

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
6 de Diciembre de 2007 (06.12.2007)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2007/138143 A2

(51) Clasificación Internacional de Patentes: Sin clasificar

(74) Mandatario: ILLESCAS TABOADA, Manuel;
González-Bueno & Illescas, Alfonso XI, 7 - 2º Izda.,
E-28014 Madrid (ES).

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2007/000364

(22) Fecha de presentación internacional:
28 de Mayo de 2007 (28.05.2007)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
200601407 29 de Mayo de 2006 (29.05.2006) ES

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección nacional admisible): AE,
AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW,
BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):
**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CI-
ENTIFICAS** [ES/ES]; Serrano 117, E-28006 Madrid (ES).

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección regional admisible): ARIPO
(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD,
RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente):
RAMIREZ DE MOLINA, Ana [ES/ES]; Instituto De
Investigaciones Biomédicas, Arturo Duperier 4, E-28029
Madrid (ES). **GALLEGO ORTEGA, David** [ES/ES];
Instituto De Investigaciones Biomédicas, Arturo Duperier
4, E-28029 Madrid (ES). **LACAL SANJUAN, Juan
Carlos** [ES/ES]; Instituto De Investigaciones Biomédicas,
Arturo Duperier 4, E-28029 Madrid (ES).

Publicada:

— sin informe de búsqueda internacional, será publicada nue-
vamente cuando se reciba dicho informe

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: ALPHA ANTICHOLINE KINASE MONOCLONAL ANTIBODIES AND THEIR USE IN ANALYTICAL TECH-
NIQUES FOR THE DIAGNOSIS OF CANCER AND THE PREPARATION OF MEDICINAL PRODUCTS

(54) Título: ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-COLINA QUINASA ALFA Y SU USO EN TÉCNICAS ANALÍTICAS,
DE DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER Y EN LA PREPARACIÓN DE MEDICAMENTOS

(57) Abstract: Alpha anticholine kinase monoclonal antibodies and their use in analytical techniques for the diagnosis of cancer and the preparation of medicinal products. The monoclonal antibodies AD1, AD2, AD3, AD4, AD5, AD6, AD7, AD8, AD9, AD10, AD11, AD12, AD13 and AD14 are highly specific and recognize human alpha choline kinase protein (ChoK α) with high sensitivity. This means that they can be used for the detection and/or quantification of this protein in any type of sample, including biological samples. In particular they allow the development of in vitro methods for cancer diagnosis, prognosis and/or monitoring of cancer progress or evaluating anti-cancer treatments in which the level of ChoK α expression is determined through one or more of the monoclonal antibodies of the invention or kits comprising them. In addition to this, AD3, AD8 and AD13, which interfere with the choline kinase activity of ChoK α , can be used for the preparation of medicinal products against cancer.

(57) Resumen: Anticuerpos monoclonales anti-colina quinasa alfa y su uso en técnicas analíticas, de diagnóstico del cáncer y en la preparación de medicamentos. Los anticuerpos monoclonales AD1, AD2, AD3, AD4, AD5, AD6, AD7, AD8, AD9, AD10, AD11, AD12, AD13 y AD14 son altamente específicos y reconocen con elevada sensibilidad la proteína colina quinasa alfa humana (ChoK α). Ello permite su uso para la detección y/o cuantificación de esta proteína en cualquier tipo de muestra, incluidas muestras biológicas. En particular, permiten el desarrollo de métodos in vitro de diagnóstico de cáncer, pronóstico y/o seguimiento de su evolución o evaluación de terapias anticancerígenas en los que se determine el nivel de expresión de ChoK α mediante uno o más de los anticuerpos monoclonales de la invención o de kits que los comprendan. Además, AD3, AD8 y AD13, que interfieren con la actividad colina quinasa de ChoK α , pueden utilizarse para la preparación de medicamentos contra el cáncer.

WO 2007/138143 A2



*Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección
"Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.*

**ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-COLINA QUINASA ALFA Y
SU USO EN TÉCNICAS ANALÍTICAS, DE DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER Y
EN LA PREPARACIÓN DE MEDICAMENTOS**

5 CAMPO DE LA INVENCIÓN

La invención se refiere a anticuerpos monoclonales capaces de unirse a la colina quinasa alfa humana. Concretamente, la invención se refiere a los anticuerpos monoclonales AD1, AD2, AD3, AD4, AD5, AD6, AD7, AD8, AD9, AD10, AD11, AD12, AD13 y AD14, a los hibridomas que los producen, las composiciones que los contienen, el uso de los mismos para detectar y/o cuantificar la presencia de la proteína colina quinasa alfa humana y los métodos para realizar diagnósticos *in vitro* de la presencia de tumores en un individuo o pronosticar su posible evolución que hagan uso de dichos anticuerpos.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La colina quinasa α (ChoK α) es la primera enzima de la ruta de Kennedy para la biosíntesis de fosfatidilcolina (PC), el principal fosfolípido de las membranas biológicas. Hay evidencias consistentes que demuestran la implicación de la colina quinasa y de su producto, la fosforilcolina (PCho), en el proceso de carcinogénesis (1-4).

20

ChoK está sobreexpresada en un elevado porcentaje de líneas celulares derivadas de tumores humanos, así como en diferentes tejidos tumorales humanos tales como mama, pulmón, colon y próstata (5,6). Tomados en conjunto, estos tumores representan más del 70% del número total de casos de cáncer en los países desarrollados. La incidencia de la sobreexpresión o incremento de la actividad de ChoK en estos cuatro tipos de cáncer oscila entre el 40% y el 60% (5-7). Recientemente, los autores de la presente invención demostraron no sólo que la proteína colina quinasa alfa está incrementada en los tejidos tumorales humanos mencionados (mama, pulmón, colon y próstata), sino que también está aumentada en otros tipos de tumores como vejiga y tumores hematológicos. Además, la sobreexpresión de dicha enzima induce

25

30

tumores *in vivo* y parece estar relacionada con la severidad del cáncer, el estadio de evolución del mismo y la disminución del tiempo de supervivencia de los pacientes que presentan tumores en los que se detecta dicha sobreexpresión. Es más, se ha demostrado que la inhibición de la ChoK α en particular, tanto mediante inhibidores químicos como mediante ARN de interferencia, representa una estrategia antitumoral efectiva. Todo ello indica que ChoK α representa un nuevo e importante marcador de tumores, útil para el diagnóstico, el pronóstico o la respuesta al tratamiento. Por ello, en la solicitud de patente internacional PCT/ES2006/070047 se proporciona un método para detectar la presencia de cáncer en un individuo, para determinar el estadio o la severidad de dicho cáncer, o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un individuo que presente cáncer, mediante la detección y cuantificación de la proteína colina quinasa alfa, así como mediante la detección y cuantificación del RNA mensajero de dicha enzima o del correspondiente cDNA.

Los procedimientos diseñados para el diagnóstico temprano y fiable del cáncer proporcionan información valiosa que puede mejorar el tratamiento de esta enfermedad, ayudando a lograr un incremento en la esperanza de vida. Los métodos que comprendan la determinación de la sobreexpresión de ChoK α en tumores humanos podrían representar un avance significativo tanto en el diagnóstico del cáncer como en la identificación de candidatos potenciales para terapia utilizando inhibidores de ChoK. El desarrollo de estos métodos lleva implícito el desarrollo de reactivos y metodologías apropiadas que permitan la determinación de la sobreexpresión de ChoK α . Una herramienta adecuada para determinar con precisión un incremento de los niveles de ChoK α en muestras de tejidos podrían ser los anticuerpos monoclonales, que son poblaciones de moléculas de anticuerpo, todas ellas idénticas, producidas por un único clon de células, que poseen la misma especificidad, en contraposición a los anticuerpos policlonales o polisueros, que son poblaciones complejas de anticuerpos, formadas por distintas clases de moléculas de inmunoglobulinas en las que está presente una variedad de especificidades. Se trata de moléculas que han tenido gran éxito como

reactivos analíticos, debido a que son sustancias químicamente bien definidas, cuya naturaleza y estructura se conoce con detalle y ello permite la formulación de preparaciones estables y facilita los procedimientos para su conjugación a través de trazadores tales como sustancias fluorescentes, enzimas, radioisótopos, oro coloidal, moléculas electrón-densas (ferritina), etc; además, son reactivos que pueden ser preparados de forma pura, en condiciones muy controladas y en grandes cantidades. En particular, los anticuerpos monoclonales son ampliamente utilizados en la investigación biomédica y el diagnóstico de muchas enfermedades, incluido el cáncer, y proporcionan alta sensibilidad y especificidad, necesarias ambas para dichos estudios. Sin embargo, no existen referencias publicadas en el Estado de la Técnica de anticuerpos monoclonales dirigidos contra ChoK α . Existen anticuerpos comerciales disponibles frente a esta proteína, todos ellos policlonales, cuya especificidad es reducida y, cuando se utilizan en inmunoensayos sobre transferencias Western, dan lugar a muchas bandas inespecíficas. Esta baja especificidad es particularmente problemática cuando se desean realizar ensayos inmunohistoquímicos, en los que es importante que no se produzcan tinciones inespecíficas, por lo que tampoco existen referencias publicadas en el Estado de la Técnica en las que se describan ensayos inmunohistoquímicos en los que se detecte la proteína ChoK α . Por todo ello, dada la demostrada implicación de ChoK α en carcinogénesis humana, existía la necesidad de desarrollar anticuerpos monoclonales dirigidos contra la colina quinasa alfa, preferentemente de alta especificidad y sensibilidad, con buena capacidad para precipitar la proteína colina quinasa alfa de soluciones en las que se encuentre o de interaccionar con dicha proteína en muestras de tejido o soluciones en las que esté presente, (lo que permite la aplicación de métodos inmunoquímicos en general y, en particular, de métodos inmunohistoquímicos, para los que hasta ahora no se disponía de herramientas adecuadas y que ayudarían, por ejemplo, al análisis de tumores extirpados. Con ello se facilitaría la evaluación de los niveles de ChoK α y el establecimiento de relaciones entre los resultados obtenidos y la posible existencia de cáncer en los individuos origen de las muestras analizadas, la determinación de su estadio o severidad, el pronóstico

de su posible evolución, el seguimiento de dicha evolución o la monitorización del efecto de la terapia administrada a un individuo que presente cáncer. Dichos anticuerpos serían de utilidad, además, en cualquier procedimiento en el que se desee detectar y/o cuantificar la proteína colina quinasa alfa presente en una muestra cualquiera.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un juego de anticuerpos monoclonales dirigidos contra ChoK α , útiles como herramientas en varias técnicas de biología molecular, incluido el análisis de muestras biológicas, así como en estudios inmunohistoquímicos, especialmente en los que se lleven a cabo sobre muestras de tejido humano como parte de métodos de diagnóstico o pronóstico de la existencia de cáncer en dicho tejido, posible uso del que se proporcionan evidencias. Estos anticuerpos constituyen una herramienta específica que permite la detección de ChoK α sin interaccionar, por ejemplo, con otra isoenzima con la que guarda un 70% de homología, la colina quinasa beta. La disponibilidad de un reactivo específico que diferencia entre una y otra isoenzima permitió la realización de los ensayos descritos en la solicitud de patente internacional PCT/ES2006/070047, pendiente de publicar, en los que se demuestra que la sobreexpresión de ChoK α , y no la de ChoK β , es capaz de inducir carcinogénesis en seres humanos, estando además los niveles de ChoK α relacionados con la severidad del cáncer y con una disminución del tiempo de supervivencia de los individuos que presentan tumores con niveles elevados de ChoK α . Por todo ello, en dicha patente internacional se proporcionan tanto métodos para diagnosticar el tiempo de supervivencia de un paciente aquejado de cáncer como métodos de monitorización del efecto de terapias contra el cáncer, basados ambos en la evaluación del nivel de expresión de la proteína colina quinasa alfa mediante, por ejemplo, la determinación de la concentración de dicha proteína en muestras de tejido extraídas del paciente. La realización de dichos métodos no sería posible con los anticuerpos conocidos en el estado de la técnica, policlonales e

inespecíficos, y requiere de la especificidad de los anticuerpos monoclonales cuya obtención y características se describen en la presente invención, cuya existencia, al igual que sus propiedades, no han sido hechas accesibles de modo alguno para el público en general en el momento de presentación de la presente memoria.

Por tanto, un aspecto de la invención lo constituyen los anticuerpos monoclonales AD1, AD2, AD3, AD4, AD5, AD6, AD7, AD8, AD9, AD10, AD11, AD12, AD13 y AD14, que se unen específicamente a la proteína colina quinasa alfa humana.

Un segundo aspecto de la invención lo constituyen las líneas celulares de hibridoma capaces de producir los anticuerpos monoclonales AD1, AD2, AD3, AD4, AD5, AD6, AD7, AD8, AD9, AD10, AD11, AD12, AD13 y AD14.

Un aspecto más de la invención son las composiciones que comprenden uno o más de los anticuerpos monoclonales AD1, AD2, AD3, AD4, AD5, AD6, AD7, AD8, AD9, AD10, AD11, AD12, AD13 y AD14.

Un aspecto adicional de la invención es el uso de los anticuerpos monoclonales AD1, AD2, AD3, AD4, AD5, AD6, AD7, AD8, AD9, AD10, AD11, AD12, AD13 y AD14 para detectar y/o cuantificar la presencia de colina quinasa alfa humana en una muestra cualquiera.

Otro aspecto más de la invención son los métodos de diagnóstico *in vitro* de cáncer, particularmente cáncer de mama, pulmón, colon, próstata, vejiga o tumores hematológicos, que comprendan la detección de proteína colina quinasa alfa humana presente en una muestra biológica tomada de un ser humano y/o la cuantificación de la proteína colina quinasa alfa humana mediante el uso de uno o más de los anticuerpos monoclonales AD1, AD2, AD3, AD4, AD5, AD6, AD7, AD8, AD9, AD10, AD11, AD12, AD13 y AD14.

Otro aspecto adicional de la invención son los *kits* de ensayo para el diagnóstico del cáncer, el pronóstico de su evolución, el seguimiento de dicha evolución o la evaluación de una terapia contra el cáncer que comprendan al menos uno de los anticuerpos monoclonales de la invención: AD1, AD2, AD3, AD4, AD5, AD6, AD7, AD8, AD9, AD10, AD11, AD12, AD13 y AD14.

Por último, es también un aspecto de la invención el uso de al menos un anticuerpo monoclonal seleccionado de entre AD3, AD8 y AD11 para la fabricación de un medicamento destinado a la terapia contra el cáncer.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra las pruebas realizadas durante la generación y selección de los anticuerpos monoclonales e hibridomas de la invención. La parte A muestra el análisis por transferencia Western de los sueros de los ratones inmunizados (R1, R2, R3, R4, R5 y R6), comparados con los resultados obtenidos con un suero preimmune (Preinm.) y un suero policlonal (Polic.); en todos los casos, la calle 1 corresponde a extractos de células humanas HEK293T transfectadas con un vector vacío, que no expresa ChoK α , como control y la calle 2 a células HEK293T que sobreexpresan ChoK α por haber sido transfectadas con un vector de expresión de dicha proteína. La parte B muestra un ejemplo de los ensayos de ELISA realizados durante la selección de hibridomas, el correspondiente al hibridoma del anticuerpo AD1: los pocillos de la columna de la izquierda se recubrieron con ChoK α recombinante y los de la derecha con GST y fueron incubados con: (Ctrl.-): anticuerpo monoclonal anti-GST; AD1: sobrenadante del medio de cultivo del hibridoma correspondiente al anticuerpo AD1; ChoK PoAC (Ctrl.+): anticuerpo policlonal anti-ChoK α . La parte C muestra un ejemplo de la confirmación de la selección de hibridomas por inmunocitoquímica (cytospin) de células HEK293 transfectadas con un vector que no expresa ChoK α (foto marcada como HEK-Ctrl) o con un vector de expresión de ChoK α (foto marcada como HEK+ChoK α) que se sometieron a un proceso de inmunotinción con el sobrenadante de cultivo de un mismo hibridoma.

La Figura 2 muestra un ejemplo de inmunoensayos sobre transferencias Western realizados con anticuerpos de la invención. La parte A muestra los resultados obtenidos al incubar lisados de células HEK293 transfectadas con un vector vacío (calle marcada como "Vector") o de células HEK293 transfectadas con un vector de expresión de ChoK α (calles marcadas como

“ChoK α) bien con un anticuerpo policlonal anti-ChoK α (fotografía marcada como “ChoK PoAb”) o bien con el anticuerpo monoclonal de la invención (fotografía marcada como “ChoK MoAb”) que se indica sobre cada calle. La parte B muestra los resultados obtenidos al incubar lisados de células que expresan la colina quinasa α de ratón, NIH3T3-Tmar-9 (calles marcadas con el número 9) o NIH3T-Tmar-11 (calles marcadas con el número 11) con los anticuerpos AD6 y AD9.

La Figura 3 muestra ejemplos de tinción negativa (fotografía superior izquierda), débil (fotografía superior derecha) y fuerte (fotografías inferiores) de muestras tomadas de tumores colorrectales sobre las cuales se había realizado un análisis inmunohistoquímico (IHQ) con los anticuerpo AD9, AD6, AD1 y AD2 tal como se indica bajo cada fotografía.

La Figura 4 muestra el análisis inmunohistoquímico de tumores de pulmón (1) y mama (2) con anticuerpos monoclonales anti-ChoK α representativos. En cada uno de los casos, las fotografías marcadas con la letras A (1A y 2A) y B (1B y 2B), corresponden a tejidos tumorales fuertemente teñidos, con una leve tinción basal de los tejidos normales adyacentes. Las fotografías marcadas con la letra C (1C y 2C) corresponden a muestras de ambos tipos de tumores en las que la tinción con estos anticuerpos útiles en inmunohistoquímica resultó negativa. La tinción de contraste se realizó con hematoxilina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La invención se refiere a los anticuerpos monoclonales AD1, AD2, AD3, AD4, AD5, AD6, AD7, AD8, AD9, AD10, AD11, AD12, AD13 y AD14, que son capaces de unirse de forma específica a la proteína colina quinasa alfa (ChoK α), enzima implicada en la síntesis de fosfolípidos que ha sido implicada en la proliferación celular, la transformación y la progresión de tumores. En particular, su sobreexpresión parece estar implicada en la carcinogénesis de tumores de mama, pulmón, colon y próstata en seres humanos, lo que apunta hacia ella como un marcador potencial de tumores (5,6). La detección y

cuantificación de sus niveles, sin embargo, requiere el desarrollo de herramientas adecuadas para ello, como pueden ser los anticuerpos monoclonales, en especial aquellos que presenten alta especificidad y sensibilidad frente a este antígeno, ChoK α .

5 Por ello, la invención proporciona los anticuerpos monoclonales AD1, AD2, AD3, AD4, AD5, AD6, AD7, AD8, AD9, AD10, AD11, AD12, AD13 y AD14, cuya especificidad y sensibilidad se demuestra en los Ejemplos que se describen posteriormente. Así, por ejemplo, se observa que, aunque hay un 77% de similitud estructural entre las colina quinasa humana y de ratón (19),
10 sólo los anticuerpos monoclonales AD4 y AD10 se unen de forma eficaz a la colina quinasa de ratón (mChoK) en un inmunoensayo realizado sobre proteínas transferidas a membranas de nitrocelulosa, lo que demuestra la alta especificidad de los anticuerpos monoclonales de la invención, en especial de AD1, AD2, AD3, AD5, AD6, AD7, AD8, AD9, AD10, AD11, AD12, AD13 y
15 AD14. También se proporcionan los correspondientes hibridomas capaces de producir cada uno de dichos anticuerpos, lo que permite obtenerlos en grandes cantidades y facilita su purificación.

Los anticuerpos monoclonales de la invención constituyen una herramienta útil y fiable para ser utilizados en técnicas básicas de ensayo tales
20 como el inmunoensayo realizado sobre proteínas transferidas a membranas (técnica conocida como transferencia Western y abreviada WB, de su denominación en inglés *Western blot*) y la inmunoprecipitación (IP), por lo que podrían ser excelentes herramientas para incrementar el conocimiento que se tiene de la biología de la ChoK α o para cualquier tipo de ensayo en el que se
25 desee comprobar la presencia de dicha proteína y/o realizar una cuantificación de la misma. Por ello, está comprendido dentro del alcance de la invención el uso de uno o más anticuerpos monoclonales seleccionados del grupo de AD1, AD2, AD3, AD4, AD5, AD6, AD7, AD8, AD9, AD10, AD11, AD12, AD13 y AD14 para la detección y/o cuantificación de la proteína quinasa alfa en una muestra
30 cualquiera. Se tiene especial preferencia por las muestras que sean muestras biológicas, entendiendo como tal cualquier muestra tomada de un ser humano, bien de un tejido suyo o de alguno de los llamados fluidos biológicos, de los

que los más típicos son la orina, la sangre y el plasma obtenido de la misma, aunque también están comprendidas dentro de esta denominación cualquier otro fluido corporal, como puede ser como el líquido cefalorraquídeo o el líquido sinovial. La técnica utilizada para la detección y/o cuantificación de la proteína colina quinasa alfa humana mediante uno o más anticuerpos monoclonales de la invención puede ser cualquiera de las técnicas conocidas por los expertos en la técnica, entre las que se incluyen las que hacen uso de transferencias Western, inmunoprecipitación o, en el caso de tejidos, las técnicas inmunohistoquímicas, de las que también se dan describen ensayos concretos con los anticuerpos monoclonales de la invención en los Ejemplos que aparecen más adelante.

Los ensayos de inmunoprecipitación realizados para caracterizar los anticuerpos de la invención han revelado que los epítomos reconocidos por cada uno de estos anticuerpos no son los mismos, pues algunos de ellos parecen interferir con la actividad enzimática, no siendo posible detectar actividad enzimática colina quinasa a partir de proteínas colina quinasa alfa inmunoprecipitadas con algunos de los anticuerpos monoclonales de la invención, mientras que otros (AD1, AD2, AD4, AD5, AD7, AD13 y AD14) no impiden que las proteínas inmunoprecipitadas muestren esta actividad enzimática cuando se les proporciona el sustrato y las condiciones adecuadas. Por ello, estos últimos anticuerpos (AD1, AD2, AD4, AD5, AD7, AD13 y AD14) son los anticuerpos preferidos para ser utilizados en cualquier ensayo que implique la inmunoprecipitación de colina quinasa alfa de manera que dicha proteína conserve su actividad colina quinasa, especialmente AD1, AD4, AD5, AD7 y AD13, que dan lugar a una mayor grado de actividad enzimática en los inmunoprecipitados generados con ellos.

Otra técnica de importancia clínica en la que son útiles los anticuerpos monoclonales son los estudios inmunohistoquímicos, técnica que tiene por objeto la detección e identificación *in situ* de componentes biomoleculares que son parte integral de células y tejidos. Esta técnica puede ser de gran utilidad para el diagnóstico *in vitro* del cáncer en muestras de tejido tomadas de pacientes, mediante el ensayo de un marcador concreto, del que se conozca su

asociación con el cáncer. Como se ha mencionado, los estudios indican que ChoK α representa un nuevo e importante marcador de tumores, cuya expresión aparece incrementada en un porcentaje importante de tumores, concretamente en un 40-60% de los tumores de mama, colon, pulmón, próstata, vejiga o tumores hematológicos, habiéndose demostrado también tanto la capacidad de inducción de tumores *in vivo* de la sobreexpresión de esta enzima como la efectividad de su inhibición como estrategia antitumoral. Incluso, se ha observado una relación entre su nivel de expresión y la gravedad de los tumores. Por todo ello, están comprendidos dentro del alcance de la invención no sólo el uso de los anticuerpos monoclonales de la invención para la detección y/o cuantificación de la proteína ChoK α mediante técnicas inmunohistoquímicas, aplicadas preferentemente a muestras de tejidos tomadas de seres humanos, especialmente cuando se trate de muestras de tejido de mama, colon, pulmón o vejiga, sino que también está incluido, además, cualquier método para el diagnóstico de cáncer, el pronóstico de su evolución, el seguimiento de dicha evolución o la evaluación de la respuesta a un tratamiento en el que se detecte y/o cuantifique la proteína ChoK α , mediante los anticuerpos monoclonales de la invención. El potencial de estos métodos y la capacidad de los anticuerpos monoclonales de la invención para ser de utilidad en la realización de los mismos se demuestra en los ejemplos descritos más adelante, en los que se realizaron ensayos inmunohistoquímicos sobre muestras tomadas de biopsias de pacientes a los que previamente se les había diagnosticado cáncer de mama o pulmón. En la mayor parte de los casos, esta técnica permitió distinguir claramente entre el tejido tumoral en el que se sobreexpresa ChoK α (que aparecía fuertemente marcada) del tejido normal circundante, en el que la tinción con los anticuerpos anti-ChoK α era sólo tenue. Como se ha comentado, los datos bioquímicos previos de la sobreexpresión y el incremento de actividad de ChoK α en tumores humanos demostraron que hay un intervalo del 40% al 60% de incidencia de ChoK α en distintos tipos de cáncer humano (5-7). Por ello, es de esperar que aparezca una tinción basal en los tumores en los que los niveles de ChoK α son similares a los de las células normales circundantes. Por lo tanto, los datos obtenidos en

las pruebas inmunohistoquímicas realizadas con los anticuerpos monoclonales anti-ChoK α de la invención son consistentes con los datos bioquímicos previos disponibles y avalan la utilidad de dichos anticuerpos monoclonales para la identificación de células tumorales mediante métodos inmunohistoquímicos y, por ello, su utilidad como herramienta en métodos de diagnóstico de cáncer, pronóstico de su evolución o evaluación de la respuesta a un tratamiento. Es por ello que están comprendidos dentro del alcance de la invención los métodos *in vitro* para el diagnóstico de la existencia de cáncer en un paciente, el pronóstico de su evolución, el seguimiento de dicha evolución o para la evaluación de la respuesta a un tratamiento en los que se haga uso de al menos uno de los anticuerpos monoclonales de la invención para la detección y/o la cuantificación de la proteína colina quinasa alfa humana, pudiendo ser los estudios en los que se recurra a estos métodos tanto retrospectivos como prospectivos. Se prefiere el uso de los anticuerpos AD1, AD2, AD4, AD5, AD7, AD13 y AD14 y, dentro de estos, se prefieren especialmente los anticuerpos AD1, AD4, AD5, AD7 y AD13, por ser los que mayor sensibilidad mostraron en los ensayos realizados. Para la realización de estos métodos, se prefiere que las muestras a analizar sean muestras de tejido tomadas de un ser humano, en especial las extraídas de mama, colon, pulmón o vejiga.

Por otro lado, en el campo terapéutico, dada la utilidad de los inhibidores específicos de ChoK α en estrategias antitumorales, los anticuerpos monoclonales que interfieren con la actividad colina quinasa, podrían ser útiles como inhibidores específicos de dicha actividad y, en consecuencia, como compuestos activos antitumorales. En el Ejemplo 2 se demuestra la capacidad de los anticuerpos monoclonales de la invención AD3, AD8 y AD11 para inhibir la actividad enzimática de la colina quinasa alfa humana. Por ello, es otro aspecto de la invención el uso de al menos un anticuerpo monoclonal seleccionado de entre AD3, AD8 y AD11 para la fabricación de un medicamento destinado a la terapia contra el cáncer.

Como se ha comentado, son también objeto de la invención las composiciones que comprendan al menos uno de los anticuerpos AD1, AD2, AD3, AD4, AD5, AD6, AD7, AD8, AD9, AD10, AD11, AD12, AD13 y AD14 o

combinaciones de los mismos. Los anticuerpos presentes en estas composiciones pueden estar unidos a distintas sustancias o partículas, que pueden ser bien sustancias o partículas que faciliten su detección o bien sustancias o partículas que faciliten la extracción del anticuerpo del medio en el que se encuentre, generalmente con la finalidad de aislar los complejos formados tras su reacción con el anticuerpo. Son ejemplos de sustancias que facilitan la detección del anticuerpo una molécula radiactiva, un cromóforo, un fluoróforo, o una enzima que catalice alguna reacción que dé lugar a un producto de fácil detección (como puede ser una molécula radiactiva, un cromóforo o un fluoróforo) o que parta de un compuesto en el que la disminución de su concentración es también fácil de detectar (que puede ser igualmente una molécula radiactiva, un cromóforo o un fluoróforo). Los ejemplos típicos de las sustancias o partículas que facilitan la extracción del anticuerpo del medio en el que se encuentren son las partículas metálicas o las partículas magnéticas, que posibilitan el aislamiento de las moléculas acopladas a ellas mediante la utilización de campos magnéticos; también es un ejemplo de tales sustancias o partículas como cualquier molécula que posea una alta afinidad por otra y que posibilite que el anticuerpo se una a algún tipo de matriz o medio sólido al cual esté ligada la segunda molécula por la cual la molécula unida al anticuerpo presenta alta afinidad.

Son también realizaciones preferidas de las composiciones de la invención aquellas que comprendan adicionalmente un segundo anticuerpo capaz de unirse a al menos un anticuerpo de la invención presente en la composición de la invención. Se prefieren los segundos anticuerpos que interaccionen con el fragmento Fc de los anticuerpos de la invención, para que no interfieran con su unión al antígeno colina quinasa alfa humana. El segundo anticuerpo puede ser de cualquier origen, bien un anticuerpo anti-IgG de ratón generado en cabra tal como el utilizado en los ejemplos descritos posteriormente, o generado en cualquier otra especie. Preferiblemente, el segundo anticuerpo estará unido a otra sustancia o partícula, que pueden ser bien una sustancia que faciliten su detección o bien una sustancia o partícula que facilite la extracción del anticuerpo del medio en el que se encuentre,

generalmente con la finalidad de aislar los complejos formados tras su reacción con el anticuerpo. Los ejemplos de estas sustancias o partículas son los mismos que los mencionados en el caso de las posibles sustancias o partículas unidas a los anticuerpos de la invención.

5 Finalmente, es también un objeto de la invención un *kit* para el diagnóstico del cáncer, el pronóstico de su evolución, el seguimiento de dicha evolución o la evaluación de una terapia contra el cáncer que comprenda al menos uno de los anticuerpos monoclonales de la invención. Se prefieren aquellos *kits* que comprendan un segundo anticuerpo capaz de unirse a al
10 menos un anticuerpo de la invención presente en el *kit* de la invención. Como en el caso de las composiciones de la invención, se prefieren los segundos anticuerpos que interaccionen con el fragmento Fc de los anticuerpos de la invención. El segundo anticuerpo puede ser de cualquier origen, bien un anticuerpo anti-IgG de ratón generado en cabra tal como el utilizado en los
15 ejemplos descritos posteriormente, o generado en cualquier otra especie que no sea ratón. Preferiblemente, el segundo anticuerpo estará unido a otra sustancia o partícula, que pueden ser bien una sustancia que faciliten su detección o bien sustancia o partícula que faciliten la extracción del anticuerpo del medio en el que se encuentre.

20

La invención se explicará ahora con más detalle gracias a los Ejemplos y las Figuras que aparecen a continuación.

25 EJEMPLOS

Los ejemplos que se describen a continuación describen los procedimientos seguidos para la generación de los anticuerpos monoclonales, su caracterización y el ensayo de su capacidad para ser utilizados en pruebas inmunohistoquímicas. Los detalles de los mismos fueron los siguientes:

30

Ejemplo 1.- Generación de anticuerpos monoclonales

La generación de los anticuerpos monoclonales se llevó a cabo en las siguientes fases:

1.1.- Preparación del antígeno

5 La expresión y purificación del antígeno para el cual se desean generar los anticuerpos, la ChoK α humana, se llevó a cabo tal como se ha descrito previamente en forma de proteína de fusión GST-ChoK α (5,4,15). Brevemente, se subclonó el cDNA que codifica para la ChoK α humana en un vector de expresión procariota, pGEX-4T2, vector que posee la secuencia codificante de la glutathion-S-transferasa, de manera que la expresión de dicho vector da lugar a una proteína de fusión GST-ChoK α . La presencia de la proteína GST, que tiene capacidad de unirse a una fase semisólida de sefarosa que lleve unido glutathion, facilita la semipurificación de la proteína de fusión del resto de proteínas bacterias. Por ello, se siguió un procedimiento estándar para la purificación mediante el método de la glutathion-sefarosa siguiendo las instrucciones del fabricante (Amersham Biosciences Europe, Alemania). Una vez liberada la ChoK α de la GST mediante proteólisis con trombina, la ChoK α parcialmente purificada se resolvió mediante electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). Se extrajo del gel la zona que contenía la banda correspondiente a ChoK α y el fragmento de gel extraído se homogeneizó en PBS con el adyuvante de Freund, bien completo o bien incompleto (suministrado en ambos casos por Sigma-Aldrich, MO, EE.UU.) (1:1, volumen:volumen) según la fase de inmunización en la que se deseara utilizar la emulsión obtenida.

25

1.2.- Inmunización de los ratones

Se inmunizaron por vía intraperitoneal (i.p.) seis ratones de 8 semanas de edad, de la cepa Balb/c, siguiendo el siguiente calendario:

30 - Día 1: inyección i.p. de 0,5 ml de homogeneizado de antígeno, que contenía 100 μ g de ChoK α recombinante purificada con adyuvante completo de Freund.

- Día 15 (dosis de refuerzo 1): inyección i.p. de 0,5 ml de homogeneizado de antígeno, que contenía 100 µg de ChoKα recombinante purificada pero, en este caso, mezclada con el adyuvante de Freund incompleto.

5 - Día 30 (dosis de refuerzo 2): inyección i.p. de 0,5 ml de homogeneizado de antígeno, que contenía 100 µg de ChoKα recombinante purificada mezclada con el adyuvante de Freund incompleto.

10 - Día 40 (testado de la generación de anticuerpos frente a ChoKα en el suero de los ratones). Los ratones con una respuesta inmune positiva frente a ChoKα se identificaron mediante transferencia tipo Western frente a la proteína parcialmente purificada, tal como se muestra en la parte A de la Figura 1. De todos los ratones, se seleccionaron para la fusión los ratones 2 y 4 (el 2 para inyección intravenosa y el 4 para inyección intraperitoneal), por ser los que presentaban menos bandas inespecíficas.

15 - Día 42 (dosis de refuerzo 3): inyección i.v. (ratón 2) o i.p. (ratón 4) de 0,5 ml de homogeneizado de antígeno, que contenía 100 µg de ChoKα recombinante purificada mezclada con el adyuvante de Freund incompleto.

- Día 45: Fusión.

20 1.3.- Fusión

Los ratones seleccionados se prepararon mediante fusión de esplenocitos 3 días después de la última dosis de refuerzo. Los bazo se extrajeron de forma aséptica de cada uno de los ratones y se depositaron en una placa que contenía 10 ml de Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) sin suero, se procedió al disrupción del tejido hasta que la mayor parte de las células se hubieron liberado, y luego se recogieron los esplenocitos descartando los trozos de tejido de mayor tamaño (16). Para cada fusión se utilizó un total de 10^8 esplenocitos y 10^7 células de mieloma NS-1, que se cultivaron en medio suplementado con 10% de suero en condiciones estándar de temperatura y humedad, y con un 5% de CO₂. Después de 24 horas de incubación, las células se pasaron a medio fresco suplementado con FBS al 10% a una concentración final de 5×10^6 células/ml. Para la fusión de

células se utilizó 1 ml de DMEM sin suero que contenía 0,5 g de PEG 1500 (Roche) a 50°C.

1.4.- Selección, cribado y clonación de colonias híbridas

5 Los híbridos de interés se seleccionaron manteniendo las células 15 días en medio HAT suplementado siguiendo las recomendaciones del fabricante (GIBCO, Invitrogen, California, EE.UU.), medio en el cual se produce la muerte celular de todas aquellas células que no corresponden a moléculas híbridas de las dos poblaciones entre las que se ha realizado la fusión. Los hibridomas se
10 clonaron mediante la técnica de dilución límite, de la que se realizaron dos rondas consecutivas de crecimiento.

La tercera semana después de la fusión, se realizó el cribado de 149 colonias híbridas examinando si producían anticuerpos. Debido a su simplicidad y al elevado número de muestras que se pueden comprobar al mismo tiempo,
15 la selección de colonias híbridas positivas respecto a la producción de inmunoglobulinas se llevó a cabo mediante ELISA. Los detalles del ELISA se describen a continuación:

Se recubrieron placas multipocillo de microtitulación (NUNC, Alemania) utilizando 50 µl/pocillo de ChoK α recombinante a 5 µg/ml o GST en agua
20 destilada. Después de una hora de incubación a 37°C, las placas se lavaron con PBS/Tween 20 al 0,05%, y se bloquearon con leche al 10% en PBS, durante toda la noche a 4°C. Se lavaron las placas y se incubaron con 50 µl/pocillo de sobrenadante durante 1 hora a 37°C. Se lavaron los pocillos, y se añadió un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón con HRP (peroxidasa de
25 rábano) (Dako Cytomation, California), a una dilución 1:1000. Las placas se incubaron durante 1 hora a 37°C, se lavaron y se revelaron utilizando una solución con el sustrato colorimétrico ABTS (BIO-RAD, California). La reacción se paró mediante la adición de 100 µl de SDS al 0,5%.

La mayor parte de los sobrenadantes de cultivo de las colonias híbridas
30 presentaba reacción positiva frente al antígeno ChoK α , pero sólo las colonias que mostraron una reacción de color más fuerte que el anticuerpo policlonal fueron seleccionadas para continuar con su análisis. Así, se seleccionaron 19

colonias de hibridomas y se clonaron utilizando la técnica de la dilución límite. Para asegurar que el cultivo fuera monoclonal, se llevaron a cabo dos rondas consecutivas de subclonación en una placa de 96 pocillos. Se obtuvieron un total de 49 clones positivos, con los se continuó con los ensayos referentes a la producción de anticuerpos.

1.5. Selección de clones

La selección de los clones positivos respecto a la producción de inmunoglobulinas se llevó a cabo mediante dos métodos consecutivos: ELISA y inmunotinción en cytopsin. El ELISA se llevó a cabo de forma análoga a la descrita en la sección 1.4, con el fin de confirmar los resultados obtenidos durante el proceso de clonación. De los 49 clones iniciales en los que se había comprobado la producción de anticuerpos anti-ChoK α , se seleccionaron 14 clones que reconocían con fuerza el antígeno mediante ELISA, a los que se denominó AD1-AD14. Un ejemplo del ELISA de selección, el correspondiente al hibridoma del anticuerpo AD1, se muestra en la parte B de la Figura 1.

Para obtener una confirmación adicional de estos resultados y asegurarse de que los anticuerpos seleccionados podían reconocer la ChoK α en condiciones nativas, se llevó a cabo una inmunotinción en cytopsin, técnica basada en la centrifugación de células sobre un portaobjetos utilizando un casete y un rotor especial (vasculante), de manera que las células quedan pegadas en el portaobjetos como células enteras que no sufren alteraciones y mantienen su estructura original. Para ello, se utilizó como control positivo células embrionarias de riñón humano HEK293 transfectadas de forma transitoria con el vector de expresión de la secuencia codificante del gen de ChoK α y como control negativo células transfectadas con el vector vacío pCDNA3b; ambas líneas celulares habían sido cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% de suero en condiciones estándar de temperatura y humedad, y con un 5% de CO₂. Para ello, se colocaron en un portaobjetos un total de $2,5 \times 10^4$ células HEK293 transfectadas, se cargaron en un tubo de cytopsin, y se centrifugaron a 800 rpm durante 3 minutos. En este caso, las células transfectadas se adhieren al portaobjetos por la centrifugación de las

5 mismas (cytospin), lo que permite llevar a cabo con ellas un ensayo de inmunodetección (inmunotinción) utilizando el medio de cultivo de hibridomas como anticuerpo primario. Después de bloquear los sitios de unión inespecíficos con una solución bloqueante de peroxidasa, los portaobjetos que
10 contenían las células adheridas se incubaron con los sobrenadantes de las colonias híbridas durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras dos lavados con PBS, se aplicó un anticuerpo secundario anti-ratón durante 1 hora a temperatura ambiente y se reveló mediante procedimientos estándar utilizando DAB. Un ejemplo de los resultados obtenidos se muestra en la parte C de la Figura 1.

15 Los resultados de las inmunodetecciones realizadas sobre cytospins confirmaron que la totalidad de los 14 hibridomas seleccionados producía anticuerpo que reconocen de forma eficiente ChoK α en condiciones nativas. Así, se seleccionaron un total de 14 clones diferentes, todos ellos provenientes de la fusión realizada con células procedentes del ratón 4, y que resultaron ser
20 positivos respecto a la producción de inmunoglobulinas anti-ChoK α utilizando los dos métodos de cribado. Con estos clones se llevaron a cabo pruebas para su caracterización.

20 **Ejemplo 2.- Caracterización de los anticuerpos monoclonales generados**

La caracterización de los hibridomas generados y de los anticuerpos monoclonales que producen se realizó mediante las siguientes técnicas:

- isotipado
- transferencia Western
- 25 - inmunoprecipitación

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1.- Caracterización de los anticuerpos monoclonales AD1-AD14

MoAb	WB ^{1,*}	IP ^{2,*}	Actividad molecular post-IP*	Isotipo	Reactividad cruzada con la proteína de ratón
AD1	++	++	+++	IgG1.κ	No
AD2	++	++	++	IgG1.κ	No
AD3	+++	++	-	IgG1.κ	No
AD4	+++	++	+++	IgG1.κ	No
AD5	+++	++	+++	IgG1.κ	No
AD6	+++	-	-	IgG1.κ	Sí
AD7	+++	++	+++	IgG1.κ	No
AD8	+++	++	-	IgG1.κ	No
AD9	+++	-	-	IgG1.κ	Sí
AD10	+++	-	-	IgG1.κ	No
AD11	+++	+	-	IgG1.κ	Sí
AD12	+++	-	-	IgG1.κ	No
AD13	+++	++	+++	IgG1.κ	No
AD14	-	++	++	IgG2a.κ	No

¹ WB: detección de proteínas transferidas a membranas

² IP: inmunoprecipitación

*: Análisis en el que se aplicó un sistema arbitrario de cuantificación, en el que la reactividad obtenida se clasificó en las siguientes categorías:

+++ : excelente

++ : buena

+ : baja

- : sin reacción detectable

Los detalles de ejecución de cada una de las pruebas fueron los siguientes:

2.1.- Isotipado

La determinación de la clase y la subclase de los anticuerpos es útil para predecir las propiedades del anticuerpo y es necesaria para utilizarlos apropiadamente. El conocimiento de estas propiedades facilita la correcta elección del anticuerpo secundario que reconoce el anticuerpo monoclonal producido, o del tipo de resina que se une de forma eficaz al anticuerpo. Además, también es una primera indicación de monoclonalidad (17).

Según el esquema de inmunización seguido, sería esperable una respuesta inmune en los ratones tratados en la que los anticuerpos producidos fueran predominantemente de la clase de las inmunoglobulinas G (18). Los

anticuerpos tipo IgG muestran a menudo afinidades mayores por los antígenos que otras clases generadas en una respuesta primaria. Tal como se muestra en la Tabla 1, las cadenas pesadas de los anticuerpos monoclonales generados son cadenas γ de la subclase 1 excepto en el caso de anticuerpo monoclonal AD14, que es de la subclase 2a, cadenas pesadas que forman todas ellas anticuerpos de la clase de las inmunoglobulinas G. Las cadenas ligeras eran todas de la clase κ . Por ello, en los experimentos siguientes se utilizó un anticuerpo anti-IgG de ratón como anticuerpo secundario.

10 2.2.- Análisis por transferencia Western (WB)

Las inmunoensayos llevados a cabo sobre proteínas transferidas a membranas son esenciales para establecer la auténtica especificidad de los anticuerpos con respecto a la proteína de interés (17,18). Por ello, se investigó el uso potencial de los anticuerpos monoclonales producidos en transferencias Western (WB). Con ese objetivo, se transfectaron células HEK293 con el plásmido que contenía la secuencia codificante del gen de la ChoK α humana o con un vector vacío como control negativo. Muestras de cultivos de estas células se homogeneizaron y lisaron en un tampón que contenía MgCl₂ 1,5 mM, EDA 0,2 mM, NaCl 0,3 M, HEPES 25 mM pH 7,5, β -glicerofosfato 20 mM y Triton X-100 al 0,1% con un cóctel de inhibidores de proteasas, solución a la que se denominará en adelante tampón de lisis. Se separaron cantidades iguales de lisados de células (30 μ g) mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS al 10% (SDS-PAGE) tal como se ha descrito previamente (5) y se transfirieron las proteínas a una membrana de nitrocelulosa. La unión específica se detectó utilizando un kit de detección por quimioluminiscencia ECL (Amersham) siguiendo las instrucciones del fabricante. Cada medio de cultivo correspondiente a uno de los 14 hibridomas seleccionados se incubó separadamente, y como control positivo se utilizó un antisuero policlonal generado contra ChoK α humana previamente descrito (1). 13 de los 14 medios seleccionados resultaron positivos. La parte A de la Figura 2 muestra un experimento representativo de este ensayo. No se observaron

reacciones cruzadas o bandas inespecíficas, lo que es una indicación de la especificidad de los anticuerpos.

Adicionalmente, se ensayó si los anticuerpos monoclonales generados eran capaces de reconocer la ChoK α de ratón (mChoK). Para ello, se utilizaron
5 fibroblastos NIH3T3 que sobreexpresaban de forma estable la mChoK (células NIH3T3-Tmar-9 y NIH3T3-Tmar-11), que se mantuvieron en medio DMEM suplementado con 10% de suero en condiciones estándar de temperatura y humedad, y con un 5% de CO₂. Se obtuvieron lisados de estas células de forma análoga a la descrita en el ensayo de la transferencia Western de las
10 células HEK293T (transfectadas) recién descrito, que se resolvieron igualmente por la técnica de SDS-PAGE, transfiriendo las proteínas a membranas de nitrocelulosa, que fueron incubadas con los 14 medios de cultivo. El experimento, demostró que, aunque hay un 77% de similitud estructural entre las colina quinazas humana y de ratón (19), sólo los anticuerpos monoclonales
15 AD6, AD9 y AD11 fueron capaces de unirse de forma eficaz a la mChoK en el inmunoensayo realizado sobre proteínas transferidas a membranas de nitrocelulosa. Los resultados obtenidos con dos de estos anticuerpos, AD6 y AD9, se muestran en la parte B de la Figura 2.

20 2.3.- Inmunoprecipitación

La inmunoprecipitación (IP) es una de las técnicas inmunoquímicas más ampliamente utilizadas. Con el fin de caracterizar la capacidad de los anticuerpos generados para inmunoprecipitar ChoK α , se recubrieron microperlas de proteína G-Sefarosa con cada uno de los anticuerpos
25 monoclonales generados y se probó su capacidad de provocar la inmunoprecipitación de ChoK α presente en lisados de células HEK293 transfectadas. Para ello, el medio de cultivo de cada uno de los hibridomas se diluyó 1:100 en tampón de lisis y se incubó con microperlas recubiertas de Proteína G bloqueada con BSA (Sigma-Aldrich, MO) durante 1 hora a 4°C.
30 Después de tres lavados en tampón de lisis, los lisados de células se inmunoprecipitaron con los anticuerpos monoclonales ligados a las microperlas.

Para cuantificar la capacidad relativa de los anticuerpos monoclonales producidos para precipitar ChoK α , se llevó a cabo un ensayo radioactivo *in vitro* de actividad enzimática colina quinasa en los inmunoprecipitados, basado en la fosforilación de colina para dar lugar a o-fosfocolina (P-Cho) tal como se ha descrito previamente (12,14), en presencia de cloruro de metil-[^{14}C]-colina (50-60 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$, Amersham Biosciences Europe, Alemania) a 37°C durante 30 minutos. Las muestras se resolvieron mediante cromatografía en capa fina (TLC) y se cuantificó la ^{14}C -PCho. Puesto que la única fuente de actividad ChoK es la fracción inmunoprecipitada, si el anticuerpo ha sido eficaz en la inmunoprecipitación, habrá actividad ChoK detectable y se generará PCho.

Según se muestra en la Tabla 1, un total de 7 de los 14 anticuerpos monoclonales analizados (AD1, AD2, AD4, AD5, AD7, AD13, AD14) generaron ChoK α inmunoprecipitada de forma que fuera funcional y la enzima inmunoprecipitada fuera completamente activa. Sin embargo, la interacción de algunos de los anticuerpos con la ChoK α podría interferir con su actividad enzimática y, aun siendo capaz de inmunoprecipitar la proteína ChoK α , dar lugar a una valoración negativa en el ensayo de actividad enzimática.

Para evaluar esta última posibilidad, la capacidad para inmunoprecipitar ChoK α se determinó también mediante transferencia Western utilizando el anticuerpo policlonal para reaccionar con la posible ChoK α inmunoprecipitada por los anticuerpos monoclonales que dieron resultados negativos en el ensayo enzimático. Como se muestra en la Tabla 1, los anticuerpos monoclonales AD3 y AD8 y, en menor medida, AD11, fueron capaces de inmunoprecipitar ChoK α . Estos resultados sugieren que algunos de los anticuerpos monoclonales pueden interferir con la actividad enzimática de ChoK α , dando lugar a la ausencia de actividad ChoK en los inmunoprecipitados.

Ejemplo 3.- Pruebas inmunohistoquímicas

Finalmente, se analizó el uso potencial de los anticuerpos generados para inmunohistoquímica (IHC). Los anticuerpos monoclonales se ensayaron primero en cytopines de células embebidas en parafina que sobreexpresaban ChoK α en condiciones experimentales óptimas. Para asegurar concentraciones

elevadas del antígeno, se transfectaron células HEK293 con el plásmido que codifica ChoK α o con el vector vacío pCDNA3b como control negativo y se cultivaron las células en medio DMEM suplementado con 10% de suero en condiciones estándar de temperatura y humedad, y con un 5% de CO₂.

5 Alrededor de 10 millones de células HEK293T (transfectadas) que sobreexpresaban ChoK α humana se centrifugaron mediante la técnica de cytopspin y las células sedimentadas se embebieron en parafina líquida, siguiendo con ellas un procedimiento análogo al que se realiza habitualmente con secciones de tejido, tanto en laboratorios de investigación como en los
10 servicios de anatomía patológica de los distintos hospitales. Después de 24 horas de fijación en formalina/acético/alcohol (FAA), los sedimentos celulares de deshidrataron comenzando con etanol al 50% durante 30 minutos e incrementando gradualmente la concentración de alcohol al 100%. Los sedimentos se introdujeron en xileno después de su inclusión en parafina
15 líquida, para proceder a su aclaramiento.

 A continuación, se llevaron a cabo citoimmunotinciones con anticuerpos monoclonales de la invención, obteniéndose un fuerte marcaje citoplasmático específico en células transfectadas HEK293T/ChoK α . Estos resultados indican que los anticuerpos monoclonales generados son capaces de reconocer
20 ChoK α también en células embebidas en parafina, y mostrando una elevada afinidad por ChoK α .

 Puesto que ChoK α ha sido descrita recientemente como un nuevo oncogén (4) con alta incidencia en el cáncer humano (5-7), se ensayó también el uso potencial de los anticuerpos monoclonales en el diagnóstico del cáncer
25 mediante análisis inmunohistoquímico (IHC) de muestras humanas, llevando a cabo pruebas inmunohistoquímicas de tinción de ChoK α en unas cuantas biopsias, de pacientes del Hospital La Paz (Madrid, España) a los que previamente se les había diagnosticado cáncer de mama y que se habían almacenado embebidas en parafina según el procedimiento estándar. Los
30 bloques de parafina de las distintas muestras se cortaron en secciones de 5 μ m. Posteriormente, se desparafinaron las secciones y se bloqueó la actividad peroxidasa endógena por incubación en H₂O₂ al 3% en metanol durante 10

minutos a temperatura ambiente. Los antígenos se recuperaron mediante la incubación en EDTA 940 μ M, pH 7,2, durante 45 minutos a 155°C. El anticuerpo monoclonal primario anti-ChoK se diluyó 1:2 en TBS con BSA al 1%. Las secciones de tejido se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente.

5 Las secciones se sumergieron en TBS y se incubaron con el kit de EnVision™ (Dako Cytomation, CA), basado en peroxosidasa, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se incubaron luego con el sustrato cromógeno diaminobencidina (Dako Cytomation, CA) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Las secciones se contratiñeron con hematoxilina.

10 En la Figura 3 pueden observarse los resultados obtenidos con muestras tomadas de tumores colorrectales de distintos pacientes, en los que se puede observar un ejemplo de anticuerpo no válido para inmunohistoquímica, AD9 (tinción negativa), un anticuerpo no recomendable para su uso en esta técnica al mostrar un patrón de tinción débil, AD6, y dos ejemplos de anticuerpos, AD6

15 y AD1, considerados como buenos para su uso en inmunohistoquímica, por dar lugar a una fuerte tinción del tejido tumoral y tinción basal baja del tejido normal adyacente.

En la Figura 4 pueden observarse los resultados obtenidos con el anticuerpo AD1 (considerado válido para el análisis de la expresión de ChoK α por inmunohistoquímica) en biopsias procedentes de tejido de mama

20 cancerosa (segunda fila, marcada con el número 2), así como en biopsias correspondientes a pacientes a los que se les había diagnosticado cáncer de pulmón, entre las que había muestras de cáncer NSCLC y SCLC (primera fila, marcada con el número 1). El análisis de las biopsias teñidas muestra un fuerte

25 marcaje de algunos de los tejidos tumorales, mientras que en el tejido normal adyacente se observó una tenue tinción. Sin embargo, en algunas biopsias tanto las células tumorales como las de tejido normal mostraron tinción basal de ChoK α . Estos resultados están en consonancia con estudios previos de los

30 autores de la invención, en los que un 40-60% de los tumores de mama, pulmón, colon y próstata mostraron un incremento de los niveles de ChoK α o de la actividad colina quinasa.

De los 14 anticuerpos monoclonales, con 10 de ellos se obtuvo inmunotinción, dando lugar a resultados similares en muestras correspondientes a los mismos tejidos, mientras que los 4 restantes resultaron dieron resultados negativos en el análisis IHQ. El comportamiento de cada uno de los anticuerpos se resume en la Tabla 2.

Tabla 2.- Comportamiento de los anticuerpos monoclonales en ensayos inmunohistoquímicos

Anticuerpo Monoclonal	Reacción Inmunohistoquímica*
AD1	+++
AD2	+++
AD3	+++
AD4	++
AD5	+++
AD6	+
AD7	+
AD8	+
AD9	-
AD10	+
AD11	-
AD12	-
AD13	-
AD14	++

*: La valoración dada a la reactividad obtenida fue:

+++ excelente

++ buena

+ baja

-: sin reacción detectable

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bhakoo KK, Williams SR, Florian CL, Land H, Noble MD. Immortalization and transformation are associated with specific alterations in choline metabolism. Cancer Res. 1996; 56:4630-5.
2. Nakagami K, Uchida T, Ohwada S, Koibuchi Y, Suda Y, Sekine T, Morishita Y. Increased choline kinase activity and elevated phosphocholine levels in human colon cancer. Jpn J Cancer Res. 1999 ; 90:419-24.
3. Cuadrado A, Carnero A, Dolfi F, Jimenez B, Lacal JC. Phosphorylcholine: a novel second messenger essential for mitogenic activity of growth factors. Oncogene. 1993; 8:2959-68.
4. Ramirez de Molina A, Gallego-Ortega D, Sarmentero J, Banez-Coronel M, Martin-Cantalejo Y, Lacal JC. Choline kinase is a novel oncogene that potentiates RhoA-induced carcinogenesis. Cancer Res. 2005 Jul 1;65(13):5647-53
5. Ramirez de Molina A, Gutierrez R, Ramos MA, Silva JM, Silva J, Bonilla F, Sanchez JJ, Lacal JC. Increased choline kinase activity in human breast carcinomas: clinical evidence for a potential novel antitumor strategy. Oncogene. 2002; 21:4317-22.
6. Ramirez de Molina A, Rodriguez-Gonzalez A, Gutierrez R, Martinez-Pineiro L, Sanchez J, Bonilla F, Rosell R, Lacal J. Overexpression of choline kinase is a frequent feature in human tumor-derived cell lines and in lung, prostate, and colorectal human cancers. Biochem Biophys Res Commun. 2002; 296:580-3.
7. Ramirez de Molina A, Banez-Coronel M, Gutierrez R, Rodriguez-Gonzalez A, Olmeda D, Megias D, Lacal JC. Choline kinase activation is a critical requirement for the proliferation of primary human mammary epithelial cells and breast tumor progression. Cancer Res. 2004; 64:6732-9
8. Rodriguez-Gonzalez A, Ramirez de Molina A, Fernandez F, Lacal JC. Choline kinase inhibition induces the increase in ceramides resulting in a highly specific and selective cytotoxic antitumoral strategy as a potential mechanism of action. Oncogene. 2004; 23:8247-59.
9. Rodriguez-Gonzalez A, Ramirez de Molina A, Banez-Coronel M, Megias D, Lacal JC. Inhibition of choline kinase renders a highly selective cytotoxic effect in tumour cells through a mitochondrial independent mechanism. Int J Oncol. 2005; 26:999-1008.

10. Ramirez de Molina A, Rodriguez-Gonzalez A, Penalva V, Lucas L, Lacal JC. Inhibition of ChoK is an efficient antitumor strategy for Harvey-, Kirsten-, and N-ras-transformed cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 285:873-9.
- 5 11. Hernandez-Alcoceba R, Saniger L, Campos J, Nunez MC, Khaless F, Gallo MA, Espinosa A, Lacal JC. Choline kinase inhibitors as a novel approach for antiproliferative drug design. *Oncogene.* 1997; 15:2289-301.
- 10 12. Hernandez-Alcoceba R, Fernandez F, Lacal JC. In vivo antitumor activity of choline kinase inhibitors: a novel target for anticancer drug discovery. *Cancer Res.* 1999; 59:3112-8.
- 15 13. Rodriguez-Gonzalez A, de Molina AR, Fernandez F, Ramos MA, Nunez M del C, Campos J, Lacal JC. Inhibition of choline kinase as a specific cytotoxic strategy in oncogene-transformed cells. *Oncogene.* 2003; 22:8803-12.
- 20 14. Ramirez de Molina A, Penalva V, Lucas L, Lacal JC. Regulation of choline kinase activity by Ras proteins involves Ral-GDS and PI3K. *Oncogene.* 2002 Jan 31;21(6):937-46.
- 25 15. Hosaka K, Tanaka S, Nikawa J, Yamashita S. Cloning of a human choline kinase cDNA by complementation of the yeast cki mutation. *FEBS Lett.* 1992; 304:229-32.
- 30 16. Köhler G. and Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256:495, 1975.
17. Hurrell J.G.R. *Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1985, 240.
- 35 18. Harlow, E and Lane, D. 1988. *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
19. Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs". *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal específico para la proteína colina quinasa alfa humana que se selecciona del grupo de AD1, AD2, AD3, AD4, AD5, AD6, AD7, AD8, AD9, AD10, AD11, AD12, AD13 y AD14.

2. Una línea celular de hibridoma capaz de producir un anticuerpo monoclonal específico para la proteína colina quinasa alfa humana que se selecciona del grupo de AD1, AD2, AD3, AD4, AD5, AD6, AD7, AD8, AD9, AD10, AD11, AD12, AD13 y AD14.

3. Línea celular de hibridoma según la reivindicación 2, obtenida mediante la fusión con la línea de mieloma de ratón NS-1 de células de bazo de ratones Balb/c inmunizados con la proteína colina quinasa alfa humana.

4. Una composición que comprende al menos un anticuerpo monoclonal específico para la proteína colina quinasa alfa humana que se selecciona del grupo de AD1, AD2, AD3, AD4, AD5, AD6, AD7, AD8, AD9, AD10, AD11, AD12, AD13 y AD14, o combinaciones de los mismos.

5. Composición según la reivindicación 3, en la que el anticuerpo monoclonal está unido a otra sustancia o partícula.

6. Composición según la reivindicación 5, en la que el anticuerpo monoclonal está unido a una sustancia que facilita su detección.

7. Composición según la reivindicación 6, en la que el anticuerpo monoclonal está unido a una molécula radioactiva, un cromóforo, un fluoróforo o una enzima que cataliza una reacción en la que se produce un cromóforo o fluoróforo o en la que desaparece un cromóforo o un fluoróforo.

8. Composición según la reivindicación 5, en la que el anticuerpo monoclonal está unido a una sustancia o partícula que facilita su extracción del medio en el que se encuentra.

5 9. Composición según la reivindicación 8, en la que el anticuerpo monoclonal está unido a una partícula metálica o una partícula magnética.

10 10. Composición según la reivindicación 4, que comprende adicionalmente un segundo anticuerpo capaz de unirse a al menos un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo de AD1, AD2, AD3, AD4, AD5, AD6, AD7, AD8, AD9, AD10, AD11, AD12, AD13 y AD14 que esté presente en dicha composición.

15 11. Composición según la reivindicación 10, en la que el segundo anticuerpo es un anticuerpo que se une al fragmento Fc de las inmunoglobulinas G de ratón.

20 12. Composición según la reivindicación 10 u 11, en la que el segundo anticuerpo está unido a una sustancia o partícula que facilita su detección o facilita su extracción del medio en el que se encuentre.

25 13. Composición según la reivindicación 12, en la que el segundo anticuerpo está unido a una molécula radioactiva, un cromóforo, un fluoróforo o una enzima que cataliza una reacción en la que se produce un cromóforo o fluoróforo o en la que desaparece un cromóforo o un fluoróforo.

 14. Composición según la reivindicación 12, en la que el segundo anticuerpo está unido a una partícula metálica o una partícula magnética.

30 15. Uso de al menos un anticuerpo de la reivindicación 1 o de una composición de las reivindicaciones 4 a 14 que lo contenga para detectar y/o cuantificar la proteína colina quinasa alfa humana en una muestra cualquiera.

16. Uso según la reivindicación 15, en el que la detección y/o cuantificación de la proteína colina quinasa alfa humana en una muestra cualquiera se produce mediante un inmunoensayo en el que las proteínas
5 presentes en la muestra a analizar han sido previamente objeto de transferencia Western.

17. Uso según la reivindicación 16, en el que el anticuerpo monoclonal utilizado en el inmunoensayo se selecciona del grupo de AD1, AD2, AD3, AD4,
10 AD5, AD6, AD7, AD8, AD9, AD10, AD11, AD12, AD13 y AD14.

18. Uso según la reivindicación 15, en el que en el que la detección y/o cuantificación de la proteína colina quinasa alfa humana en una muestra cualquiera se produce tras la inmunoprecipitación de la misma.
15

19. Uso según la reivindicación 18, en el que en el que el anticuerpo monoclonal usado para la inmunoprecipitación se selecciona del grupo de AD1, AD2, AD3, AD4, AD5, AD7, AD8, AD11, AD13 y AD14.

20. Uso según la reivindicación 18, en el que la detección y/o cuantificación de la proteína colina quinasa alfa tras la inmunoprecipitación de la misma comprende una etapa en la que se ensaya la actividad colina quinasa alfa humana detectable en el inmunoprecipitado.
20

21. Uso según la reivindicación 20, en el que el anticuerpo monoclonal usado para la inmunoprecipitación se selecciona del grupo de AD1, AD2, AD4, AD5, AD7, AD13 y AD14.
25

22. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 21, en el que
30 la muestra es una muestra biológica de un ser humano.

23. Uso según la reivindicación 22, en el que la muestra biológica es una muestra de un fluido biológico de un ser humano.

24. Uso según la reivindicación 22, en el que la muestra biológica es una muestra de tejido tomada de un ser humano.

25. Uso según la reivindicación 15, en el que la detección y/o cuantificación de la proteína colina quinasa alfa humana se produce mediante técnicas inmunohistoquímicas.

10

26. Uso según la reivindicación 25, en el que la detección y/o cuantificación de la proteína colina quinasa alfa humana se produce sobre una muestra de tejido tomada de un ser humano.

27. Uso según la reivindicación 26, en el que el anticuerpo monoclonal utilizado para la realización de las técnicas inmunohistoquímicas se selecciona del grupo de AD1, AD2, AD3, AD4, AD5, AD6, AD7, AD8, AD10, AD14.

28. Uso según la reivindicación 26 ó 27, en el que el tejido del que se ha extraído la muestra es tejido de mama, pulmón, colon, próstata, vejiga o de un tumor hematológico.

29. Un método para realizar *in vitro* el diagnóstico de cáncer, el pronóstico de su evolución, el seguimiento de dicha evolución o para comprobar la efectividad de un tratamiento anticancerígeno, que comprende la detección y/o cuantificación de la proteína colina quinasa alfa humana en una muestra biológica de un ser humano mediante un anticuerpo monoclonal que se selecciona del grupo de AD1, AD2, AD3, AD4, AD5, AD6, AD7, AD8, AD9, AD10, AD11, AD12, AD13 y AD14.

30

30. Método según la reivindicación 29, en el que la muestra biológica es una muestra de tejido tomada de un ser humano.

31. Método según la reivindicación 30, en el que la muestra de tejido es de tejido de mama, pulmón, colon, próstata, vejiga o de un tumor hematológico.
- 5 32. Método según la reivindicación 30 ó 31, en el que la detección y/o cuantificación de la proteína colina quinasa alfa humana se realiza mediante técnicas inmunohistoquímicas.
- 10 33. Método según la reivindicación 32, en el que la detección del anticuerpo monoclonal unido a la proteína quinasa alfa humana se realiza mediante un segundo anticuerpo capaz de unirse al anticuerpo monoclonal.
- 15 34. Método según la reivindicación 33, en el que el segundo anticuerpo monoclonal capaz de unirse al anticuerpo monoclonal está unido a una molécula radioactiva, un cromóforo, un fluoróforo o una enzima que cataliza una reacción en la que se produce un cromóforo o fluoróforo o en la que desaparece un cromóforo o un fluoróforo.
- 20 35. Método según la reivindicación 33 ó 34, en el que el segundo anticuerpo capaz de unirse al anticuerpo monoclonal específico para la colina quinasa alfa humana en un anticuerpo que se une al fragmento Fc de las inmunoglobulinas G de ratón.
- 25 36. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 32 a 35, en el que el anticuerpo monoclonal específico para la colina quinasa alfa humana utilizado para la realización de las técnicas inmunohistoquímicas se selecciona del grupo de AD1, AD2, AD3, AD4, AD5, AD6, AD7, AD8, AD10 y AD14.
- 30 37. Un *kit* para realizar *in vitro* el diagnóstico de cáncer, el pronóstico de su evolución, el seguimiento de la misma o para comprobar la efectividad de un tratamiento anticancerígeno en una muestra biológica de un ser humano que comprende al menos un anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1.

38. *Kit* según la reivindicación 37, que comprende adicionalmente un segundo anticuerpo capaz de unirse a al menos un anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1 que esté presente en el *kit*.

5

39. *Kit* según la reivindicación 38, en el que el segundo anticuerpo capaz de unirse a al menos un anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1 está unido a una molécula radioactiva, un cromóforo, un fluoróforo o una enzima que cataliza una reacción en la que se produce un cromóforo o fluoróforo o en la que desaparece un cromóforo o un fluoróforo.

10

40. *Kit* según la reivindicación 38 ó 39, en el que el segundo anticuerpo capaz de unirse a al menos un anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1 presente en el *kit* es un anticuerpo que se une al fragmento Fc de las inmunoglobulinas G de ratón.

15

41. Uso de al menos un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo de AD3, AD8 y AD11 para la fabricación de un medicamento para la terapia contra el cáncer.

20

42. Uso según la reivindicación 41, en el que el cáncer es cáncer de mama, pulmón, colon, próstata, vejiga o un tumor hematológico.

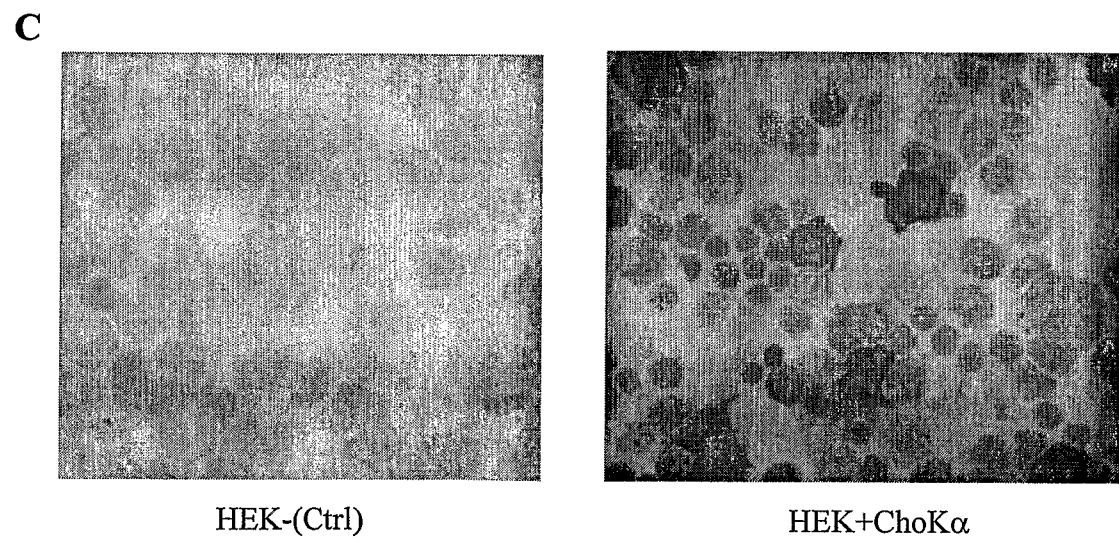
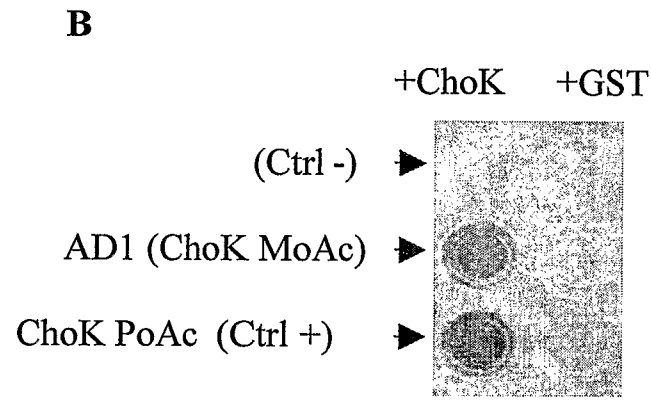
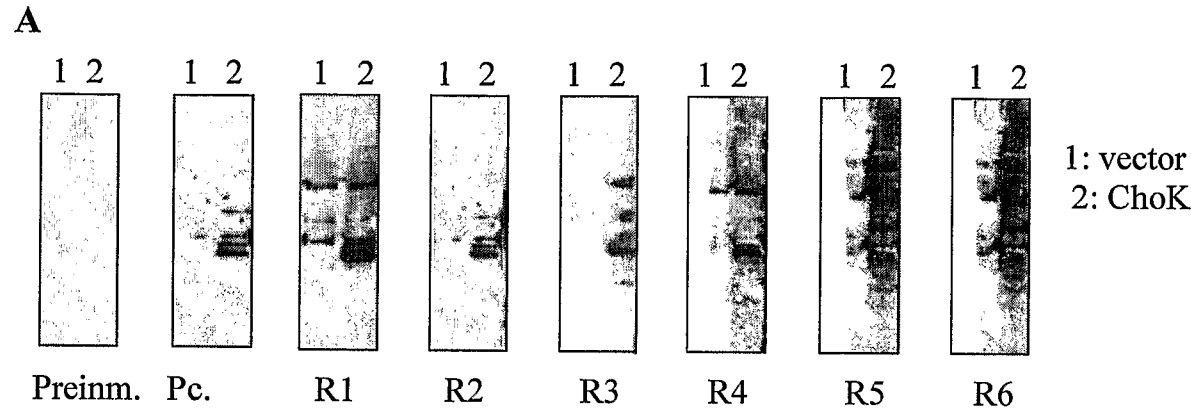


Figura 1

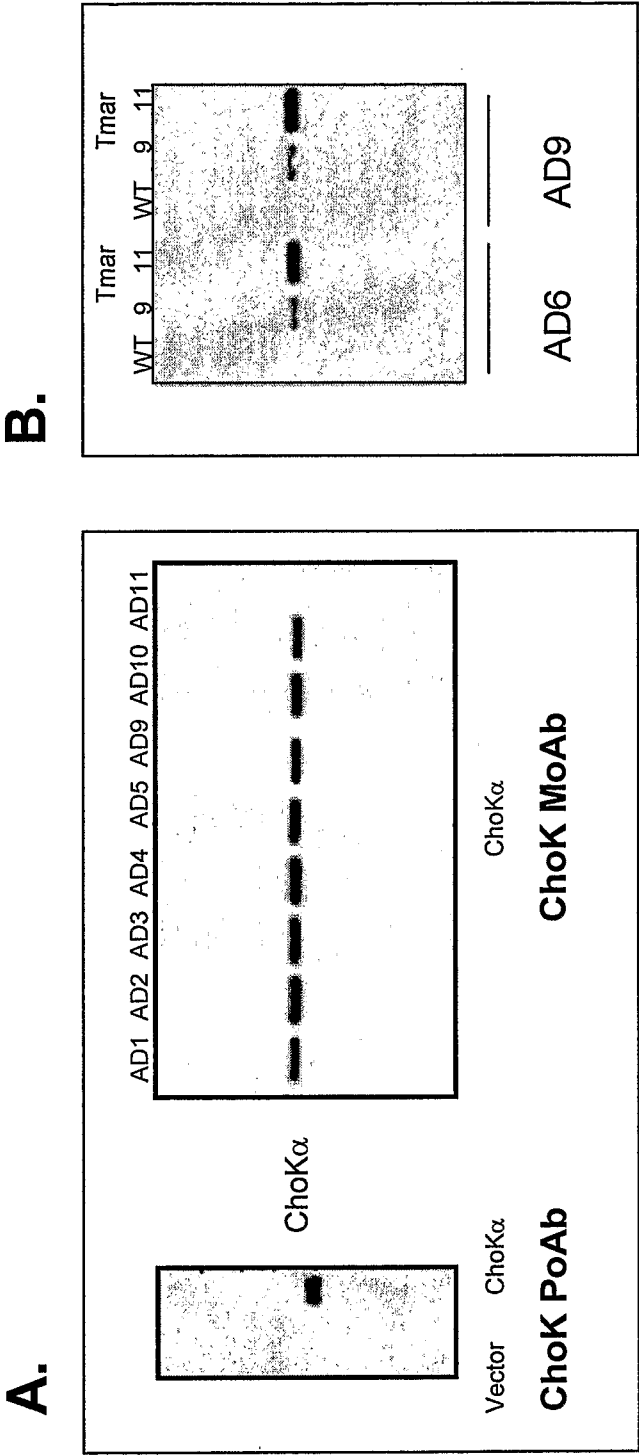
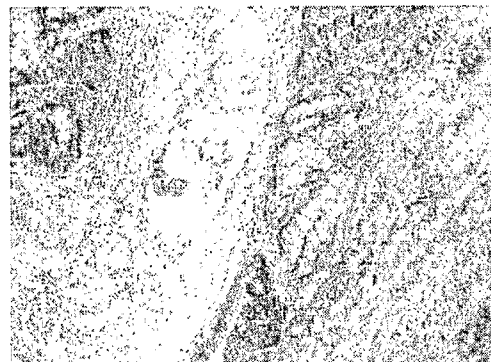


Figura 2



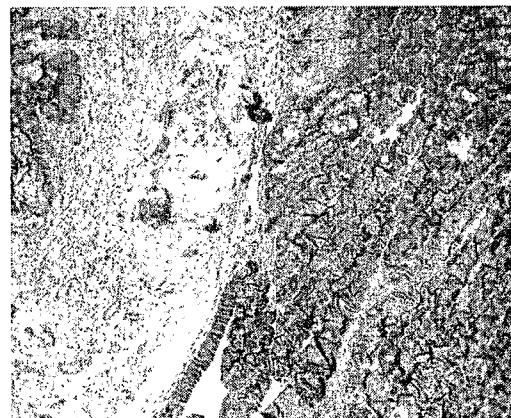
MoAb: AD9
IHQ: -



MoAb: AD6
IHQ: -



MoAb: AD1
IHQ: +++



MoAb: AD2
IHQ: +++

Figura 3

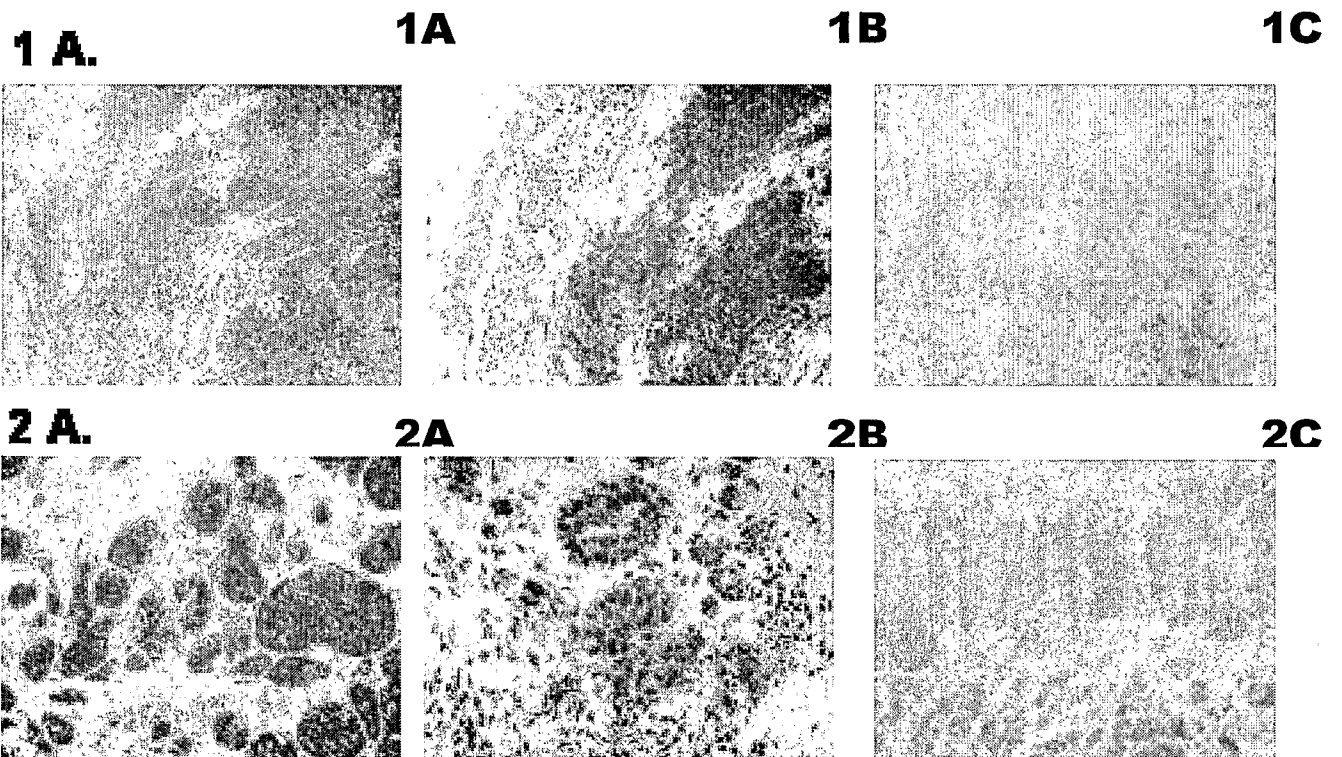


Figura 4