Un anticuerpo contiene normalmente 3 regiones CDR de cadena pesada y 3 regiones CDR de cadena ligera. El término CDR o las CDR se usa aquí para indicar, de acuerdo con el caso, una de estas regiones o varias, o incluso la totalidad, de estas regiones que contienen la mayoría de los

residuos de aminoácidos responsables de la unión por afinidad del anticuerpo por el antígeno o el epítipo que reconoce.

Entre las seis secuencias CDR cortas, la tercera CDR de la cadena pesada (HCDR3) tiene una mayor variabilidad de tamaño (mayor diversidad en esencia debido a los mecanismos de arreglo de los genes que dan lugar a la misma). Puede ser tan corto como 2 aminoácidos, aunque el mayor tamaño conocido es 26. La longitud de la CDR también puede variar de acuerdo con la longitud que pueda adaptarse al marco subyacente particular. Funcionalmente, HCDR3 juega un papel en parte en la determinación de la especificidad del anticuerpo (Segal y otros, PNAS, 71: 4298-4302, 1974., Amit y otros, Science, 233:747-753, 1986., Chothia y otros, J. Mol. Biol. 196:901-917, 1987., Chothia y otros, Nature, 342:877-883, 1989., Caton y otros, J. Immunol., 144:1965-1968, 1990., Sharon y otros, PNAS, 87:4814-4817, 1990., Sharon y otros, J. Immunol., 144:4863-4869, 1990., Kabat y otros, J. Immunol., 147:1709-1719, 1991.).

El término un "conjunto de CDR" al que se hace referencia en la presente memoria comprende CDR1, CDR2 y CDR3. Así, un conjunto de HCDR se refiere a HCDR1, HCDR2 y HCDR3 (HCDR se refiere a una CDR de cadena pesada variable), y un conjunto de LCDR se refiere a LCDR1, LCDR2 y LCDR3 (LCDR se refiere a una CDR de cadena ligera variable). A menos que se indique de cualquier otra forma, un "conjunto de CDR" incluye HCDR y LCDR.

Dos secuencias de aminoácidos son "homólogas" si existe una identidad parcial o completa entre sus secuencias. Por ejemplo, 85% de homología significa que 85% de los aminoácidos son idénticos cuando las dos secuencias están alineadas para la máxima coincidencia. Las interrupciones (en cualquiera de las dos secuencias que se hacen coincidir) se permiten en la maximización de coincidencia; se prefiere la longitud de la interrupción de 5 o menos, con mayor preferencia de 2 o menos. Alternativamente y preferentemente, dos secuencias de proteína (o secuencias de polipéptido derivadas de ellas de al menos aproximadamente 30 aminoácidos de longitud) son homólogas, tal como este término se usa en la presente memoria, si tienen una puntuación de alineamiento de más de 5 (en unidades de desviación estándar) mediante el uso del programa ALIGN con la matriz de datos de mutación y una penalización de interrupción de 6 o mayor. Ver Dayhoff, M. O., en Atlas of Protein Sequence and Structure, págs. 101-110 (Volumen 5, National Biomedical Research Foundation (1972)) y Suplemento 2 a este volumen, págs. 1-10. Las dos secuencias o partes de ellas son con mayor preferencia homólogas si sus aminoácidos son mayores que o igual a 50% idénticos cuando se alinean óptimamente con el programa ALIGN. Se debe apreciar que puede haber regiones de homología diferente dentro de dos secuencias ortólogas. Por ejemplo, los sitios funcionales de los ortólogos de ratón y humano pueden tener un grado superior de homología que las regiones no funcionales.

El término "corresponde a" se usa en la presente memoria para significar que una secuencia de polinucleótidos es homóloga (es decir, es idéntica, no relacionada estrictamente evolutivamente) con toda o una parte de una secuencia de polinucleótidos de referencia, o que una secuencia de polipéptidos es idéntica a un polipéptido de referencia secuencia.

En contraposición, el término "complementario a" se usa en la presente memoria para significar que la secuencia complementaria es homóloga a toda o una parte de una secuencia polinucleotídica de referencia. A modo de ilustración, la secuencia de nucleótidos "TATAC" corresponde a una secuencia de referencia "TATAC" y es complementaria a una secuencia de referencia "GTATA".

El término "identidad de secuencia" significa que dos secuencias de polipéptidos o aminoácidos son idénticas (es decir sobre una base de nucleótido por nucleótido o residuo por residuo) en la ventana de comparación. El término "porcentaje de identidad de secuencia" se calcula al comparar dos secuencias alineadas óptimamente en la ventana de comparación, determinar la cantidad de posiciones en las que se produce la base del ácido nucleico idéntico (por ejemplo, A, T, C, G, U, o I) o el residuo de aminoácido en ambas secuencias para obtener la cantidad de posiciones coincidentes, dividir la cantidad de posiciones coincidentes por la cantidad total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de ventana), y multiplicar el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia.

Los términos "identidad esencial" o "esencialmente idéntica" como se usan en la presente memoria denotan una característica de una secuencia de polinucleótidos o aminoácidos, en el que el polinucleótido o aminoácido comprende una secuencia que tiene al menos 85 por ciento de identidad de secuencia, preferentemente al menos 90 a 95 por ciento de identidad de secuencia, con mayor preferencia al menos 99 por ciento de identidad de secuencia, en comparación con una secuencia de referencia en una ventana de comparación de al menos 18 posiciones de nucleótidos (6 aminoácidos), frecuentemente en una ventana de al menos 24-48 nucleótidos (8-16 amino ácido), en el que el porcentaje de identidad de secuencia se calcula al comparar la secuencia de referencia con la secuencia que puede incluir delecciones o adiciones que suman el 20 por ciento o menos de la secuencia de referencia en la ventana de comparación. La secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia más grande.

Como se usa en la presente memoria, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen el uso convencional. Ver Immunology - A Synthesis (2da Edición, E. S. Golub y D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates,

Sunderland, Mass.(1991)). Los estereoisómeros (por ejemplo, los D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, los aminoácidos no naturales tales como α,α -aminoácidos disustituídos, N-alkil aminoácidos, ácido láctico, y otros aminoácidos no convencionales podrían ser también componentes adecuados para los polipéptidos de la presente invención. Ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4-hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N,N,N-trimetilisina, ϵ -N-acetilisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina, σ -N-metilarginina, y otros aminoácidos e iminoácidos similares (por ejemplo, 4-hidroxiprolina). En la anotación de polipéptido que se usa en la presente memoria, la dirección a la izquierda es la dirección del amino terminal y la dirección a la derecha es la dirección carboxi-terminal, de acuerdo con el uso y convención estándar.

Del mismo modo, a menos que se especifique de cualquier otra forma, el extremo de la izquierda de secuencias de polinucleótidos de cadena sencilla es el extremo 5'; la dirección hacia la izquierda de secuencias de polinucleótidos de doble cadena se conoce como dirección 5'. La dirección de adición 5' a 3' de transcritos de ARN nacientes se refiere a la dirección de transcripción; las regiones de secuencia en la cadena de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que son 5' al extremo 5' del transcrito de ARN se refieren como "secuencias corriente arriba"; las regiones de secuencias en la cadena de ADN que tienen las mismas secuencias que el ARN y que son 3' al extremo 3' del transcrito de ARN se refieren como "secuencias corriente abajo".

Según se aplica a los polipéptidos, el término "identidad esencial" significa que dos secuencias de péptidos, cuando están alineadas óptimamente, tal como por los programas GAP o BESTFIT mediante el uso de pesos de interrupción por defecto, comparten al menos 80 por ciento de identidad de secuencia, preferentemente al menos 90 por ciento de identidad de secuencia, con mayor preferencia al menos 95 por ciento de identidad de secuencia, con la máxima preferencia al menos 99 por ciento de identidad de secuencia. Preferentemente, las posiciones de los residuos que no son idénticos se diferencian por sustituciones de aminoácidos conservadoras. Las sustituciones de aminoácidos conservadoras se refieren a la intercambiabilidad de residuos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales de hidroxilo alifático es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina, y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas es lisina, arginina, e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es la cisteína y metionina. Los grupos de sustitución conservadora de aminoácidos preferidos son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutámico-aspartico, y asparagina-glutamina.

Como se discute en la presente memoria, pequeñas variaciones en las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos o moléculas de inmunoglobulinas se contemplan como que se abarcan por la presente invención, con la condición de que las variaciones en la secuencia de aminoácidos mantengan al menos 75 %, con mayor preferencia al menos 80 %, 90 %, 95 %, y con la máxima preferencia 99 % de identidad de secuencia con los anticuerpos o moléculas de inmunoglobulinas descritas en la presente memoria. Particularmente, se contemplan las sustituciones conservadoras de aminoácidos. Las sustituciones conservadoras son aquellas que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que tienen cadenas laterales relacionadas. Los aminoácidos genéticamente codificados se dividen generalmente en familias: (1) ácido =aspartato, glutamato; (2) básico = lisina, arginina, histidina; (3) no polar = alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano; y (4) polar no cargado = glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. Las familias más preferidas son: la serina y treonina son una familia alifática-hidroxi; la asparagina y glutamina son una familia que contiene amida; la alanina, valina, leucina e isoleucina son una familia alifática; y la fenilalanina, triptófano, y tirosina son una familia aromática. Por ejemplo, es razonable esperar que una sustitución aislada de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina, o una sustitución similar de un aminoácido con un aminoácido estructuralmente relacionado no tendrá un efecto importante en la función de unión o las propiedades de la molécula resultante, especialmente si la sustitución no implica un aminoácido dentro de un sitio de marco.

Si un cambio de amino ácido resulta en un péptido funcional puede determinarse fácilmente mediante el ensayo de la actividad específica del polipéptido derivado. En la presente memoria se describen los ensayos en detalle. Aquellos con experiencia ordinaria en la técnica pueden preparar fácilmente los fragmentos o los análogos de los anticuerpos o las moléculas de inmunoglobulinas. Los amino- y carboxi-terminal preferidos de los fragmentos o los análogos se producen cerca de los límites de dominios funcionales. Los dominios estructurales y funcionales pueden identificarse por comparación de los datos de las secuencias de nucleótido y/o aminoácido con las bases de datos de secuencias públicas o privadas. Preferentemente, se usan procedimientos de comparación computarizados para identificar motivos de secuencia o dominios de conformación de la proteína predicha que se producen en otras proteínas de estructura y/o función conocidas. Se conocen procedimientos para identificar las secuencias de proteínas que se pliegan en una estructura tridimensional conocida. Bowie y otros, (1991) Science 253:164. Así, los ejemplos anteriores demuestran que aquellos con experiencia en la técnica pueden reconocer los motivos de secuencias y las conformaciones estructurales que se pueden usar para definir dominios estructurales y funcionales de acuerdo con los anticuerpos descritos en la presente memoria.

Preferentemente, el agente de unión al direccionamiento o una molécula de anticuerpo que comprende un dominio VH tiene al menos aproximadamente 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98 o aproximadamente 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con un dominio VH de cualquiera de los anticuerpos mostrados en las secuencias 1, el listado de secuencias adjunto, un anticuerpo descrito en la presente memoria, o con un HCDR (por ejemplo, HCDR1, HCDR2, o HCDR3) mostrado en las secuencias 1. El agente de unión al direccionamiento o la molécula de anticuerpo también pueden comprender opcionalmente un dominio VL que tiene al menos aproximadamente 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98 o aproximadamente 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con un dominio VL de cualquiera de los anticuerpos mostrados en las secuencias 2, la lista de secuencias adjunta, un anticuerpo descrito en la presente memoria, o con un LCDR (por ejemplo, LCDR1, LCDR2 o LCDR3) mostrado en las secuencias 2. Los algoritmos que se pueden usar para calcular el % de identidad de dos secuencias de aminoácidos comprenden, por ejemplo, BLAST (Altschul y otros, (1990) J. Mol. Biol. 215: 405-410), FASTA (Pearson y Lipman (1988) PNAS USA 85: 2444-2448), o el algoritmo de Smith-Waterman (Smith y Waterman (1981) J. Mol. Biol. 147: 195-197), por ejemplo, empleando parámetros por defecto. Preferentemente, el agente de unión al direccionamiento o el anticuerpo que comparte la identidad de secuencia de aminoácidos como se describe anteriormente, exhibe esencialmente la misma actividad que los anticuerpos referenciados. Por ejemplo, esencialmente la misma actividad comprende al menos una actividad que difiere de la actividad de los anticuerpos de referencia en no más de aproximadamente 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, 5 %, 2 %, 1 % o menos.

Un sitio de unión al antígeno de un anticuerpo se forma generalmente por los dominios de inmunoglobulinas variable pesada (VH) y variable ligera (VL), con la interface de unión al antígeno formada por seis lazos de superficie del polipéptido, que se denominan regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Existen tres CDR en cada VH (HCDR1, HCDR2, HCDR3) y en cada VL (LCDR1, LCDR2, LCDR3), junto con las regiones de marco (FR).

Típicamente, un dominio VH se aparea con un dominio VL para proporcionar un sitio de unión antígeno anticuerpo, aunque un dominio VH o VL solo se puede usar para unirse al antígeno. El dominio VH (por ejemplo, de las secuencias 1) se puede emparejar con el dominio VL (por ejemplo, de las secuencias 2), de manera que se forme un sitio de unión al antígeno del anticuerpo que comprenda los dominios VH y VL, o para los otros dominios VH y VL divulgados en la presente memoria. Preferentemente, las cadenas VH en las secuencias 1 se emparejan con un dominio VL heterólogo. La promiscuidad en las cadenas ligeras está bien establecida en la técnica. Así, el VH del parental o de cualquiera de las cadenas de anticuerpos en la secuencia 2 puede emparejarse con el VL del parental o de cualquiera de los anticuerpos en las secuencias 1 y 2 u otro anticuerpo.

Un sitio de unión al antígeno puede comprender un conjunto de CDR H y/o L del anticuerpo parental o cualquiera de los anticuerpos en las secuencias 1 y 2 con hasta veinte, dieciséis, diez, nueve o menos, por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro o cinco, adiciones, sustituciones, delecciones y/o inserciones de aminoácidos dentro del conjunto divulgado de CDR H y/o L. Tales modificaciones se pueden realizar potencialmente en cualquier residuo dentro del conjunto de CDR.

Las sustituciones de aminoácidos preferidas son aquellas que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de unión para formar complejos de proteínas, (4) alteran las afinidades de unión, y (4) confieren o modifican otras propiedades fisicoquímicas o funcionales de tales análogos. Los análogos pueden incluir diversas proteínas mutantes de una secuencia distinta de la secuencia del péptido de origen natural. Por ejemplo, se pueden hacer sustituciones de aminoácidos individuales o múltiples (preferentemente sustituciones de aminoácidos conservadoras) en las secuencias de origen natural (preferentemente en la porción del polipéptido fuera del dominio(s) que forma los contactos intermoleculares. Una sustitución de aminoácido conservadora no debería cambiar sustancialmente las características estructurales de la secuencia parental (por ejemplo, un aminoácido de sustitución no debería tender a romper una hélice que se produce en la secuencia parental, o alterar otros tipos de estructura secundaria que caracterizan la secuencia de los parentales). Los ejemplos de estructuras secundarias y terciarias de polipéptidos reconocidas en la técnica se describen en *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, Nueva York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden y J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); y Thornton y otros *Nature* 354:105 (1991).

Preferentemente, la molécula de anticuerpo que comprende un dominio VH que tiene al menos aproximadamente 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98 o aproximadamente 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con un dominio VH de cualquiera de los anticuerpos enumerados en las secuencias 1, el listado de secuencias anexo o descrito en la presente memoria, o con un HCDR (por ejemplo, HCDR1, HCDR2, o HCDR3) mostrado en las secuencias 1. La molécula de anticuerpo puede opcionalmente también comprender un dominio VL que tiene al menos 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98 o 99 % de identidad de secuencia de aminoácido con un dominio VL de cualquiera de los anticuerpos que se muestran en las secuencias 2, el listado de secuencias anexo o descrito en la presente memoria, o con un LCDR (por ejemplo, LCDR1, LCDR2, y/o LCDR3) que se muestra en las secuencias 2. Los algoritmos que se pueden usar para calcular el % de identidad de dos secuencias de aminoácidos comprenden, por ejemplo, BLAST (Altschul y otros, (1990) J. Mol. Biol. 215: 405-410), FASTA (Pearson y Lipman (1988) PNAS USA 85: 2444-2448), o el algoritmo de Smith-Waterman (Smith y Waterman (1981) J. Mol. Biol. 147: 195-197), por ejemplo, empleando parámetros por defecto.

Un aspecto adicional de la invención es una molécula de anticuerpo que comprende un dominio VH que tiene al menos aproximadamente 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98 ó aproximadamente 99 % de identidad de la secuencia de aminoácido con un dominio VH de cualquiera de los anticuerpos enumerados en las secuencias 1, o con un HCDR (por ejemplo, HCDR1, HCDR2, y/o HCDR3) que se muestran en las secuencias 1. La molécula de anticuerpo puede

5 opcionalmente también comprender un dominio VL que tiene al menos 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98 ó 99 % de identidad de secuencia de aminoácido con un dominio VL de cualquiera de los anticuerpos que se muestran en las secuencias 2, el listado de secuencias anexo o descrito en la presente memoria, o con un LCDR (por ejemplo, LCDR1, LCDR2, y/o LCDR3) que se muestra en las secuencias 2.

10 Las variantes de los dominios VH y VL y las CDR de la presente invención, que incluyen aquellas cuyas secuencias de aminoácidos se exponen en la presente memoria, y que se pueden emplear en agentes de direccionamiento y anticuerpos para la proteína ENO1 humana se pueden obtener por medio de procedimientos de alteración o mutación de la secuencia y tamizaje de direccionamiento del antígeno con las características deseadas. Los ejemplos de características deseadas incluyen, pero no se limitan a: aumento de la afinidad de unión por el antígeno

15 con relación a los anticuerpos conocidos que son específicos del antígeno; mayor neutralización de la actividad de un antígeno con relación a los anticuerpos conocidos que son específicos para el antígeno si se conoce la actividad; capacidad competitiva especificada con un anticuerpo o ligando conocido del antígeno en una relación molar específica; capacidad para inmunoprecipitar el complejo; capacidad para unirse a un epítipo específico; epítipo lineal, por ejemplo, secuencia de péptidos identificada mediante el uso de exploración de unión de péptidos como se describe en la presente memoria, por ejemplo, mediante el uso de péptidos tamizados en conformación lineal y/o

20 restringida; epítipo conformacional, formado por residuos no continuos; capacidad de modular una nueva actividad biológica de la proteína ENO1 humana o molécula corriente abajo. Tales procedimientos también se proporcionan en la presente memoria.

25 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un agente de unión dirigido (es decir, un anticuerpo) que incluye aquellos para los que las secuencias de aminoácidos que se unen al péptido epítipo que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 60, 70, 80, 85, 90, o aproximadamente 92 % de identidad de secuencia de aminoácidos enumerada en las secuencias 9 o 10 en la proteína ENO1 humana y puede usarse para tratar una enfermedad o trastorno de la proteína ENO1 humana. Una enfermedad o trastorno

30 relacionado con la proteína ENO1 humana puede ser cualquier afección que surja debido a la activación o expresión aberrante de la proteína ENO1 humana. En un ejemplo, la enfermedad relacionada con la proteína ENO1 humana es una enfermedad neoplásica tales como cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma hepatocelular (hígado), cáncer gástrico (estómago), cáncer de mama, adenocarcinoma del conducto pancreático.

35 Las variantes de las moléculas de anticuerpos divulgadas en la presente memoria se podrían producir y usar en la presente invención. Siguiendo el ejemplo de la química computacional en la aplicación de técnicas de análisis de datos multivariantes a las relaciones estructura/propiedad-actividad (Wold, y otros, *Multivariate data analysis in chemistry. Chemometrics—Mathematics and Statistics in Chemistry* (Ed.: B. Kowalski), D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Holanda, 1984) las relaciones cuantitativas actividad-propiedad de los anticuerpos se pueden

40 derivar mediante el uso de técnicas matemáticas bien conocidas, tales como regresión estadística, reconocimiento de patrones y clasificación (Norman y otros, *Applied Regression Analysis*. Wiley-Interscience; 3ra edición (abril de 1998); Kandel, Abraham y Backer, Eric. *Computer-Assisted Reasoning in Cluster Analysis*. Prentice Hall PTR, (11 de mayo de 1995); Krzanowski, Wojtek. *Principles of Multivariate Analysis: A User's Perspective* (Oxford Statistical Science Series, Núm. 22 (artículo)). Oxford University Press; (diciembre de 2000); Witten, Ian H. y Frank, Eibe. *Data Mining: Practical Machine Learning Tools and Techniques with Java Implementations*. Morgan Kaufmann; (11 de octubre de 1999); Denison David GT (Editor), Christopher C. Holmes, Bani K. Mallick, Adrian FM Smith. *Bayesian Methods for Nonlinear Classification and Regression* (Wiley Series in Probability and Statistics). John Wiley y Sons; (julio de 2002); Ghose, Amp K. & Viswanadhan, Vellarkad N. *Combinatorial Library Design and Evaluation Principles, Software, Tools, and Applications in Drug Discovery*). Las propiedades de los anticuerpos se pueden obtener a partir

50 de modelos empíricos y modelos teóricos (por ejemplo, el análisis de residuos de contacto probables o la propiedad fisicoquímica calculada) de la secuencia del anticuerpo, las estructuras funcional y tridimensional y estas propiedades se pueden considerar individualmente y en conjunto.

55 Un sitio del anticuerpo de unión al antígeno compuesto de un dominio VH y un dominio VL se forma típicamente por seis lazos del polipéptido: tres del dominio variable de cadena ligera (VL) y tres del dominio variable de cadena pesada (VH). El análisis de los anticuerpos de estructura atómica conocida ha aclarado las relaciones entre la secuencia y la estructura tridimensional de los sitios de combinación del anticuerpo. Estas relaciones implican que, excepto para la tercera región (lazo) en los dominios VH, los lazos del sitio de unión tienen una de un pequeño número de conformaciones de la cadena principal: estructuras canónicas. Se ha demostrado que la estructura

60 canónica formada en un lazo en particular, está determinada por su tamaño y la presencia de ciertos residuos en sitios claves tanto en el lazo como en las regiones marco.

Este estudio de la relación secuencia-estructura se puede usar para la predicción de aquellos residuos en un anticuerpo de secuencia conocida, pero de una estructura tridimensional desconocida, los cuales son importantes en

65 el mantenimiento de la estructura tridimensional de sus lazos CDR y por lo tanto mantienen la especificidad de unión. Estas predicciones se pueden respaldar a diferencia de las predicciones para el resultado de los

experimentos de optimización conducidos. En un enfoque estructural, se puede crear un modelo de la molécula de anticuerpo mediante el uso de cualquier paquete libremente disponible o comercial, tal como el WAM. Un paquete de software de visualización y análisis de proteína, tal como el Insight II (Accelrys, Inc.) o el Deep View se pueden usar después para evaluar posibles sustituciones en cada posición en la CDR. Esta información se podría usar después para generar sustituciones que probablemente tengan un efecto mínimo o beneficioso en la actividad.

Las técnicas que se requieren para hacer las sustituciones dentro de las secuencias de aminoácidos de las CDR, los dominios VH o VL del anticuerpo y/o los agentes de unión generalmente están disponibles en la técnica. Se pueden hacer variantes de secuencias, con sustituciones que pueden o no predecir que tienen un efecto mínimo o beneficioso sobre la actividad, y probar la capacidad para unirse y/o neutralizar y/o cualquier otra propiedad que se desee.

Las variantes de la secuencia de aminoácido del dominio variable de cualquiera de los dominios VH y VL cuyas secuencias se divulgan específicamente en la presente memoria se pueden emplear de acuerdo con la presente invención, según se discutió.

El término "fragmento de polipéptido" como se usa en la presente memoria se refiere a un polipéptido que tiene una delección amino-terminal y/o carboxi-terminal, pero donde la secuencia de aminoácidos restante es idéntica a las posiciones correspondientes en la deducida secuencia de origen natural, por ejemplo, a partir de una secuencia de ADNc de longitud completa. Los fragmentos son típicamente de al menos aproximadamente 5, 6, 8 o 10 aminoácidos de longitud, preferentemente al menos aproximadamente 14 aminoácidos de longitud, con mayor preferencia al menos aproximadamente 20 aminoácidos de longitud, generalmente al menos aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, e incluso con mayor preferencia al menos aproximadamente 70 aminoácidos de longitud. El término "análogo", como se usa en la presente memoria, se refiere a polipéptidos que están compuestos por un segmento de al menos aproximadamente 25 aminoácidos que tiene una identidad esencial con una parte de una secuencia de aminoácidos deducida y que tiene al menos una de las siguientes propiedades: (1) unión específica a la proteína ENO1 humana en condiciones de unión adecuadas, (2) capacidad para bloquear la unión apropiada de ligando/ proteína ENO1, o (3) capacidad para inhibir la actividad de la proteína ENO1. Típicamente, los análogos polipeptídicos comprenden una sustitución de aminoácido conservadora (o adición o delección) con respecto a la secuencia de origen natural. Los análogos típicamente son de al menos 20 aminoácidos de longitud, preferentemente al menos 50 aminoácidos de longitud o más largo, y frecuentemente pueden ser tan largos como un polipéptido de origen natural de longitud completa.

Como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo" se refiere a un polipéptido o un grupo de polipéptidos que comprenden al menos un dominio de unión que se forma a partir del plegamiento de las cadenas de polipéptidos que tienen espacios de unión tridimensionales con la superficie interna de las formas y distribuciones de carga complementarias a las características de un determinante antigénico de un antígeno. Un anticuerpo tiene típicamente una forma tetramérica, que comprende dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, cada par tiene una cadena "ligera" y una "pesada". Las regiones variables de cada par de cadena ligera/pesada forman un sitio de unión al anticuerpo.

Como se usa en la presente memoria, un "agente de unión dirigido" es un agente, por ejemplo, un anticuerpo, o un fragmento de unión de este, que se une preferentemente a un sitio objetivo. Preferentemente, el agente de unión dirigido es específico para un solo sitio objetivo, con mayor preferencia el agente de unión dirigido es específico para más de un sitio objetivo. El agente de unión dirigido puede ser un anticuerpo monoclonal y el sitio objetivo puede ser un epítipo. Como se describe a continuación, un agente de unión dirigido puede comprender al menos un dominio de unión a antígeno de un anticuerpo, en el que dicho dominio se fusiona o se contiene dentro de una proteína heteróloga.

Los "fragmentos de unión" de un anticuerpo se producen por técnicas de ADN recombinante, o por escisión química o enzimática de los anticuerpos intactos. Los fragmentos de unión incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, y anticuerpos de cadena sencilla. Se entiende que un anticuerpo distinto de un anticuerpo "bienespecífico" o "bifuncional" tiene cada uno de sus sitios de unión idénticos. Un anticuerpo inhibe esencialmente la adhesión de un receptor a un contrarreceptor cuando un exceso de anticuerpos reduce la cantidad de receptor unido al contrarreceptor en al menos aproximadamente 20 %, 40 %, 60 % u 80 %, y más generalmente mayor que aproximadamente 85 % (según se mide en un ensayo competitivo in vitro).

Un anticuerpo puede ser oligoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo injertado con CDR, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo bienespecífico, un anticuerpo catalítico, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo completamente humano, un anticuerpo anti-idiotipo y los anticuerpos que se pueden marcar en forma soluble o enlazada, así como fragmentos, variantes o derivados de éstos, ya sea solos o en combinación con otras secuencias de aminoácidos que se proporcionan por las técnicas conocidas. Un anticuerpo podría ser de cualquier especie. El término anticuerpo también incluye fragmentos de unión de los anticuerpos de la invención; los fragmentos ilustrativos incluyen Fv, Fab, Fab', anticuerpo de cadena sencilla (svFC), región variable dimérica (diacuerpo) y región variable estabilizada con disulfuro (dsFv).

Se ha demostrado que los fragmentos de un anticuerpo completo pueden realizar la función de unión a los antígenos. Ejemplos de fragmentos de unión son (Ward, ES y otros, (1989) Nature 341, 544-546) el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (McCafferty y otros, (1990) Nature, 348, 552-554) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (Holt y otros, (2003) Trends in Biotechnology 21, 484-490) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un anticuerpo sencillo; (iv) el fragmento dAb (Ward, E. S. y otros, Nature 341, 544-546 (1989), McCafferty y otros, (1990) Nature, 348, 552-554, Holt y otros, (2003) Trends in Biotechnology 21, 484-490], que consiste de un dominio VH o uno VL; (v) regiones CDR aisladas; (vi) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados (vii) moléculas Fv monocatenarias (scFv), en las que un dominio VH y un dominio VL se enlazan por un enlazador peptídico que permite asociar dos dominios para formar un sitio de unión de antígeno (Bird y otros, (1988) Science, 242, 423-426, Huston y otros, (1988) PNAS USA, 85, 5879-5883); (viii) dímeros Fv monocatenarios biespecíficos (documento de patente núm. PCT/US92/09965) y (ix) "diacuerpos", fragmentos multivalentes o multispecíficos contruidos por fusión de genes (documento de patente núm. WO94/13804; Holliger, P. (1993) y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6444-6448). Las moléculas Fv, scFv o diacuerpo pueden estabilizarse por la incorporación de puentes de disulfuro que enlazan los dominios VH y VL (Reiter, Y. y otros, Nature Biotech, 14, 1239-1245, 1996). También pueden prepararse minicuerpos que comprenden un scFv unido a un dominio CH3 (Hu, S. y otros, (1996) Cancer Res., 56, 3055-3061). Otros ejemplos de fragmentos de unión son el Fab', que difiere de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos en el terminal carboxilo del dominio CH1 de la cadena pesada, que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo, y el Fab'-SH, que es un fragmento Fab' en el cual el(los) residuo(s) de cisteína de los dominios constantes porta(n) un grupo tiol libre.

El término "epitopo" incluye cualquier proteína determinante capaz de la unión específica a una inmunoglobulina o receptor de células T. Los determinantes epitópicos generalmente consisten en agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activas tales como los aminoácidos o cadenas laterales de azúcares y pueden, pero no siempre, tener características específicas de estructura tridimensional, así como las características específicas de carga. Se dice que un anticuerpo se une de manera específica a un antígeno cuando la constante de disociación es ≤ 1 micro M, preferentemente ≤ 100 nM, y con la máxima preferencia ≤ 10 nM.

El término "agente" se usa en la presente memoria para denotar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica, o un extracto hecho de materiales biológicos.

"Activo" o "actividad" en lo que respecta a un polipéptido ENO1 se refiere a una porción de un polipéptido ENO1 que tiene una actividad biológica o una inmunológica de un polipéptido nativo ENO1. "Biológica" cuando se usa en la presente memoria se refiere a una función biológica que resulta de la actividad del polipéptido nativo ENO1. Una actividad biológica de ENO1 preferida incluye que, por ejemplo, ENO1 indujo la actividad de plasminógeno.

"Mamífero", cuando se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier animal que se considere un mamífero. Preferentemente, el mamífero es un humano.

La digestión de los anticuerpos con la enzima papaína, resulta en dos fragmentos idénticos de unión al antígeno, además se conocen como fragmentos "Fab", y un fragmento "Fc", que no tiene actividad de unión al antígeno pero que tiene la capacidad de cristalizar. La digestión de los anticuerpos con la enzima pepsina, resulta en un fragmento F(ab')₂ en el que los dos brazos de la molécula de anticuerpo permanecen enlazados y comprende dos sitios de unión al antígeno. El fragmento F(ab')₂ tiene la capacidad de entrecruzar el antígeno.

"Fv" cuando se usa en la presente memoria se refiere al fragmento mínimo de un anticuerpo que conserva tanto el reconocimiento del antígeno como los sitios de unión al antígeno. "Fab" cuando se usa en la presente memoria se refiere a un fragmento de un anticuerpo que comprende el dominio constante de la cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada. El término "mAb" se refiere al anticuerpo monoclonal.

El término "agente farmacéutico o fármaco" como se usa en la presente memoria se refiere a un compuesto químico, combinación o composición capaz de inducir un efecto terapéutico deseado cuando se administra adecuadamente a un paciente. Otros términos químicos en la presente memoria se usan de acuerdo con el uso convencional en la técnica, como se ejemplifica por The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

Como se usa en la presente memoria, "esencialmente pura" significa que una especie objeto es la especie predominante presente (es decir, en una base molar es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición), y preferentemente una fracción esencialmente purificada es una composición en la que la especie objeto comprende al menos aproximadamente el 50 por ciento (sobre una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes. Generalmente, una composición esencialmente pura comprenderá más de aproximadamente el 80 por ciento de todas las especies macromoleculares presentes en la composición, con mayor preferencia más de aproximadamente 85 %, 90 %, 95 %, y 99 %. Con la máxima preferencia, la especie objeto se purifica hasta una homogeneidad esencial (las especies contaminantes no pueden detectarse en la composición mediante procedimientos de detección convencionales) en los que la composición consiste esencialmente en una única especie macromolecular.

El término "paciente" incluye a sujetos humanos y veterinarios.

Como se usa en la presente memoria, el término "monitorear" se refiere al procedimiento para detectar y/u observar el desarrollo del cáncer determinando la abundancia de proteína ENO1 en las células cancerosas.

Los procedimientos para determinar la abundancia de ENO1 incluyen, pero no se limitan a, medir la unión de proteínas ENO1 y anticuerpos específicos de ENO1, inmunoelctrotransferencia, citometría de flujo, inmunohistoquímica (IHC), RT-PCR y/o análisis de micromatrices.

Ejemplos

La práctica de la presente invención puede emplear tecnologías que comprenden técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, tecnología de anticuerpos, e ingeniería genética, que se encuentran dentro de los conocimientos ordinarios de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía.

Los siguientes ejemplos ilustran el desarrollo y uso de anticuerpos específicos de ENO1 para suprimir el crecimiento tumoral induciendo una respuesta inmune anti-ENO1.

Ejemplo 1

El ELISA de unión a ENO1 del anticuerpo mAb EN10

Para evaluar la afinidad de unión a ENO1 del mAb EN10 anticuerpo anti-ENO1 humana, los hibridomas se cultivaron en RPMI que contenía suero de ternero fetal (FCS) al 10 %. Después de una semana de cultivo, 1×10^6 células se recogieron, se lavaron con PBS, se resuspendieron en 200 μ l de medio RPMI, y se inyectaron en ratones con inmunodeficiencia combinada grave (SCID) mediante inyección IP. Tres semanas más tarde, se recogieron ascitis de ratones y se diluyeron con 15 ml. El anticuerpo se purificó adicionalmente mediante sulfato de amonio al 40 % y columna de proteína A (kit de purificación de anticuerpos Montage Millipore). El anticuerpo purificado se concentró con un dispositivo de filtro centrífugo Amicon Ultra-15, siguiendo los protocolos proporcionados por el fabricante (Millipore). La pureza del anticuerpo se analizó por SDS PAGE al 12 %.

Se recubrieron cuatrocientos (400) ng de proteína ENO1 humana en una placa ELISA de 96 pocillos y la placa se lavó adicionalmente con PBS. Diluciones en serie de 1×10^{-12} hasta 1×10^{-8} M de anticuerpo mAb EN10 se añadieron a la placa, y la placa se incubó a 37 °C durante 1 hora. Se añadió una IgG anti-ratón de carnero conjugada con hipoxantina fosforibosiltransferasa (HPRT). Después de 1 hora, se añadió 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) y se leyó la DO405. Cada estudio se repitió tres veces. Los datos se presentan como la media $\pm$ SD. Se usaron lecturas de DO y concentraciones de anticuerpos para hacer un gráfico de dispersión múltiple mediante el uso de Sigmaplot. Los valores de K_d se predijeron mediante un ajuste logístico de cuatro parámetros.

Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 1. El anticuerpo mAb EN10 tuvo productividades de 20,4 mg a 4,6 mg por ratón. El valor K_d del anticuerpo mAb EN10 fue $2,03 \pm 0,12 \times 10^{-10}$ M ($N = 3$). Este resultado indica que el anticuerpo mAb EN10 puede reconocer la proteína ENO1 humana y tiene una afinidad favorable con un valor de K_d de aproximadamente $2,03 \pm 0,12 \times 10^{-10}$ M ($N = 3$).

Ejemplo 2

Para evaluar la capacidad del mAb EN10 para inhibir la actividad del receptor de plasminógeno ENO1 de las células cancerosas, se cultivó una línea celular de linfoma humano U937 en RPMI que contenía FCS al 10 %. Las células se trataron con 10 microgramos/ml de LPS durante 6 horas para inducir la expresión de la proteína ENO1 en la superficie celular. $1,5 \times 10^6$ células/ml en PBS se preincubaron después con 1 microgramo/ml de Lys-plasminógeno humano y 10 microgramos/ml de mAb EN10 durante una hora, respectivamente. Las muestras se lavaron con PBS dos veces y se añadieron 3 nM de activador de plasminógeno específico de tejido y 0,5 mM de sustrato cromogénico S-2251. Después de una hora de incubación a 37 °C, se leyó la DO 405. Cada estudio se repitió tres veces, y se analizó la actividad antagonista. Los datos se presentan como la media $\pm$ SD. Se usó la prueba T para comparar cada grupo. Los valores de $P < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 2. El mAb EN10 tuvo una alta actividad antagonista del receptor de plasminógeno ENO1 y puede lograr una inhibición del 100 % de la actividad ENO1 específica inducida por LPS. Por tanto, el mAb EN10 tendría un buen potencial para inhibir la trans migración de células cancerosas a los órganos objetivos.

Ejemplo 3

El resultado del Ejemplo 2 sugiere que el mAb EN10 puede inhibir la actividad del receptor de plasminógeno ENO1. La inhibición de la actividad del receptor de plasminógeno ENO1 puede resultar en la inhibición de la activación del plasminógeno y la actividad de trans migración en la línea celular de linfoma U937 humano estimulada por LPS.

Para evaluar si comprometer la actividad del receptor de plasminógeno ENO1 resulta en la atenuación de la actividad de invasión de las células cancerosas, se creó una línea celular de linfoma humano U937 en RPMI que contenía FCS al 10%. Las células se trataron con 10 microgramos/ml de LPS durante 6 horas para inducir la expresión de la proteína ENO1 en la superficie celular. Después de mezclarse con 5 a 50 microgramos/ml de mAb EN10, 2×10^4 células se sembraron en la cámara superior de un sistema de ensayo de dos cámaras que contenía 15 micromolar de Lys-plasminógeno y se incubaron durante 24 horas con medio que contenía FBS al 10 % y MCP-1 10 nM en la cámara inferior. Se usó una IgG anti-ratón como un grupo de control negativo. Se separaron dos cámaras mediante un filtro de microporos (tamaño de poro de 8 micrómetros) recubierto con matrigel. Después del período de incubación, las células de la cámara inferior se contaron con un hemocitómetro bajo un microscopio. Cada estudio se repitió tres veces. Los datos se presentan como la media $\pm$ DS. Se usó la prueba T para comparar cada grupo. Los valores de $P < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Los resultados se muestran en la Figura 3. Cuando las células U937 tratadas con LPS se trataron con 5 a 50 microgramos/ml de mAb EN10, la actividad de invasión de U937 fue de $90,2 \pm 2 \%$ a $49,1 \pm 1 \%$ ($N = 3$) de la IgG de control. Estos resultados indican que el mAb EN10 puede atenuar la capacidad de invasión de U937 activada al comprometer la actividad del receptor de plasminógeno ENO1 de manera dependiente de la dosis. Al dirigirse a la proteína ENO1 en la superficie del linfoma, es factible inhibir la entrada de células en los sitios afectados mediante el uso de mAb EN10.

Ejemplo 4

El mAb EN10 reconoce el ENO1 de superficie de la línea celular de linfoma U937 estimulada por LPS

Se cultivaron las células de linfoma humano U937 en RPMI que contenía FCS al 10 %. Las células se trataron con 10 microgramos/ml de LPS durante 6 horas para inducir la expresión de la proteína ENO1 en la superficie celular. Para el análisis de citometría de flujo, las células completas intactas se tiñeron con o sin el mAb EN10 (dilución 1:300), se visualizaron con el antisuero de cabra conjugado con FITC (Jackson Lab) y se analizaron con el citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson). La expresión de ENO1 se midió mediante la intensidad de fluorescencia resultante.

Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 4. La incubación de U937 con LPS y el mAb EN10 desplaza el histograma hacia la derecha, en comparación con la incubación de las células sin LPS pero con el mAb EN10. Este resultado indica que las células U937 aumentan en la expresión de ENO1 en sus superficies celulares cuando las células se tratan con LPS. Estos datos apoyan la idea de que el mAb EN10 reconoce el ENO1 de superficie inducida por LPS en las células de linfoma.

Ejemplo 5

La clonación del gen que codifica el anticuerpo mAb EN10 se realizó de acuerdo con los procedimientos descritos a continuación.

(1) Clonación y preparación de ADNc de genes de anticuerpos.

El hibridoma se cultivó en un medio RPMI (fabricado por Gibco) que contenía FCS al 10 %. Después de que el número de células alcanzó aproximadamente 10×10^6 /ml, las células se recogieron por centrifugación y después se añadió TRIzol® (fabricado por Invitrogen) para extraer el ARN total de acuerdo con el manual de instrucciones. La clonación de la región variable de los ADNc del anticuerpo se realizó mediante el uso de un conjunto de cebadores de Ig de ratón (fabricado por Novagen) de acuerdo con el manual de instrucciones adjunto.

(a) La síntesis del ADNc de la 1a hebra se realizó de acuerdo con el manual de instrucciones del sistema de síntesis de primera hebra SuperScript® III (fabricado por Invitrogen).

El ADNc de la 1a hebra se preparó mediante el uso de 5 microgramos del ARN total como un molde. Se mezclaron cinco microgramos de ARN de hibridoma total, 1 microL de 50 ng/microL de cebadores aleatorios y 1 microL de dNTP 10 mM, y se añadió agua tratada con DEPC a 10 microL en un tubo de PCR de 200 microL. La mezcla de reacción se incubó a 65 °C durante 5 min, y después se colocó en hielo durante al menos 1 minuto. Se añadieron diez microL de mezcla de síntesis de ADNc que contienen 2 microL de tampón 10 $\times$ RT, 4 microL de MgCl₂ 25 mM, 2 microL de DTT, 1 microL de 4 unidades de RNasaOUT™, y 1 microL de 200 unidades de SuperScript® III RT, se mezclaron suavemente y se recogieron mediante una breve centrifugación. El tubo de reacción se incubó durante 10 min a 25 °C y se siguió por 50 min a 50 °C. La reacción se terminó a 85 °C durante 5 min y se enfrió en hielo. El tubo se centrifugó brevemente para recoger la reacción y se añadió 1 microL de RNasa H y se incubó durante 20 min a 37 °C.

(b) Amplificación por PCR de genes de cadena pesada y genes de cadena ligera

Se proporciona una solución de reacción que tiene una composición de 5 microL de ADNc, 5 microL de tampón de reacción 10 $\times$, 1 microL de mezcla de dNTP 10 mM, 1 microL de polimerasa Taq de 2,5 unidades y 1 microL de

cebador directo 1 y 1 microL de cebador inverso 2 por el juego de cebadores se preparó en un volumen final de 50 microL con agua bidestilada y se sometió a PCR.

Para la amplificación de la cadena ligera y pesada de un anticuerpo, se usó un ciclo de 94 grados C durante 10 minutos, después un ciclo de 94 grados C durante un minuto, 52 grados C durante un minuto y 72 grados C durante 1 minuto se repitió 35 veces y la reacción se incubó a 72 grados C durante 10 minutos más. La solución de reacción se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 2 % para analizar los productos de reacción. Los productos con los pesos moleculares correctos, aproximadamente 463 pb para la cadena pesada y 451 pb para la cadena ligera, se ligaron a un vector de pCR 2.1-TOPO (fabricado por Invitrogen) para la subclonación de acuerdo con el manual de instrucciones adjunto. Los cebadores M13 directo (5'-GTAAACAAC GACGGCGAG--3' (SEQ ID NO:12) y M13 inverso (5'- CAG GAA ACA GCT ATG AC--3' (SEQ ID NO:13)) se usaron además para determinar la secuencia de nucleótidos. Con base en la información de la secuencia, las secuencias de anticuerpos se tradujeron en secuencias de proteínas mediante la herramienta de traducción ExPASy. Las secuencias resultantes del mAb EN10 comprenden una secuencia de aminoácidos de cadena pesada y una secuencia de cadena ligera que tiene regiones determinantes de complementariedad (CDR), que se determinaron mediante el procedimiento publicado por Kabat y otros, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, Publicación NIH 91-3242, Bethesda Md. (1991), vols. 1-3.

La Figura 5A representa la secuencia de aminoácidos de la región/dominio de la cadena pesada variable del mAb EN10 (SEQ ID NO: 1). Se indican las regiones marco (FR1, FR2, FR3, y FR4) y las CDR (HCDR1 (SEQ ID NO: 3), HCDR2 (SEQ ID NO: 4) y HCDR3 (SEQ ID NO: 5)).

La Figura 5B representa las secuencias de aminoácidos de la región/dominio de cadena ligera variable del mAb EN10 (SEQ ID NO: 2). Se indican las regiones marco (FR1, FR2, FR3, y FR4) y las CDR (LCDR1 (SEQ ID NO: 6), LCDR2 (SEQ ID NO: 7) y LCDR3 (SEQ ID NO: 8)).

Ejemplo 6

Humanización del mAb EN10

Selección de secuencias marco de la región V humana:

Mediante el uso del anticuerpo monoclonal de ratón mAb EN10 como anticuerpo original, las secuencias CDR del mAb EN10 de acuerdo con las definiciones de Kabat se describieron en la Figura 5A y 5B (SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2).

Para el mAb EN10 humanizado (abreviado como: EN10 hum) 4D5, el marco del aceptador humano se seleccionó de la base de datos o utilizando un marco que se validó en la clínica. Se han validado las secuencias marco de la cadena ligera y pesada humana en el subgrupo III de VH, IGHV3-66*04 (SEQ ID NO:10 y subgrupo I de VL κ , IGKV1-39*01 (SEQ ID NO:9) (Figura 6A) en la clínica y se han usado con éxito en muchos anticuerpos humanizados.

Para mAb EN10 hum IMGT, las secuencias VL y VH de la línea germinal humana con el grado más alto de homología con las regiones marco del mAb EN10 se identificaron a partir de la base de datos de IMGT (International Immunogenetics Information System®). Las búsquedas de homología pueden realizarse con BLAST o procedimientos similares. Las secuencias de región variable de mAb EN10 usadas como secuencias de consulta están disponibles en la bibliografía, tal como la Patente de Estados Unidos núm. 9,382,331 B2.

Las secuencias marco de la cadena pesada humana en el subgrupo III de VH (VH3) se han usado con éxito en muchos anticuerpos humanizados, y también se ha demostrado que las secuencias marco de la cadena ligera humana del subgrupo II de VL κ (Vk2) son buenas candidatas. Por tanto, se seleccionaron las secuencias marco de los subgrupos VHIII y Vk2 para la búsqueda de marcos VH y VL, respectivamente. Estas búsquedas identificaron a IGHV3-72*01 e IGKV2D-29*02, respectivamente, como las secuencias VH y VL con mayor homología a las correspondientes secuencias marco de cadena pesada y cadena ligera en el mAb EN10.

Como se muestra en la Figura 6B, las secuencias de las regiones marco de la cadena pesada humana IGHV1-18*01 difieren de las del mAb EN10 en 19 aminoácidos (los residuos subrayados), que corresponde a una variación del 24,69 % (20/81 residuos totales en las regiones marco). Las secuencias marco de la cadena ligera humana (subtipo kappa I), como se muestra en la Figura 6B, difieren de las secuencias en IGHV12-44*01 del mAb EN10 en 15 aminoácidos (los residuos subrayados), que corresponde a una variación del 19,73 % (15/76 residuos totales en las regiones marco).

Incluso con estos grados de variaciones en las regiones marco, los fragmentos scFv, generados injertando secuencias CDR del mAb EN10 en las secuencias marco de cadena pesada y cadena ligera humanas identificadas, tienen afinidades relativamente buenas por ENO1 (KD = aproximadamente 10^{-11} M) (ver Tabla I a continuación). Estos resultados sugieren que las regiones marco pueden tolerar un grado relativamente alto de variaciones sin afectar las conformaciones de la región CDR.

Tabla I: ELISA de captura de ENO1 con EN10 quimérico y EN10 hum IMGT

	Quimera de ratón	EN10 hum IMGT
KD(M)	3,33E-11	3,65E-11

Estos dos pares de secuencias de cadena ligera y cadena pesada (4D5 hum y IMGT hum) se usarán como ejemplos para la construcción de anticuerpos humanizados contra ENO1 humana.

Ejemplo 7

Análisis de la afinidad de unión de los anticuerpos humanizados

Para confirmar el cambio de afinidad después de que se humanizaron los anticuerpos de ratón, las regiones variables de la cadena ligera humanizada y de las cadenas pesadas humanizadas de las versiones IMGT y 4D5 se generaron directamente mediante el procedimiento de síntesis de nucleótidos, respectivamente. La región variable de ratón, edición humanizada de las regiones variables IMGT y 4D5 y un vector de expresión de anticuerpo quimérico Fc humano pTCAE8-ENO1, como se muestra en la Figura 7A, se introdujeron en las células huésped para preparar las células que expresan los anticuerpos recombinantes. Como células huésped para la expresión, se usaron las células FreeStyle293 (fabricadas por Invitrogen). El vector se introdujo en las células huésped mediante lipofectamina 2000 de acuerdo con el manual de instrucciones adjunto (fabricado por Invitrogen). Aproximadamente 2,5 microgramos del vector de expresión de anticuerpos se linealizaron mediante enzimas de restricción, el gen se introdujo en 4×10^6 células, y las células se inocularon en una placa de cultivo de 6 pocillos. Se añadió el agente correspondiente a un marcador de selección del vector de expresión y las células se cultivaron de forma continua para formar una combinación estable.

Se preparó un sobrenadante de cultivo que contenía anticuerpo IgG humano mediante el procedimiento que se describe a continuación. Las células productoras de anticuerpos se aclimataron en un medio de expresión Free style™ 293 (GIBCO). Las células se cultivaron en un frasco de cultivo de tejidos y se recogió el sobrenadante del cultivo cuando la tasa de viabilidad de las células fue del 90 %. El sobrenadante recogido se filtró a través de filtros de 10 micrómetros y 0,2 micrómetros (fabricados por Millipore) para eliminar los contaminantes. El sobrenadante del cultivo que contenía el anticuerpo se purificó por afinidad mediante el uso de Proteína A (fabricada por Millipore), PBS como tampón de absorción y tampón de citrato de sodio 20 mM (pH 3,0) como tampón de elución. Las fracciones de elución se ajustaron a aproximadamente pH 6,0 añadiendo tampón de fosfato de sodio 50 mM (pH 7,0). La solución de anticuerpo preparada se reemplazó con PBS mediante el uso de una membrana de diálisis (valor de corte de 10.000 MW, fabricada por Spectrum Laboratories) y se esterilizó por filtración a través de un filtro de membrana (fabricado por Millipore) que tenía un tamaño de poro de 0,22 micrómetros para producir el anticuerpo purificado. La concentración del anticuerpo purificado se determinó midiendo la absorbancia a 280 nm y convirtiendo el valor medido en base a una densidad óptima de 1,45 que equivale a 1 mg/ml.

Para conocer la diferencia de cinética de enlace entre anticuerpos individuales, se usó la medición de resonancia de plasmón de superficie (SPR) con un BIAcore 2000 (BIAcore, Inc., Piscataway, Nueva Jersey) como se describió anteriormente (Karlsson y Falt, (1997) J. Immunol Methods 200: 121-133). Las matrices biosensoras de dextrano carboximetilado (CM5, BIAcore, Inc.) se activan con clorhidrato de N-etil-N'- (3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y N-hidroxisuccinimida (NHS) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El mAb EN10 quimérico se diluyó con acetato de sodio 10 mM, pH 4,8, en 5 microgramos/ml antes de la inyección a una velocidad de flujo de 20 micro L/minuto para lograr aproximadamente 100 unidades de respuesta (RU) de proteína acoplada seguida de la inyección de etanolamina 1 M para bloquear los grupos que no reactivos. Para las mediciones de cinética, se inyectaron diluciones en serie dobles de ENO1 (0,3125 nM a 40 nM) en tampón de corrida HBS-P BIAcore proporcionado por el fabricante (BIAcore, Inc., Piscataway, Nueva Jersey) a 25 grados C a una velocidad de flujo de 25 microL/min, y las respuestas de unión en el mAb EN10 se corrigieron mediante la sustracción de las respuestas en una celda de flujo en blanco. Se usaron las velocidades de asociación (kon o ka) y las velocidades de disociación (koff o kd) mediante el uso de un modelo de unión de Langmuir individual simple con ajustes separados de los parámetros kon y koff. (Programa de evaluación BIAcore.TM. Versión 3.2).

Los resultados se muestran en la Tabla II y la Figura 7 B. Los parámetros kon y koff de la unión del mAb EN10 quimérico con ENO1 son $3,57 \times 10^5$ y $8,271 \times 10^{-5}$, respectivamente, y Kd es $2,313 \times 10^{-10}$ mol/L. Los parámetros kon y koff de la unión del mAb EN10 hum IMGT con ENO1 son $5,31 \times 10^5$ y $1,162 \times 10^{-5}$, respectivamente, y Kd es $2,188 \times 10^{-10}$ mol/L. Para la edición 4D5 humanizada, los parámetros kon y koff son $3,511 \times 10^5$ y $1,755 \times 10^{-5}$, respectivamente, y Kd es $4,997 \times 10^{-10}$ mol/L.

A partir de la Figura de 7B y la Tabla II, los resultados sugieren que todos los anticuerpos EN10 humanizados pueden reconocer la proteína ENO1 humana y, después de la humanización, la afinidad de la edición IMGT es similar a la del anticuerpo quimérico de ratón y tiene una afinidad favorecida con un valor de Kd de aproximadamente $2,188 \pm 0,12 \times 10^{-10}$ M (N = 3). El mAb EN10 hum 4D5 también tiene una afinidad similar, de $4,997 \times 10^{-10}$ M.

Ejemplo 8

Los anticuerpos mAb EN10 hum 4D5 y mAb EN10 hum IMTG inhiben la actividad del receptor de plasminógeno inducida por el LPS de U937

Para evaluar la capacidad de los mAb EN10 hum 4D5 y mAb EN10 hum IMTG para inhibir la actividad del receptor de plasminógeno ENO1 de las células cancerosas, se cultivó una línea celular de linfoma humano U937 en RPMI que contenía FCS al 10 %. Las células se trataron con 10 microgramos/ml de LPS durante 6 horas para inducir la expresión de la proteína ENO1 en la superficie celular. Después se preincubaron $1,5 \times 10^6$ células/ml en PBS con 1 microgramo/ml de Lys-plasminógeno humano y a diferentes concentraciones de mAb EN10 hum 4D5 y mAb EN10 hum IMTG durante una hora, respectivamente. Las muestras se lavaron con PBS dos veces y se añadieron 3 nM de activador de plasminógeno específico de tejido y 0,5 mM de sustrato cromogénico S-2251. Después de una hora de incubación a 37 °C, se leyó la DO 405. Cada estudio se repitió tres veces, y se analizó la actividad antagonista. Los datos se presentan como la media $\pm$ SD. Se usó la prueba T para comparar cada grupo. Los valores de $P < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

Los resultados del experimento se muestran en la Figura 8A y la Figura 8B. Al igual que el anticuerpo parental mAb EN10, 50 microgramos tanto del mAb EN10 hum 4D5 como del mAb EN10 hum IMTG tuvieron actividades antagonistas del receptor de plasminógeno ENO1 altas y pueden lograr una inhibición del 50 y 56 % de la actividad ENO1 específica inducida por LPS y el porcentaje de inhibición es dependiente de la dosis. Por tanto, ambos anticuerpos humanizados podrían tener un buen potencial para inhibir la trans migración de células cancerosas a los órganos objetivos.

Ejemplo 9

Los anticuerpos mAb EN10 hum 4D5 y mAb EN10 hum IMTG inhiben la actividad de invasión de U937

Como resultado del ejemplo 8, los anticuerpos mAb EN10 hum 4D5 y mAb EN10 hum IMTG atenúan la actividad inducible del receptor de plasminógeno ENO1 de U937. Esto puede resultar, al igual que en el anticuerpo del paciente, en la inhibición de la actividad invasora de las células cancerosas.

Para evaluar la actividad antitrans migración de mAb EN10 hum 4D5 y mAb EN10 IMTG, 3×10^6 de células bEnd.3 endoteliales de cerebro de ratón se recubrieron previamente con gel de matriz en las cámaras superiores del kit de ensayo de migración e invasión celular Cytoselect™ de 24 pocillos en medio RPMI-1640 que contenía suero bovino fetal al 10 % durante 24 h. Las cámaras superiores se lavaron con PBS dos veces. Se añadió medio RPMI que contenía suero bovino fetal al 2 % y al 10 % a las cámaras superiores e inferiores, respectivamente. Después de mezclar con 10, 50 y 100 microgramos/ml de mAb EN10 hum 4D5 y mAb EN10 hum IMTG, respectivamente, 2×10^4 células de U937 se sembraron en la cámara superior de un sistema de ensayo de dos cámaras y se incubaron durante 24 horas. Se usó una IgG antihumana como control negativo. Se separaron dos cámaras mediante un filtro de microporos (tamaño de poro de 8 μ m) recubierto con matrigel. Después del periodo de incubación, las células de la cámara inferior se contaron con un hemocitómetro bajo un microscopio. Cada estudio se repitió tres veces. Los datos se presentan como la media $\pm$ SD. Se usó la prueba T para comparar la actividad entre cada grupo. Los valores de $P < 0,05$ se consideran estadísticamente significativos.

Los resultados se muestran en la Figura 9A y 9B. Como en el estudio de Wang y otros, el tPA estimuló la invasión inicial de U937 (Figuras 8A y 8B). La actividad de invasión de U937 se inhibió aproximadamente en un $41,8 \pm 11$ % ($N=3$) y 33 ± 11 % ($N=3$), cuando las células se administraron con 50 microgramos por ml de anticuerpos humanos mAb EN10 4D5 y mAb EN10 IMTG, respectivamente (Figuras 9A y 9B). Estos resultados son similares a los del Ejemplo 4. Ambos anticuerpos humanizados tienen la capacidad de inhibir la actividad de trans migración de las células U937.

Ejemplo 10

El mAb EN10 humanizado inhibe la disociación de las células CL1-5 del colágeno y la fibronectina

Para evaluar la vía de transducción de señales entre el receptor de plasminógeno ENO1-plasmina y los sustratos extracelulares, se recubrieron con 1 mg/ml de gelatina, 100 microgramos/ml de fibrinógeno, 10 microgramos/ml de colágeno y 10 microgramos/ml de fibronectina, respectivamente, sobre una placa ELISA no tratada durante la noche. Se sembraron las células CL1-5 (4×10^4 células) en la placa y se añadió 50 microgramos/ml de mAb EN10 hum 4D5 a 200 μ l de DMEM que contenía FCS al 10 %. Las células se incubaron a 37 °C durante 24 horas y después se lavaron dos veces con PBS. Se añadió WST al 10 % y las mezclas de reacción se incubaron a 37 °C durante 4 horas. El número relativo de células en la placa se estimó mediante la lectura de DO450. Cada estudio se repitió tres veces. Los datos se presentan como la media $\pm$ DS. Se usó la prueba T para comparar la actividad entre cada grupo. Los valores de $P < 0,05$ se consideran estadísticamente significativos.

Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 10A. Estos datos indican que las lecturas de DO450 en placas recubiertas con fibronectina y colágeno son $2,45 \pm 0,37$ ($N = 3$) y $1,83 \pm 0,44$ ($N = 3$). Las lecturas son mucho más altas que las de las placas con gelatina y fibrinógeno, que no difieren significativamente de la lectura inicial. No hay diferencias significativas entre el grupo tratado con mAb EN10 hum 4D5 y el grupo no tratado. Estos resultados sugieren que las células CL1-5 favorecen la unión a fibronectina y colágeno, y mAb EN10 hum 4D5 no está implicado en la vía de asociación celular cuando las células se incuban en el medio sin proteasas corriente abajo, por ejemplo plasminógeno y tPA. Los datos de la Figura 10A sugieren que la actividad del receptor de plasminógeno ENO1 no está implicada en la vía de asociación celular en la matriz extracelular. Además, se prueba si ENO1 participa en la vía de disociación celular en la matriz extracelular. Un microgramo/ml de fibronectina y 10 microgramos/ml de colágeno se recubrieron, respectivamente, sobre una placa ELISA no tratada durante la noche. Las células CL1-5 (4×10^4 células) se sembraron en la placa y se añadieron 0, 6,25, 12,5, 25 y 50 microgramos/ml de mAb EN10 hum 4D5, respectivamente, a 200 micro L de DMEM que contenía FCS al 10 %. Además, se añadieron 10 microgramos/mL de Glu-plasminógeno y tPA 2 nM. Las células se incubaron a 37 °C durante 24 horas y se lavaron dos veces con PBS. Después, se añadió WST al 10 % y las mezclas de reacción se incubaron a 37 °C durante 4 horas. El número relativo de células en la placa se estimó mediante las lecturas de DO450. Cada estudio se repitió tres veces. Los datos se presentan como la media $\pm$ DS. Se usó la prueba T para comparar la actividad entre cada grupo. Los valores de $P < 0,05$ se consideran estadísticamente significativos.

Los resultados de estos experimentos se muestran en la Figura 10B y la Figura 10C. Los datos indican que el número de células es directamente proporcional a las concentraciones de mAb EN10 hum 4D5 en ambas matrices extracelulares tratadas cuando el medio contiene plasminógeno y tPA, proteasas corriente abajo del receptor ENO1. Existe una diferencia significativa entre el grupo tratado con 50 microgramos de mAb EN10 hum 4D5 y el grupo de control IgG ($P < 0,05$) en ambos estudios de matriz extracelular. Estos resultados sugieren que ENO1 está involucrada en la vía de disociación de las células CL1-5 de las matrices extracelulares, presumiblemente aumentando la actividad proteasa de la plasmina y tPA. El mAb EN10 hum 4D5, que funciona como antagonista de ENO1, bloquea la actividad del receptor de ENO1, lo que inhibe la activación de la plasmina y tPA y, por lo tanto, inhibe la actividad de disociación de las células CL1-5 de las matrices extracelulares y la invasión.

Ejemplo 11

Anticuerpos ENO-1 humanizados muestran el efecto ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos) sobre la línea celular de cáncer de pulmón. Se conoce que además de la inhibición anticrecimiento, la ADCC de Herceptin es muy importante por su efecto antitumoral. Debido a que los anticuerpos mAb EN10 hum 4D5 y mAb EN10 hum IMGT tienen el mismo fragmento Fc de Herceptin, racionalizamos que ambos anticuerpos poseen actividad ADCC.

Para probar el efecto ADCC de los anticuerpos mAb EN10 hum 4D5 y mAb EN10 hum IMGT contra células cancerosas, 2×10^4 de células cancerosas CL1-5 de pulmón humano se cultivaron en placas de ELISA de 96 pocillos. Después de la incubación durante la noche, se añadieron diferentes concentraciones de mAb EN10 hum 4D5, mAb EN10 hum IMGT y los anticuerpos IgG1 de control. Se recogieron muestras de sangre fresca de 5 voluntarios siguiendo la línea de la Guía IRB de DCB. Se prepararon PBMC (células mononucleares de sangre periférica) mediante solución Sangre:PBS: FICOLL= 1:1:1 bajo centrifugación a 3000 rpm durante 30 minutos. Las PBMC resultantes se recogieron y se lavaron con PBS dos veces. Las PBMC se suspendieron en medio RPMI1640 que contenía FBS al 5 % y se diluyeron a la concentración con $2,5 \times 10^7$ células/mL. Después se añadieron 50 microlitros de PBMC a las placas de ELISA que contenían CL1-5. Las células se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos y se incubaron a 37 °C durante 4 horas. Las muestras se lavaron con PBS dos veces y se añadió un kit de detección de ADCC siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. El porcentaje de lisis celular en la placa se estimó mediante la lectura de DO530/590. Cada estudio se repitió tres veces. Los datos se presentan como la media $\pm$ DS.

Los resultados de estos experimentos se muestran en las Figuras 11A y 11B. El porcentaje de lisis celular no muestra un aumento significativo cuando las células se administraron con diferente concentración de anticuerpo IgG humano de control en estudios de relación efector / objetivo 40:1 y 1:15. En el estudio de relación efector / objetivo 40:1, las células tratadas con 1×10^{-9} M del anticuerpo mAb EN10 hum 4D5 se comenzó a observar una diferencia de lisis significativa en comparación con las células tratadas con la misma concentración de IgG humana. Los anticuerpos mAb EN10 hum 4D5 y mAb EN10 hum IMGT mostraron una actividad de lisis máxima de aproximadamente 42 % cuando las células se administraron con 10^{-6} M de anticuerpos. En un estudio de baja relación efector / objetivo (15:1), tanto los grupos de anticuerpos de mAb EN10 hum 4D5 como mAb EN10 hum IMGT comenzaron a observar una lisis significativa a 1×10^{-8} M y alcanzaron la lisis máxima a los 10^{-6} M. El ADCC EC50 de los anticuerpos mAb EN10 hum 4D5 y mAb EN10 hum IMGT se estima en aproximadamente 8×10^{-9} M y 1×10^{-8} M, respectivamente. Ambos anticuerpos EN10 humanizados tienen actividades ADCC. Nuestros resultados sugieren que, además de la actividad antimigratoria de mAb EN10 hum 4D5 y mAb EN10 hum IMGT, los anticuerpos pueden proporcionar la actividad ADCC como un agente anticancerígeno.

Ejemplo 12

El efecto inhibidor de los anticuerpos EN10 humanizados sobre el crecimiento tumoral.

El anticuerpo EN10 humanizado tiene una buena afinidad con la Kd aproximadamente de $2,311 \pm 0,003 \times 10^{-10}$ mol/L y un potencial para un desarrollo adicional. Para evaluar los efectos terapéuticos de los anticuerpos EN10 humanizados, se realizó un modelo de xenoinjerto de ratón CL1-5. Las células de adenocarcinoma de pulmón CL1-5F4 (1×10^6 células/ratón; 5 ratones/grupo) se inocularon por vía subcutánea en el día 0. El procedimiento terapéutico se realizó 2 días después de la inoculación del tumor mediante la administración de 10 mpk (mg/kg) de un anticuerpo control de isotipo (CTL) mAb EN10 hum 4D5 o mAb EN10 hum IMGT, dos veces por semana. Se midió el volumen del tumor y el peso corporal de cada ratón semanalmente. Los datos se representan como media $\pm$ DS para los grupos individuales.

Los resultados se muestran en la Figura 12. Después de 2 días, no hay diferencias significativas en el tamaño del tumor entre los grupos control, mAb EN10 hum, y mAb EN10 hum IMGT. Después del día 23, el tumor de los ratones del grupo de control comienza a crecer exponencialmente, y no hay un crecimiento tumoral significativo en los ratones tratados con mAb EN10 hum 4D5 y mAb EN10 hum IMGT. Después del día 30, el tamaño promedio del tumor de los ratones del grupo de control es de $1600 \pm 200 \text{ mm}^3$ (N=5), y para los ratones tratados con 10 mpk de mAb EN10 hum 4D5 y mAb EN10 hum IMGT, los tamaños promedios de los tumores son $505 \pm 24 \text{ mm}^3$ (N=5) y $330 \pm 11 \text{ mm}^3$ (N=5), respectivamente. Los tamaños promedios de tumor de los grupos de tratamiento tanto del mAb EN10 hum 4D5 como mAb EN10 hum IMGT son significativamente más pequeños, en comparación con el del grupo de control con un valor de P de 0,004 y 0,003, respectivamente. No hay una diferencia significativa en el tamaño del tumor entre los grupos de tratamiento del mAb EN10 hum 4D5 y mAb EN10 hum IMGT. Este resultado indica que mAb EN10 hum 4D5 y mAb EN10 hum IMGT tienen la actividad de inhibición del crecimiento tumoral en las células CL1-5 en el modelo de xenoinjerto de ratón y el mAb EN10 tiene una buena eficacia como reactivo para la terapia del cáncer.

Ejemplo 13

La optimización del codón de la célula CHO

A partir de los ejemplos anteriores, creemos que el anticuerpo monoclonal ENO1 tiene potencial para desarrollarse como anticuerpo terapéutico.

Para producir en masa el anticuerpo terapéutico humanizado en la línea celular CHO, se realizó la optimización del codón mediante el uso de la herramienta de software GeneOptimizer®. (<http://www.lifetechnologies.com/tw/zt/home/life-science/cloning/gene-synthesis/geneart-gene-synthesis/geneoptimizer.html>). La región variable de mAb EN10 hum IMGT se sometió para obtener los codones optimizados. Los parámetros incluyen la distribución de la calidad del codón (el valor de calidad del codón utilizado con más frecuencia para el sistema de expresión deseado) y el contenido de GC (optimiza el codón para que el contenido de GC esté dentro del intervalo deseado). El codón optimizado de la región variable de la cadena ligera y la región variable de la cadena pesada para la línea celular CHO se muestran en la Figura 13A y la Figura 13B (SEQ ID NO:14 y SEQ ID NO:16), respectivamente.

Las regiones variables de codón optimizado de la cadena ligera y cadenas pesadas en la célula CHO del mAb EN10 hum IMGT se generaron directamente mediante el procedimiento de síntesis de nucleótidos, respectivamente. Después, las regiones variables del mAb EN10 hum IMGT y un vector de expresión pCHO-ENO1 del anticuerpo Fc de Herceptin[®] humano, se muestran en la Figura 13A, se introdujeron en las células huésped para preparar las células que expresan los anticuerpos recombinantes. Como células huésped para la expresión, se usaron las células CHOS (Life-Technology Inc.). El vector se introdujo en las células huésped mediante lipofectamina 2000 de acuerdo con el manual de instrucciones adjunto (fabricado por Invitrogen). Aproximadamente 2,5 microgramos del vector de expresión de anticuerpos se linealizaron mediante enzimas de restricción, el gen se introdujo en 4×10^6 células, y las células se inocularon en una placa de cultivo de 6 pocillos. Para la selección de baja concentración, los conjuntos de células resultantes se cultivaron en el medio de selección que contenía 10 microgramos/ml de puomicina y 100 nano molar de metotrexato o 20 microgramos/ml de puomicina y 200 nano molar de metotrexato. Para realizar la selección adicional, se realizó la otra etapa de selección de alta concentración. Las mezclas de selección primaria se cultivaron adicionalmente en el medio que contenía 30 microgramos/ml de puomicina y 500 nano molar de metotrexato o en el medio que contenía 50 microgramos/ml de puomicina y 1000 nano molar de metotrexato. Para generar la línea celular de producción de anticuerpos final, se inocularon 96.000 células de las mezclas de la segunda etapa en medio semisólido y se determinaron y seleccionaron 768 células de alta expresión de anticuerpos mediante la intensidad de fluorescencia realizada en el ClonePix2 de acuerdo con el protocolo del manual de instrucciones (fabricado por Molecular Device Inc.). Las 10 mejores líneas celulares con alto contenido de plomo se seleccionaron con parámetros que incluyen velocidades de crecimiento, velocidades de producción por lotes de 5 días y velocidades de producción por lotes de alimentación simple de 14 días. Después de 60 generaciones de pruebas de estabilidad, se determinó la línea celular de producción candidata.

Los resultados se muestran en la Figura 13A. Cuando el ácido nucleico del mAb EN10 hum IMGT cuyos codones se optimizaron en el sistema de expresión de células CHO mediante la herramienta de software GeneOptimizer® se alineó con el del humano original, las homologías de la cadena ligera variable y cadena pesada variable entre dos ediciones son 74,5 % y 84 %, respectivamente. Este resultado indica que el codón favorecido entre las células

humanas y las células CHO es diferente incluso si el anticuerpo codificado tiene la misma secuencia de proteína. Cuando se construyeron ambas ediciones de genes de anticuerpos para pCHO1.0 y se expresaron transitoriamente en las células CHO, la velocidad de producción de anticuerpos de la edición del codón de la célula CHO es aproximadamente 3,1 veces mayor que la del humano original (datos no mostrados). Nuestro resultado sugiere que la optimización del codón es muy importante para la producción de anticuerpos de alto rendimiento. Las mezclas de células de mAb ENO10 hum IMGT optimizado para CHO se seleccionaron adicionalmente en el medio ForiCHO (Life Technology Inc.) y se seleccionaron las líneas celulares de alta producción de anticuerpos con un ClonePix2. Cuando se analizaron las velocidades de producción de los 15 clones principales en los días 5 y 14, los resultados se muestran en la Figura 13B. Las velocidades de producción varían de 155 mg/litro a 91,3 mg/litro en el día 5 y de 358,7 mg/litro a 247,5 mg/litro en el día 14. Todos estos clones tienen buena viabilidad y velocidad de crecimiento en el medio simple. Estos resultados sugieren que todos los clones pueden mejorar su capacidad de producción de anticuerpos después de la optimización del medio. Para explorar aún más la productividad de anticuerpos de estos clones, se realizaron diferentes combinaciones de glucosa y los estudios de medio de alimentación se realizaron y se analizaron las producciones raras de anticuerpos en los 6 clones mejores en el día 15. El resultado se mostró en la Figura 13C. La velocidad de producción máxima de los 6 clones superiores varía de 0,7 gramos por litro a 0,81 gramos por litro después de 15 días de incubación. Todos los clones tienen buena estabilidad después del análisis de 60 generaciones y producen anticuerpos intactos cuando los anticuerpos se analizaron por SDS PAGE (Figura 13D). Nuestro estudio sugiere que estos clones tienen un buen potencial como líneas celulares de producción de anticuerpos terapéuticos para ENO1.

En resumen, al igual que el anticuerpo mAb EN10, el mAb EN10 humanizado 4D5 y el mAb EN10 humanizado IMGT usan sus actividades antagonistas del receptor del plasminógeno ENO1 para inhibir la activación del plasminógeno, induciendo de este modo la regulación negativa de la actividad proteasa en la superficie celular, lo que a su vez da como resultado la inhibición de la disociación de las células cancerígenas de la matriz extracelular. Como resultado, los anticuerpos contra ENO1 pueden inhibir la capacidad de invasión de las células cancerígenas. Estos datos indican que los anticuerpos ENO1 (por ejemplo, MAb EN10) tienen afinidad, eficacia y potencial favorables como anticuerpos terapéuticos para el tratamiento de cánceres.

Listado de secuencias

<110> Centro de Desarrollo para la Biotecnología

<120> Anticuerpos humanizados específicos contra alfa-enolasa y procedimientos de usos en la terapia del cáncer

<130> 17787/021WO1

<160> 17

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 119

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

ES 2 823 798 T3

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

 10 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Cys
 20 25 30

 15 Val Met Asn Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

 20 Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

 25 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

 30 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

 35 Ala Arg Glu Gly Phe Tyr Tyr Gly Asn Phe Asp Asn Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

 40 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

 45 <210> 2
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Mus mucus

 <400> 2

 50 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

ES 2 823 798 T3

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
 20 25 30
 5
 Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
 35 40 45
 10
 Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Pro Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 15
 Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 20
 Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Tyr
 85 90 95
 25
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Arg
 100 105
 30
 <210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 3
 35
 Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Cys Val Met Asn
 1 5 10
 40
 <210> 4
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 45
 <400> 4
 Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 50
 Gly
 55
 <210> 5
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 60
 <400> 5
 65

ES 2 823 798 T3

	Glu Gly Phe Tyr Tyr Gly Asn Phe Asp Asn
	1 5 10
5	<210> 6 <211> 11 <212> PRT <213> Mus mucus
10	<400> 6
15	Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Leu Thr
	1 5 10
20	<210> 7 <211> 7 <212> PRT <213> Mus mucus
25	<400> 7
30	Asn Ala Lys Thr Leu Pro Glu
	1 5
35	<210> 8 <211> 9 <212> PRT <213> Mus mucus
40	Gln His His Tyr Gly Thr Pro Tyr Thr
	1 5
45	<210> 9 <211> 108 <212> PRT <213> Homo sapiens
50	<400> 9
55	
60	
65	

ES 2 823 798 T3

	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
	1				5				10					15		
5	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Asn	Ile	Tyr	Ser	Tyr
				20					25					30		
10	Leu	Thr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
			35					40					45			
15	Tyr	Asn	Ala	Lys	Thr	Leu	Pro	Glu	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
		50					55					60				
20	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
	65					70					75					80
25	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	His	Tyr	Gly	Thr	Pro	Tyr
					85					90					95	
30	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg				
							100				105					
35	<210> 10															
	<211> 119															
	<212> PRT															
	<213> Homo sapiens															
40	<400> 10															
45																
50																
55																
60																
65																

ES 2 823 798 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 5
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Cys
 20 25 30
 10
 Val Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 15
 Ala Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 20
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 25
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 30
 Ala Arg Glu Gly Phe Tyr Tyr Gly Asn Phe Asp Asn Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 35
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 40
 <210> 11
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 45
 <400> 11
 50
 55
 60
 65

	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	
	1				5					10					15		
5																	
	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Cys	
				20					25					30			
10																	
	Val	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	
			35					40					45				
15																	
	Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Tyr	Asn	Asp	Gly	Thr	Lys	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe	
		50					55					60					
20																	
	Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Thr	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	
	65					70					75					80	
25																	
	Met	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Ser	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
					85					90					95		
30																	
	Ala	Arg	Glu	Gly	Phe	Tyr	Tyr	Gly	Asn	Phe	Asp	Asn	Trp	Gly	Gln	Gly	
				100					105					110			
35																	
	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
			115														
	<210>	12															
	<211>	18															
	<212>	ADN															
40	<213>	Secuencia Artificial															
	<220>																
	<223>	Sintética															
45	<400>	12															
	gtaaacaacg	acggcgag														18	
	<210>	13															
	<211>	17															
50	<212>	ADN															
	<213>	Secuencia Artificial															
	<220>																
	<223>	Sintética															
55	<400>	13															
	caggaaacag	ctatgac														17	
	<210>	14															
60	<211>	300															
	<212>	ADN															
	<213>	Secuencia Artificial															
	<220>																
65	<223>	Sintética															

ES 2 823 798 T3

	<400> 14		
		gacatccaga tgaccagtc cccctccagc ctgtctgcct ctgtgggcga cagagtgacc	60
5		atcacctgtc gggcctccga gaacatctac tctacctga cctggtatca gcagaagccc	120
		ggcaaggccc ccaagctgct gatctacaac gccaaagccc tgcccagagg cgtgccctct	180
10		agattctccg gctctggctc tggcaccgac ttaccctga ccatcagctc cctgcagccc	240
		gaggacttcg ccacctacta ctgccagcac cactacggca cccctacac ctttgccag	300
15	<210> 15 <211> 323 <212> ADN <213> Homo sapiens		
20	<400> 15		
		gatatccaga tgaccagtc cccagctcc ctgtccgcct ctgtgggcga tagggtcacc	60
25		atcacctgcc gagcaagtga gaatatctac agttatttaa catggtatca acagaaacca	120
		ggaaaagctc cgaaactact gatttacaat gcaaaaacct taccagaagg agtcccttct	180
		cgtttctctg gttccggctc tgggacggat ttactctga ccatcagcag tctgcagccg	240
30		gaagacttcg caacttatta cagtcaacat cattatggta ctccgtacac gtccggacag	300
		ggtaccaagg tggagatcaa acg	323
35	<210> 16 <211> 356 <212> ADN <213> Secuencia Artificial		
40	<220> <223> Sintética		
45	<400> 16		
		caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggcgccctc cgtgaagggtg	60
		tcttgcaagg cctccggcta cacctttacc agctgcgtga tgaactgggt gcgacaggct	120
50		cctggacagg gcctggaatg gatgggctac atcaaccctt acaacgacgg caccaagtac	180
		aacgagaagt tcaagggcag agtgaccatg accaccgaca cctccaccag caccgcctac	240
55		atggaactgc ggtccctgag atccgacgac accgccgtgt actactgcgc cagagagggc	300
		ttctactacg gcaacttcga caactggggc cagggcaccc tcgtgaccgt gtcac	356
60	<210> 17 <211> 356 <212> ADN <213> Homo sapiens		
65	<400> 17		

ES 2 823 798 T3

	caggttcagc	tggtgcagtc	tggagctgag	gtgaagaagc	ctggggcctc	agtgaaggtc	60
	tcttgcgaagg	cttctggata	cacattcact	agctgtgtta	tgaactgggt	gcgacaggcc	120
5	cctggacaag	ggcttgagtg	gatgggatat	attaatcctt	acaatgatgg	tactaagtac	180
	aatgagaagt	tcaaaggcag	agtcaccatg	accacagaca	catccacgag	cacagcctac	240
10	atggagctga	ggagcctgag	atctgacgac	acggccgtgt	attactgtgc	gagagagggg	300
	ttttactacg	gtaactttga	caattggggc	caagggaccc	tggtcacccgt	ctcctc	356

15

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo humanizado, o un fragmento de unión de este, en el que el anticuerpo humanizado o un fragmento de unión de este se une a la ENO1 humana, en el que el anticuerpo o un fragmento de unión de este que comprende un dominio de región variable de la cadena ligera (VL) que comprende una CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos LCDR1 de RASENIYSYLT (SEQ ID NO:6) y una CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos LCDR2 de NAKTLPE (SEQ ID NO:7) y una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos LCDR3 de QHHYGTPYT (SEQ ID NO:8) y un dominio de región variable de la cadena pesada (VH) de anticuerpos que comprende una CDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos HCDR1 de GYTFTSCVMN (SEQ ID NO:3), una CDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos HCDR2 de YINPYNDGTTYNEKFKG (SEQ ID NO:4) y una CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos HCDR3 de EGFYYGNFDN (SEQ ID NO:5), en el que las regiones marco en el dominio de la región variable de la cadena ligera (VL) y el dominio de la región variable de la cadena pesada (VH) comprenden las secuencias de aminoácidos de una inmunoglobulina humana, en el que las regiones marco en el dominio de región variable de la cadena ligera (VL) son de una cadena kappa.
2. El anticuerpo, o un fragmento de unión de este, de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el dominio VL comprende los residuos de aminoácidos 1-110 de la SEQ ID NO:9.
3. El anticuerpo, o un fragmento de unión de este, de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el dominio VH comprende los residuos de aminoácidos 1-120 de la SEQ ID NO:10 u 11.
4. El anticuerpo, o un fragmento de unión de este, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el anticuerpo tiene una región constante de un tipo IgG1, y en el que el fragmento de unión de este es un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, o un fragmento scFv.
5. El anticuerpo, o un fragmento de unión de este, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el anticuerpo, o el fragmento de unión de este, puede inhibir la actividad del receptor de plasminógeno de ENO1.
6. El anticuerpo, o un fragmento de unión de este, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el anticuerpo, o el fragmento de unión de este, puede unirse a ENO1 humana con una constante de disociación (K_d) de 10⁻¹¹ M a 10 nM.
7. El anticuerpo, o un fragmento de unión de este, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
8. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento del cáncer de pulmón, mama, páncreas, hígado, colorrectal o próstata, la composición farmacéutica comprende el anticuerpo o el fragmento de unión de este, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
9. Un vector de expresión que comprende un polinucleótido que codifica el anticuerpo, o el fragmento de unión de este, de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
10. Una célula que comprende el vector de expresión de la reivindicación 9.
11. La célula de acuerdo con la reivindicación 10, en la que la célula es una célula CHO.

Figura 1

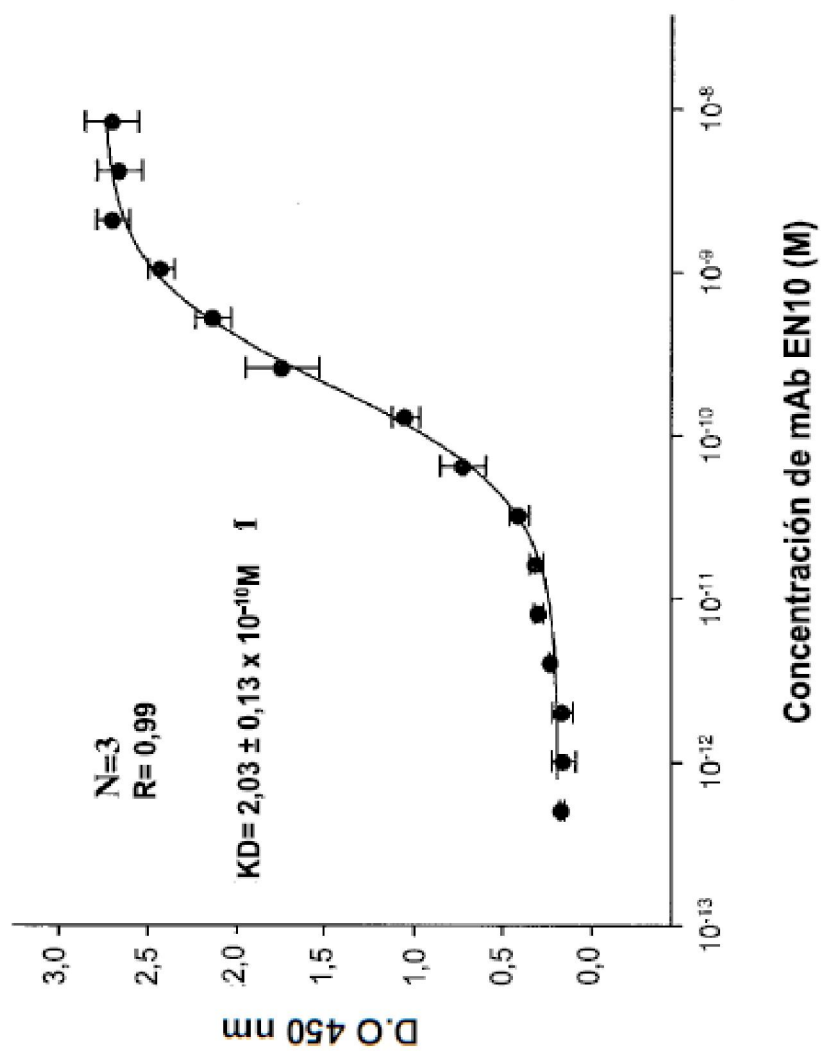


Figura 2

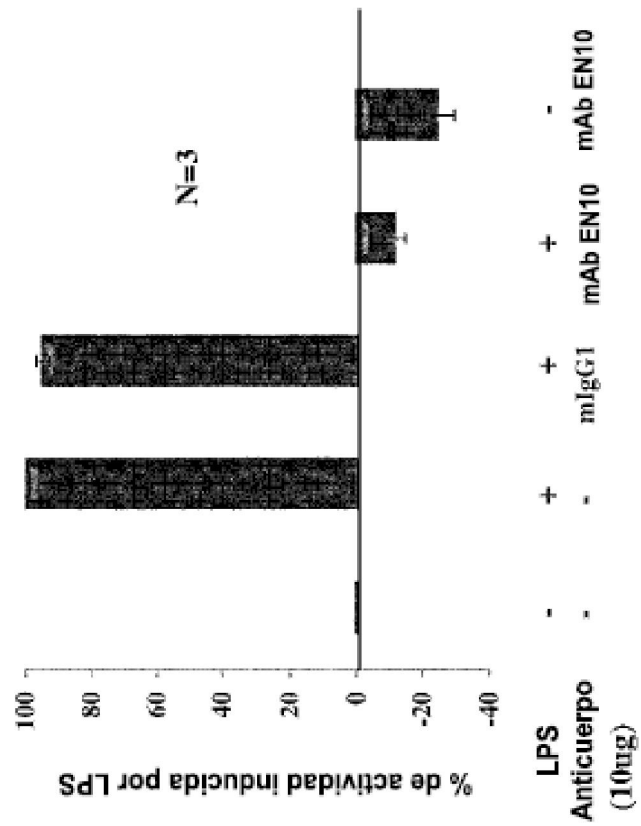


Figura 3

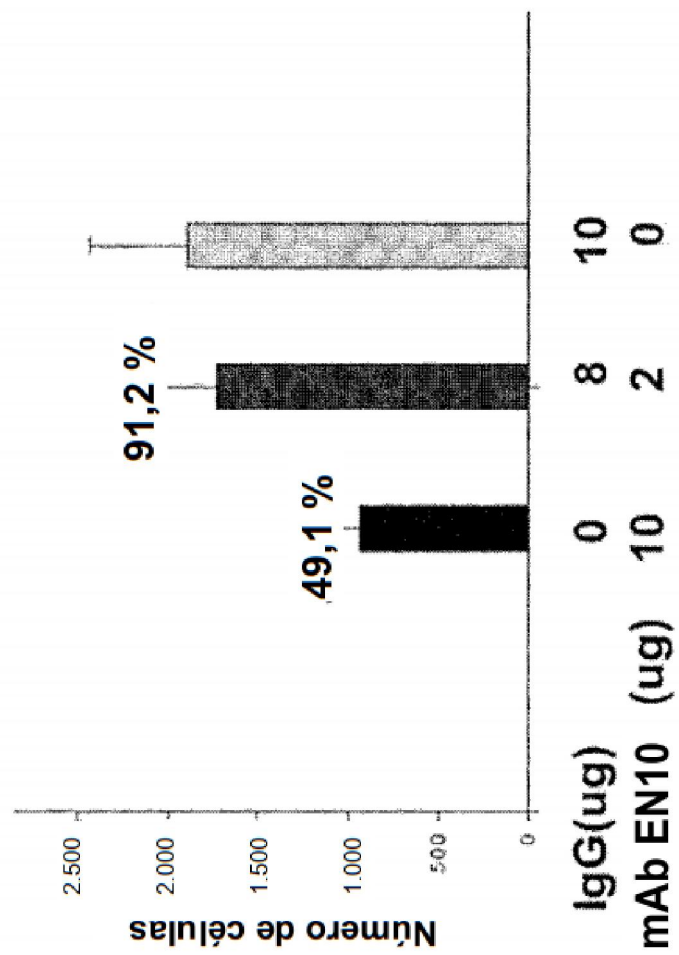


Figura 4

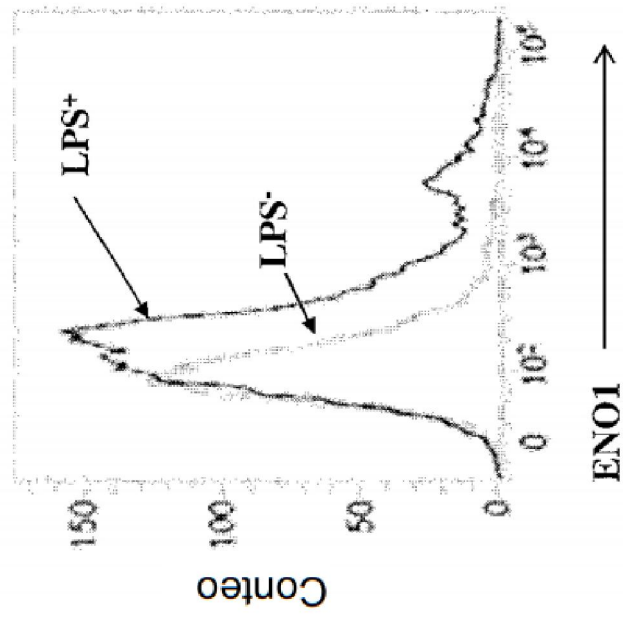


Figura 5A

Kabat	1	5	10	15	20	25	36	40	
	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSCVMN						WWVKQKPGQG		
	FR1						HCDR1		FR2
							SEQ ID NO:3		
Kabat	45					66	70	75	80 82ABC
	LEWIGVINPYNDG						TKYNEKFKG		
							HCDR2		FR3
							SEQ ID NO:4		
Kabat	85	90	9394			105	110		
	EDSAVYYCAREG						FYGNFDN		
							HCDR3		FR4
							SEQ ID NO:5		
							WGQGTTLTVSS		
							SEQ ID:NO1		

Figura 5B

Kabat	1	5	10	15	20	35	40
	DIQMTQSPASLSASVGETVTITCR <u>ASENIYSYLTWYQQKQGS</u> SEQ ID NO:2						
	FR1			LCDR1		FR2	
	SEQ ID NO:6						
Kabat	45		60	65	70	75	80 85
	PQLLVYNAKTLP <u>EGVPSRFS</u> GGSGGTQFSLKINSLQPEDFGSY SEQ ID NO:2						
	LCDR2			FR3			
	SEQ ID NO:7						
Kabat			100	104			
	YCQHGYGTPYT <u>FGGGTKLE</u> TR SEQ ID: NO2						
	LCDR3			FR4			
	SEQ ID NO:8						

Figura 6A

Alineamiento primario de segmentos V_L

Kabat	1	5	10	15	20	LCDR1	35	40		
	DIQMTQSPASLSASVGETVTITC[RASENIYSYLT]WYQQKQGS									
	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC[RASENIYSYLT]WYQQKPGKA									
	FR1				SEQ ID NO:6					
	FR2									
Kabat	45	LCDR2			60	65	70	75	80	85
	PQLLVY[NAKTLPE]GVPSRFSGSGGTQFSLKINSLQPEDFGSY									
	PKLLIY[NAKTLPE]GVPSRFSGSGGTDFTLTISSLQPEDFATY									
	SEQ ID NO:7				FR3					
Kabat	LCDR3			100	104	SEQ ID NO:2				
	YC[QHHYGTPT]FGGGTKLEITR					SEQ ID NO:9				
	YC[QHHYGTPT]FGQGTKLEIKR					SEQ ID NO:8				

Clon 10 : Musmus IGKV12-44*01 F

Plantilla humana: V kappa I

Figura 6A(Cont.)
Alineamiento primario de segmentos V_H

Kabat	1	5	10	15	20	25	30	35	40					
	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKAS					[GYTFTSCVMN]	WVKQKPGQG							
	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS					CAAS	[GYTFTSCVMN]	WVRQAPGKG						
	FR1					SEQ ID NO:3		FR2						
Kabat	45	HCADR2					66	70	75	80	82	A	B	C
	LEWIG					[YINPYNDG	TKYNEKFKG]	KATLTSDKSSSTAYMELSSLTS						
	LEWVA					[YINPYNDG	TKYNEKFKG]	RFTISRDDSKNTLYLQMN					SLRA	
	SEQ ID NO:4					FR3								
Kabat	85	90	93	94	HCADR3					105	110			
	EDSAVYYCAR					[EGFY	YGNFDN]	WGQGTTLTVSS					SEQ ID NO:1	
	EDTAVYYCAR					[EGFY	YGNFDN]	WGQGTTLTVSS					SEQ ID NO:10	
	SEQ ID NO:5													

Clon 10 : Musmus IGHV1-14*01 F

Plantilla humana: VH III

Figura 6B

Alineamiento primario de segmentos V_L

Kabat	1	5	10	15	20	LCDR1					35	40	
	DIQMTQSPASLSASVGETVTITC[RASENIYSYLT]WYQQKQGS												
	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC[RASENIYSYLT]WYQQKPGKA												
	FR1					SEQ ID NO:6							FR2
Kabat	45	LCDR2					60	65	70	75	80	85	
	PQLLVY[NAKTILE]GVPSRFSGSGGTQFSLKINSLOPEDFGSY												
	PKLLIY[NAKTILE]GVPSRFSGSGGTDFTLTISLQPEDEFATY												
	SEQ ID NO:7					FR3							
Kabat	LCDR3					100	104						
	YC[QHHYGTPYT]FGGGTKLEITR SEQ ID NO:2												
	YC[QHHYGTPYT]FGQGTKLEIKR SEQ ID NO:9												
	SEQ ID NO:8												

Clon 10 : Musmus IGKV12-44*01 F
Plantilla humana: V Kappa I

Figura 6B (Cont.) Alineamiento primario de segmentos V_H

Kabat	1	5	10	15	20	25	HCDR1	36	40
MC10	EVQLQ	SGPELVKPGASVKMSCKAS	[	GYTFTSCVNN	]	WVKQKPGQG			
HuC10	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCCKAS	[	GYTFTSCVNN	]	WVRQAPGQG				
			FR1			SEQ ID NO:3		FR2	
Kabat	45				HCDR2	66	70	75	80 82A B C
MC10	LEWIG	[	YINPYNDGTYKNEKTKG	]	KATLTSDKSSSTAYMELSSLTS				
HuC10	LEWMG	[	YINPYNDGTYKNEKTKG	]	RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRS				
						SEQ ID NO:4		FR3	
Kabat	85	90	93	94		HCDR3	105	110	
MC10	EDSAVYYCAR	[	EGFYCYGNFDN	]	WGQGTTLTVSS				SEQ ID NO:1
HuC10	DDTAVYYCAR	[	EGFYCYGNFDN	]	WGQGTTLTVSS				SEQ ID NO:11
						SEQ ID NO:5			

Clon 10 : Musmus IGHV1-14*01 F

Plantilla humana (Base de datos): IGHV1-18*01 F/IGHJ4*03

Figura 7A

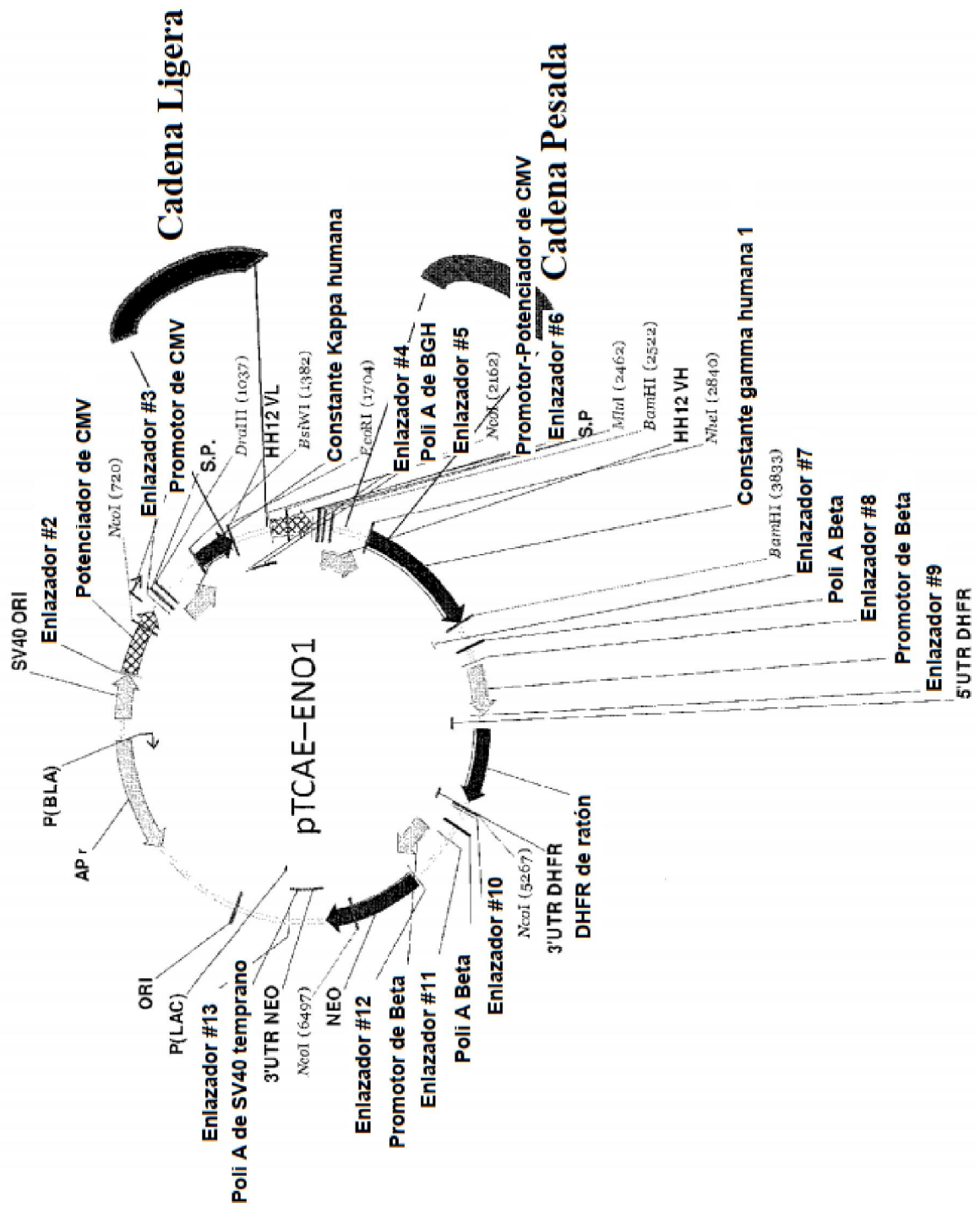


Figura 7B (Cont.)

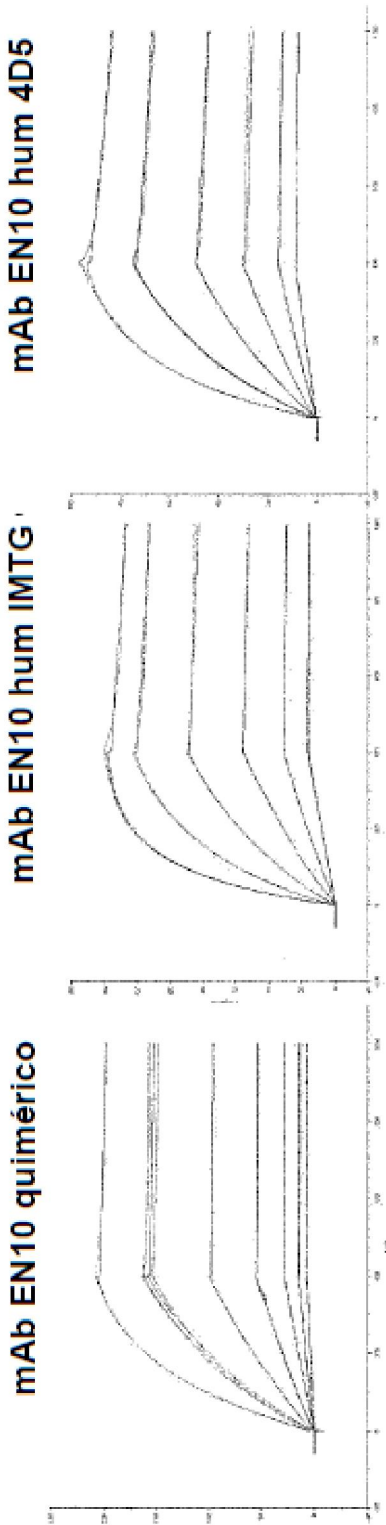


Tabla II: Las cinéticas de unión de anticuerpos EN10 por SPR.

Nombre del Anticuerpo	ENO1					Nivel de Captura
	Ka	Kd	KD	Rmax(RU)	Chi²(RU²)	
mAb EN10	3,577E+5	8,271E-5	2,313E-10	176,8	0,668	325
mAb EN10 humo	5,311E+5	1,162E-4	2,188E-10	140,0	0,656	290
mAb EN10 humo 4D5 quimérico	3,575E+5	8,250E-5	2,308E-10	123,1	1,10	380
mAb EN10 humo 4D5 quimérico	3,511E+5	1,755E-4	4,997E-10	100,3	0,361	355

Figura 8A

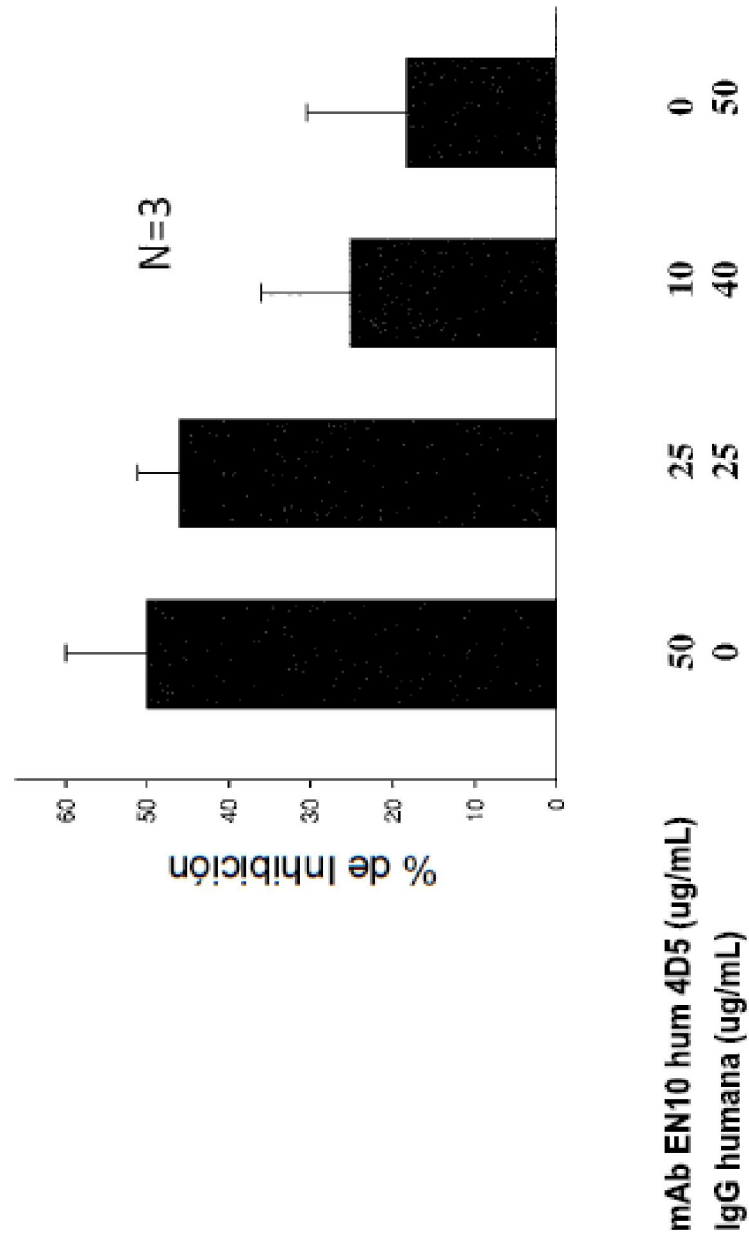


Figura 8B

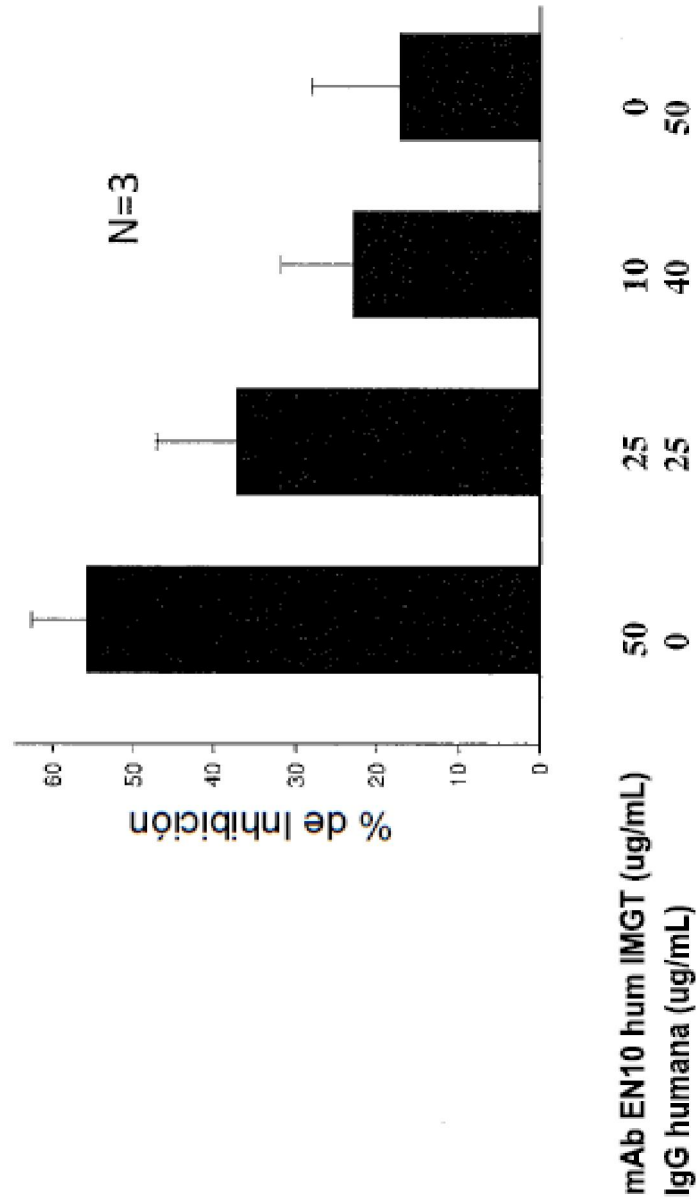


Figura 9A

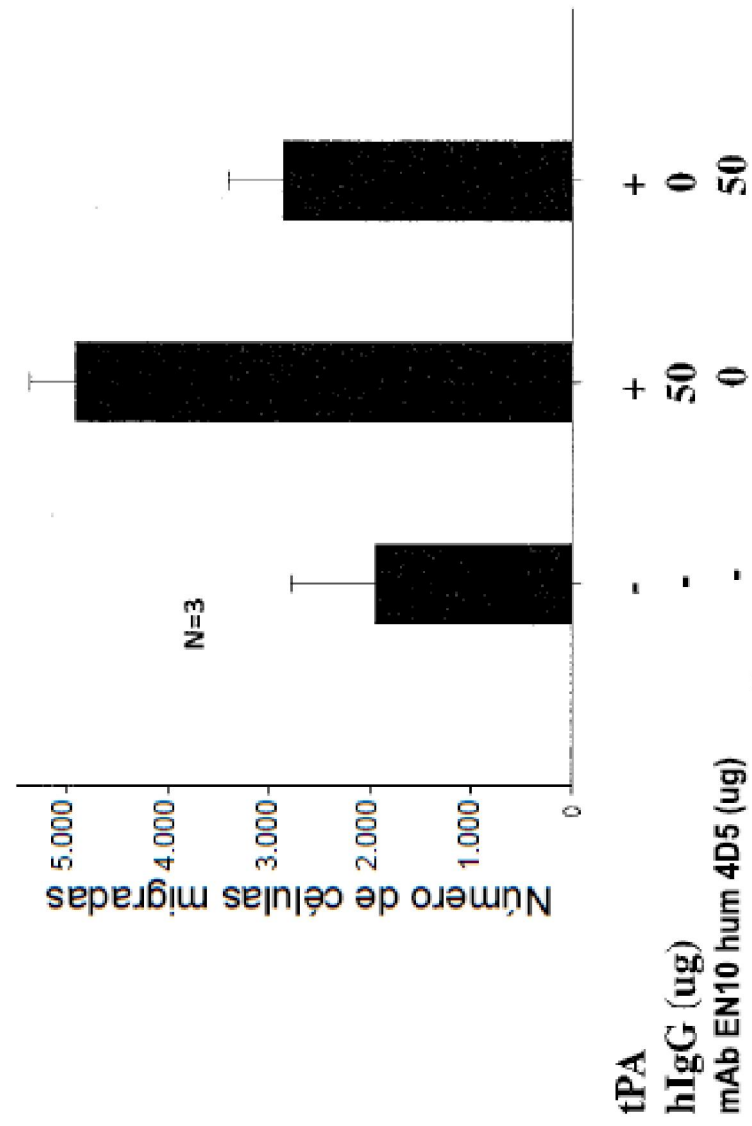


Figura 9B

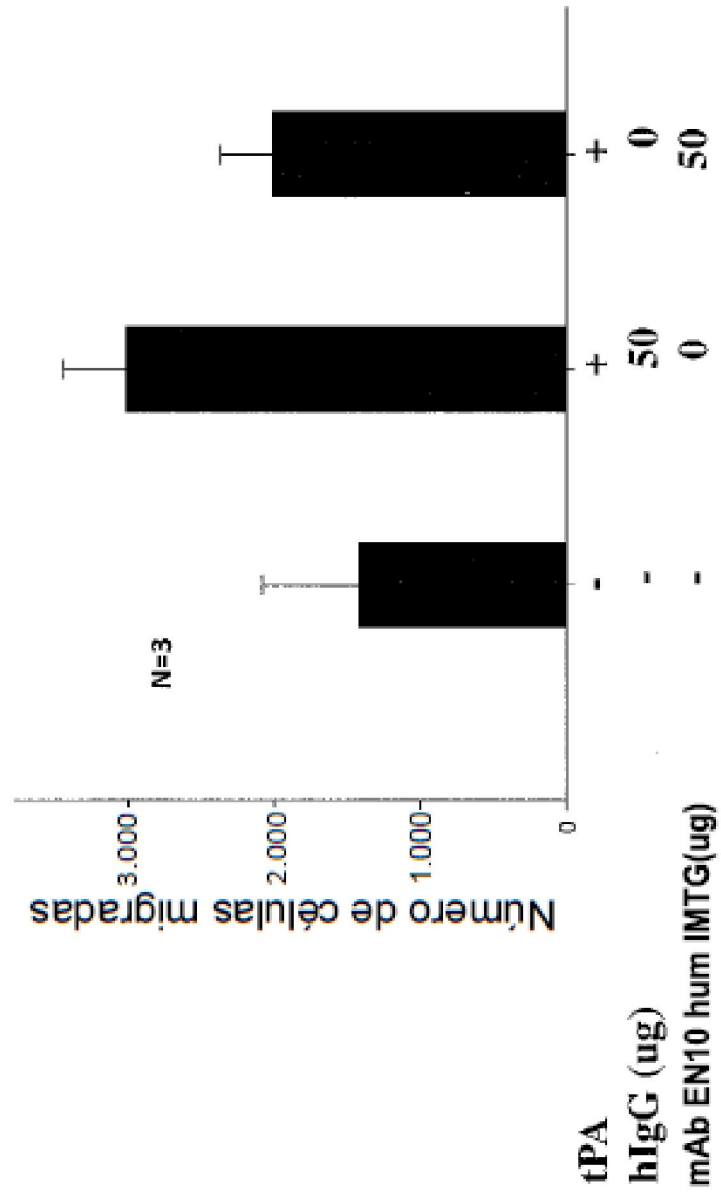


Figura 10A

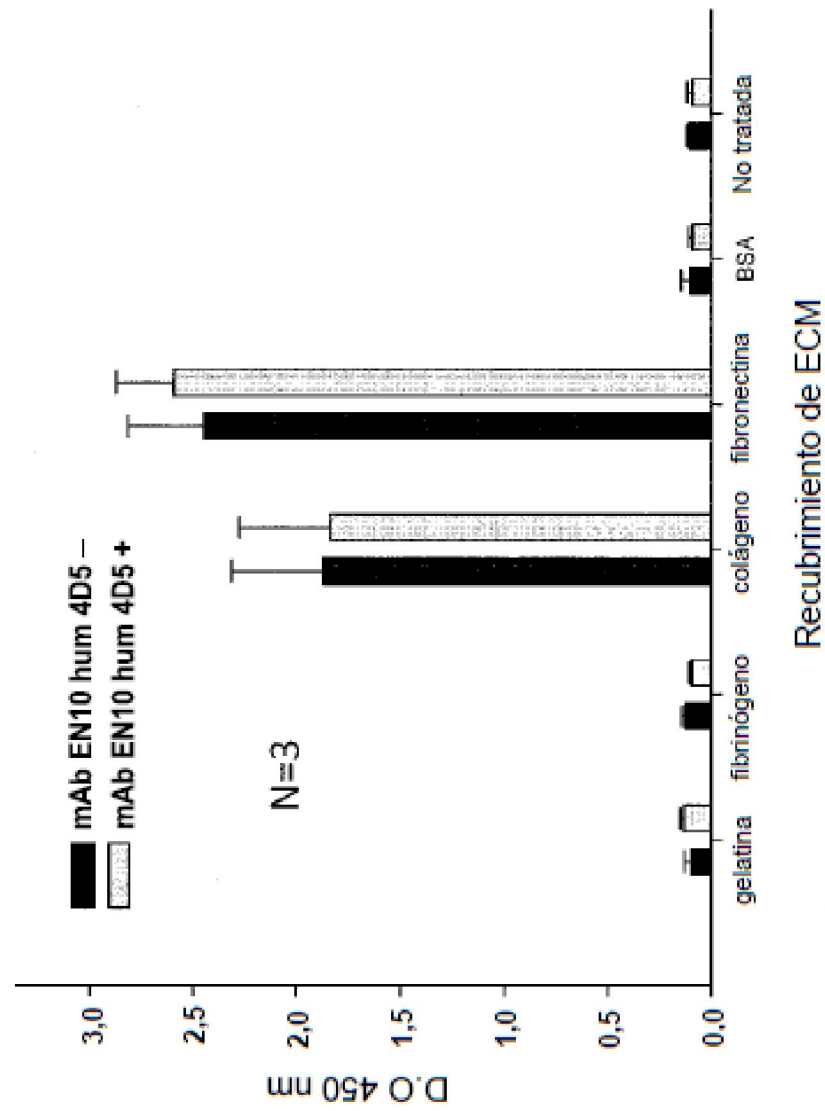


Figura 10B

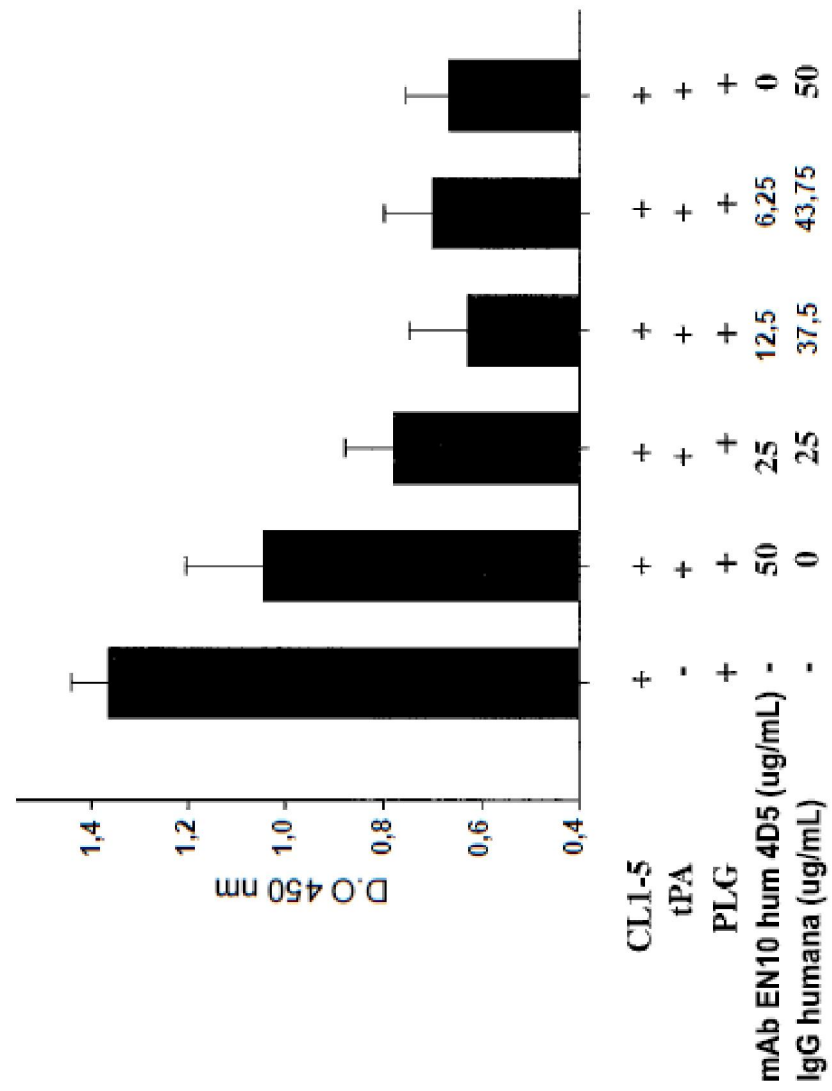


Figura 10C

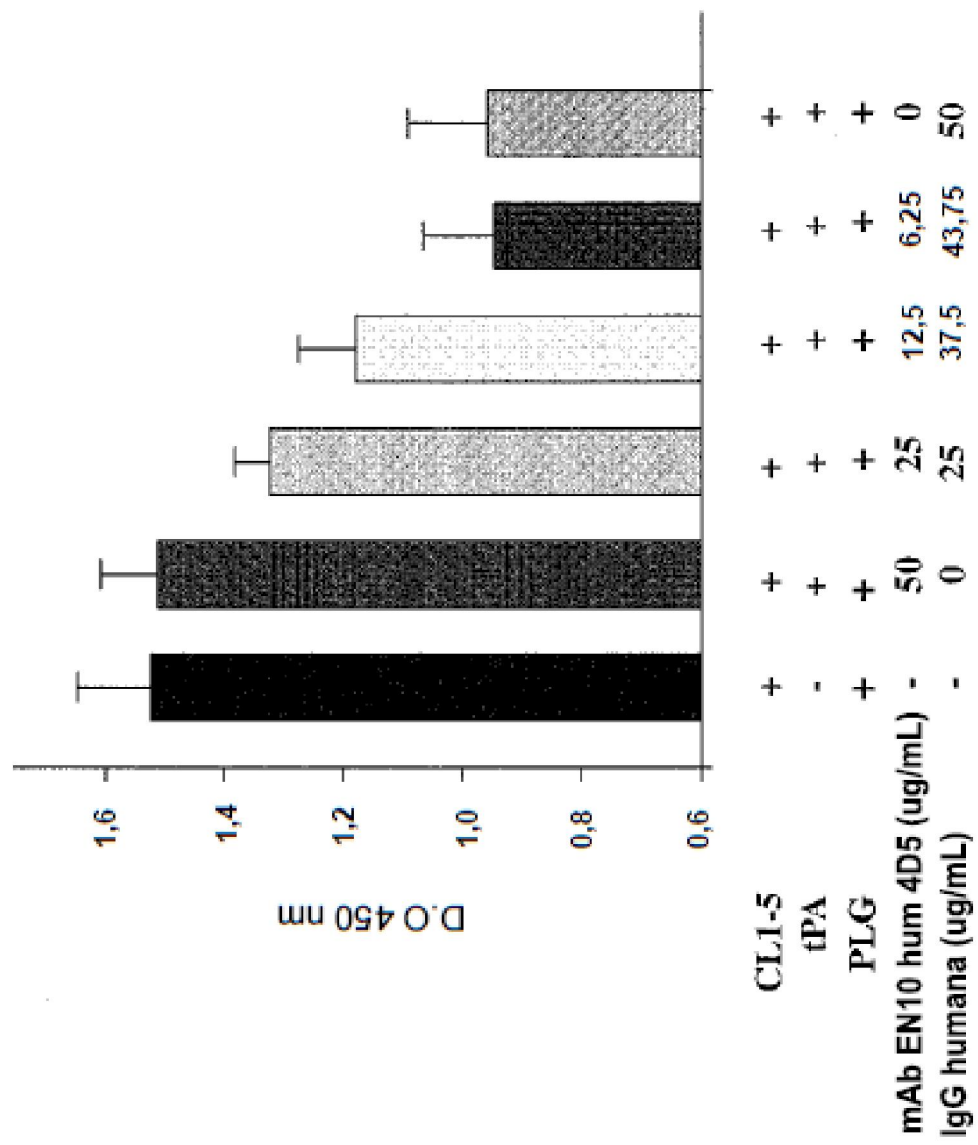


Figura 11A

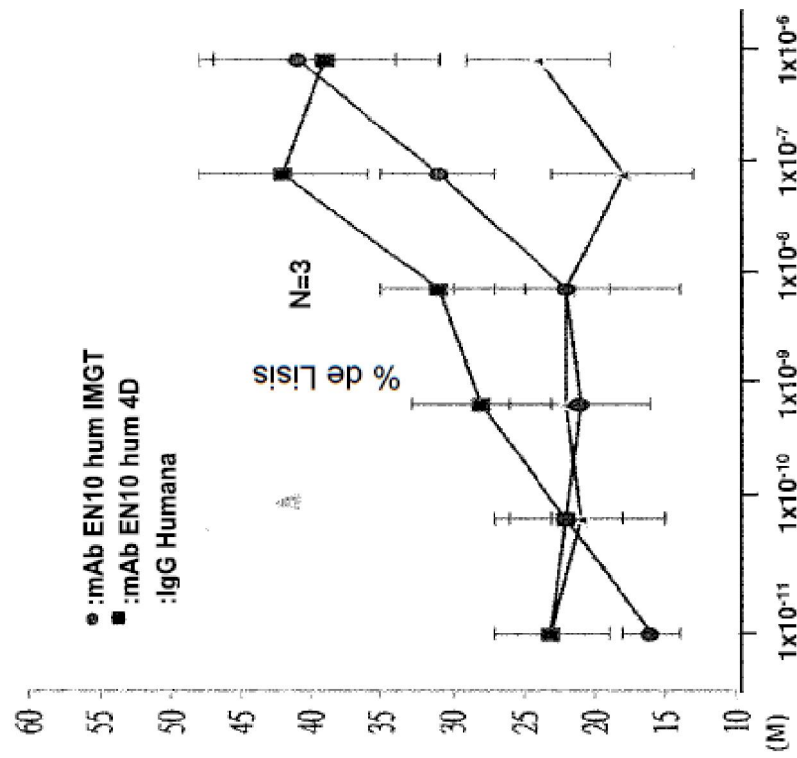


Figura 11B

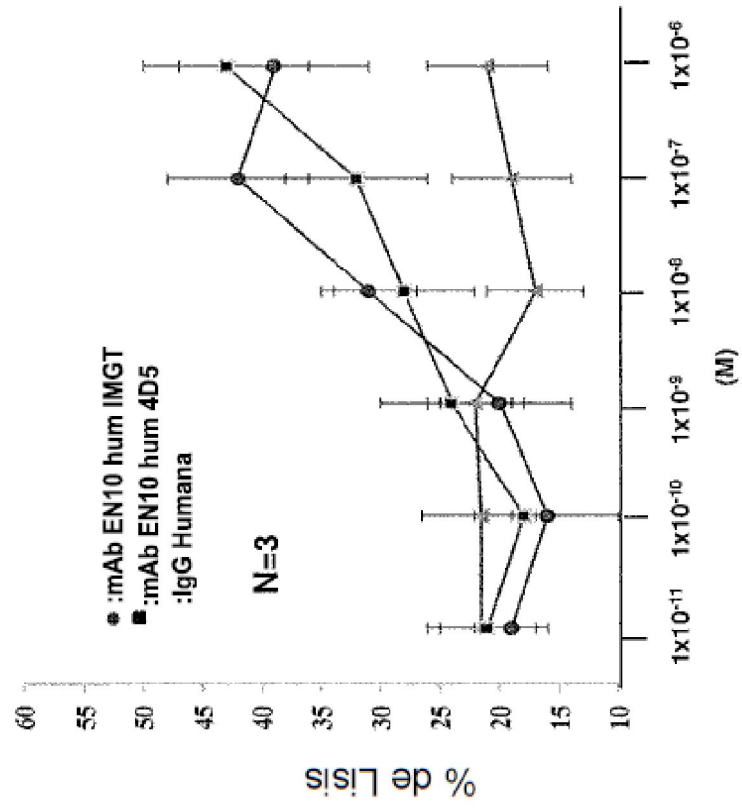
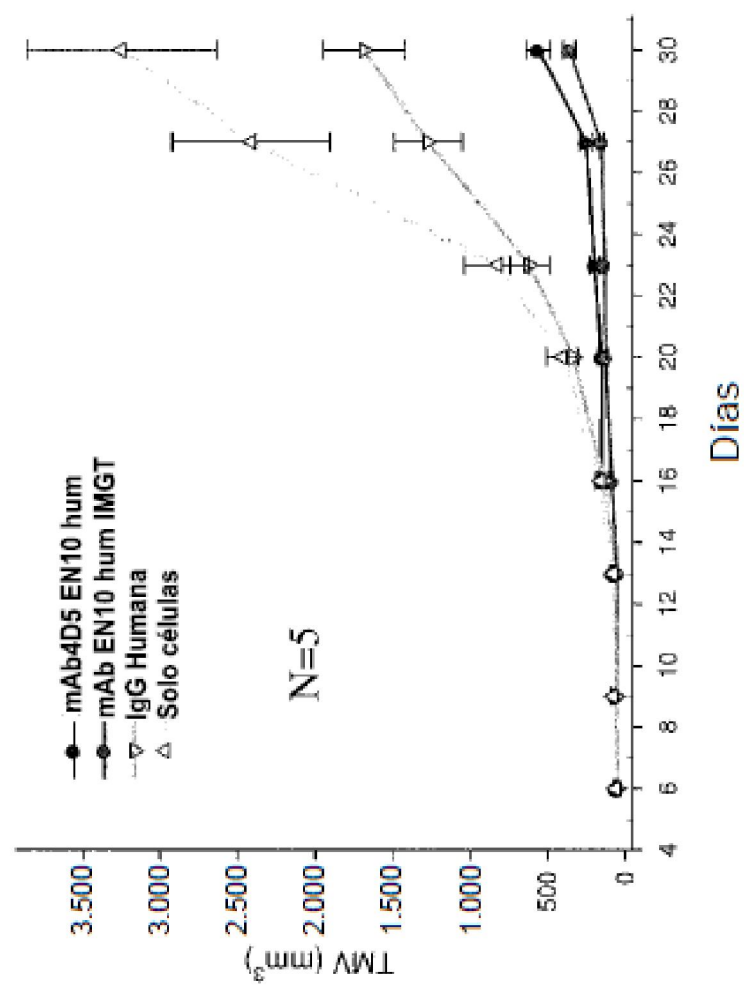


Figura 12



310 320
GGCACCAAGGTGGAAATCAAGCG
:: :: :: :: :: :: :: ::
GGTACCAAGGTGGAGATCAAAAGCG

[illegible]

Figura 13C

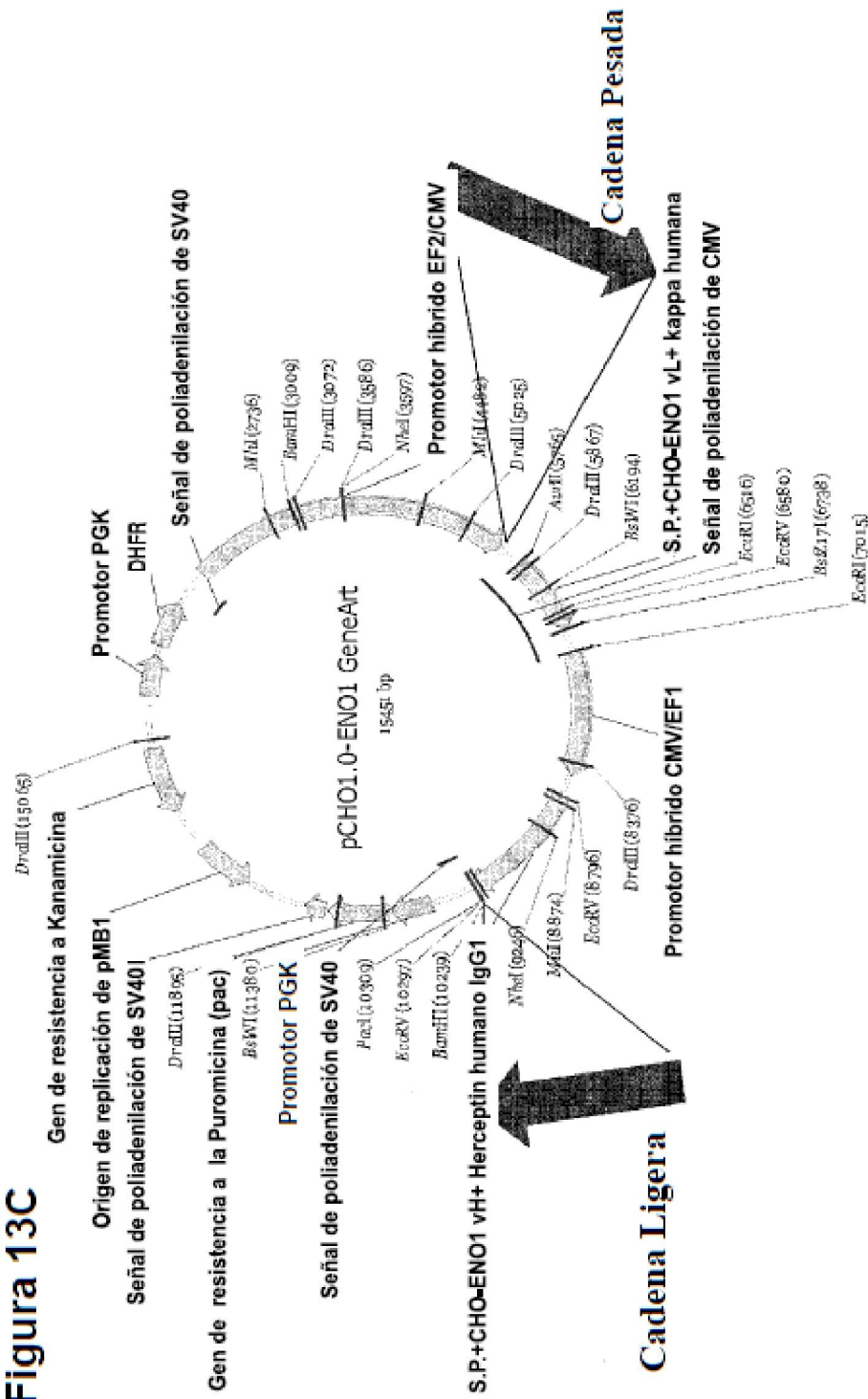
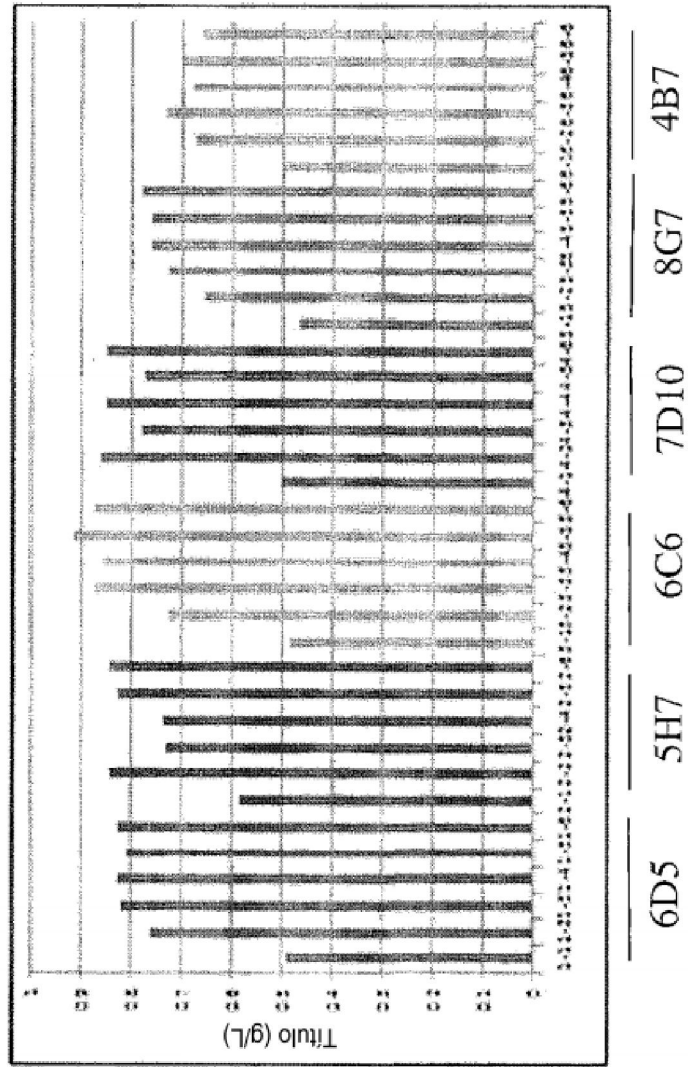


Figura 13D

EN10.3			
14D Mejores clones	ID de Clon	Título Día 14 (mg/ml)	Título Día 5 (mg/ml)
1	FF6D5	358,7	155
2	FF5H7	349,4	147
3	FF6C6	331,1	125,2
4	FF7D10	319,8	118,9
5	FF8G7	318,8	131,9
6	FF4B7	302,4	153,6
7	FF5F12	302	135
8	FF3D2	284,4	119,2
9	FF5F11	282,8	154,8
10	FF6F5	277,6	154
11	FF4C7	267,1	94,2
12	FF1D9	259,8	90,4
13	FF6F9	255,7	125,3
14	FF2D5	255,3	124,6
15	FF5F10	247,5	91,3

Título

Figura 13E



6 mejores Clones

- ① 6D5
- ② 5H7
- ③ 6C6
- ④ 7D10
- ⑤ 8G7
- ⑥ 4B7

Figura 13F

