

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 965 626**

⑮ Int. Cl.:

C07K 16/22 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2015 E 19205321 (3)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2023 EP 3653644**

⑭ Título: **Anticuerpos monoclonales contra el factor 15 de diferenciación y crecimiento (GDF-15), y usos de los mismos para tratar la caquexia por cáncer y el cáncer**

⑩ Prioridad:

26.03.2014 GB 201405475
26.03.2014 GB 201405477

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.04.2024

⑬ Titular/es:

**JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT
WÜRZBURG (100.0%)**
Sanderring 2
97070 Würzburg, DE

⑭ Inventor/es:

WISCHHUSEN, JÖRG;
JUNKER, MARKUS;
SCHÄFER, TINA y
ÜHRINGER, DIRK

⑯ Agente/Representante:

BERTRÁN VALLS, Silvia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 965 626 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

5 Anticuerpos monoclonales contra el factor 15 de diferenciación y crecimiento (GDF-15), y usos de los mismos para tratar la caquexia por cáncer y el cáncer

10 **Campo de la invención**

15 La presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales anti-GDF-15 humano, a kits y a líneas celulares capaces de producir los anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento. La presente invención se refiere además a anticuerpos contra GDF-15 humano capaces de inhibir el crecimiento de cáncer, tratar la pérdida de peso inducida por cáncer y la caquexia por cáncer.

20 **Antecedentes**

25 Hasta la fecha, muchos cánceres siguen siendo áreas de necesidades médicas insatisfechas y, por consiguiente, son necesarios medios para tratar el cáncer de manera más eficaz y tratar el cáncer en una gama más amplia de cánceres.

30 Además del padecimiento provocado por el cáncer en sí mismo, muchos pacientes presentan caquexia por cáncer, un estado médico desencadenado por el cáncer que implica generalmente pérdida de peso y pérdida de masa muscular esquelética. La caquexia por cáncer representa más del 20 por ciento de todas las muertes relacionadas con el cáncer (Murphy KT y Lynch GS: Update on emerging drugs for cancer cachexia. Expert Opin Emerg Drugs. dic. de 2009; 14(4):619-32.).

35 Por tanto, para mejorar el tratamiento y el pronóstico de cánceres que conducen a caquexia por cáncer, son necesarios regímenes de tratamiento que se dirijan a estos dos estados médicos. Hasta la fecha, la mayoría de los nuevos fármacos para el tratamiento de caquexia por cáncer son fármacos que se dirigen a la caquexia pero no al cáncer en sí mismo (véase Murphy KT y Lynch GS: Update on emerging drugs for cancer cachexia. Expert Opin Emerg Drugs. dic. de 2009; 14(4):619-32.). Sólo muy pocos fármacos son eficaces contra el cáncer y la caquexia por cáncer, y por tanto, a menudo son necesarios regímenes de tratamiento complejos que combinan fármacos anticancerígenos y fármacos contra la caquexia por cáncer. Por consiguiente, todavía existe la necesidad médica insatisfecha de fármacos que puedan usarse para tratar eficazmente tanto el cáncer como la caquexia por cáncer en una amplia gama de cánceres.

40 Se sabe que muchos tipos de cáncer expresan factores de crecimiento, incluyendo factores tales como VEGF, PDGF, TGF- β y GDF-15.

45 El GDF-15, factor 15 de diferenciación de crecimiento, es un miembro divergente de la superfamilia de TGF- β . Es una proteína que se expresa de manera intracelular como precursor, posteriormente se procesa y finalmente se secreta de la célula al entorno. Tanto la forma activa, totalmente procesada (madura) como el precursor de GDF-15 pueden encontrarse fuera de las células. El precursor se une covalentemente a través de su secuencia de aminoácidos COOH-terminal a la matriz extracelular (Bauskin AR *et al.*, Cancer Research 2005) y, por tanto, reside en el exterior de una célula. La forma activa, totalmente procesada (madura) de GDF-15 es soluble y se encuentra en los sueros sanguíneos. Por tanto, la forma procesada de GDF-15 puede actuar potencialmente sobre cualquier célula diana dentro del cuerpo que esté conectada con la circulación sanguínea, siempre que la célula diana potencial exprese un receptor para el ligando de GDF-15 soluble.

50 Durante el embarazo, el GDF-15 se encuentra en condiciones fisiológicas en la placenta. Sin embargo, muchos cánceres malignos (especialmente cánceres cerebrales agresivos, melanoma, cáncer de pulmón, tumores gastrointestinales, cáncer de colon, cáncer de páncreas, cáncer de próstata y cáncer de mama (Mimeault M y Batra SK, *J. Cell Physiol* 2010)) presentan mayores niveles de GDF-15 en el tumor así como en el suero sanguíneo. Asimismo, se han descrito correlaciones entre la alta expresión de GDF-15 y la quimiorresistencia (Huang CY *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 2009) y entre la alta expresión de GDF-15 y un mal pronóstico, respectivamente (Brown DA *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 2009).

55 El GDF-15 se expresa en gliomas de diferentes grados de la OMS tal como se evalúa mediante inmunohistoquímica (Roth *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 2010) Además, Roth *et al.* expresaron de manera estable constructos de ADN que expresan ARN en horquilla corto dirigidos a GDF-15 endógeno o constructos de control en células de glioma SMA560. Cuando se usaron estas líneas celulares estables preestablecidas, se observó que la formación de tumores en ratones que portaban células SMA560 deficientes en GDF-15 se retrasó en comparación con los ratones que portaban constructos de control.

60 La solicitud de patente WO 2014/049087, un documento según el art. 54(3) CPE, se refiere a anticuerpos monoclonales anti-GDF-15, en particular a un anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma B1-23 depositado ante la Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares) con el número de registro DSM ACC3142 en virtud del Tratado de Budapest.

El documento WO 2014/049087 también se refiere a los usos de los anticuerpos anti-GDF-15.

Las solicitudes de patente WO 2005/099746 y WO 2009/021293 se refieren a un anticuerpo anti-GDF-15 humano (AcM26) capaz de antagonizar los efectos del GDF-15 humano sobre la pérdida de peso inducida por tumor *in vivo* en ratones: en estos documentos, se administró a ratones inmunológicamente comprometidos células tumorales humanas (células de carcinoma de próstata DU145) transfectadas con plásmidos que sobreexpresan GDF-15 humano. Unas células tumorales que portaban plásmidos que carecían de una secuencia de GDF-15 sirvieron como control negativo. Aquellos ratones que expresaron GDF-15 de xenoinjerto mostraron una pérdida de peso inducida por tumor (término clínico: caquexia) y anorexia. Una única administración intraperitoneal de 1 mg de AcM26 a partir del documento WO 2005/099746 dio como resultado una reversión completa de la pérdida de peso inducida por tumor. Los documentos WO 2005/099746 y WO 2009/021293 no divulgaban los efectos de un anticuerpo anti-GDF-15 humano sobre el crecimiento tumoral. Además, estos documentos no mencionan si los anticuerpos anti-GDF-15 humano podrían conducir a un aumento del peso corporal de los ratones tratados en comparación con su peso corporal antes de la aparición de la caquexia.

De manera similar, Johnen H *et al.* (Nature Medicine, 2007) notificaron los efectos de un anticuerpo monoclonal anti-GDF-15 humano sobre la anorexia y la pérdida de peso inducidas por cáncer, pero no observaron ningún efecto del anticuerpo anti-GDF-15 humano sobre el tamaño del tumor formado por el cáncer, ni siquiera cuando el anticuerpo se administró a una alta dosificación de 1 mg y, por tanto, el anticuerpo no inhibió el crecimiento del cáncer.

El documento US 2011/0262444 se refiere a anticuerpos específicos de forma para NAG-1 (MIC-1, GDF-15), H6D. Fairlie *et al.* (Biochemistry 2001, 40, 65-73) describen el mapeo de epítopos de la proteína de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta, la citocina inhibidora de macrófagos-1 (MIC-1).

Por consiguiente, hasta la fecha, todavía existía la necesidad en la técnica de medios para tratar eficazmente el cáncer y la caquexia por cáncer, y de medios para tratar el cáncer y la caquexia por cáncer en una gama más amplia de cánceres.

Por tanto, es un objeto de la invención obtener medios que puedan usarse para tratar eficazmente la caquexia por cáncer, y también tratar eficazmente el cáncer, y medios que puedan usarse para tratar la caquexia por cáncer, y también tratar eficazmente el cáncer en una gama más amplia de cánceres.

En un esfuerzo por encontrar los medios para lograr estos objetos, los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que un anticuerpo monoclonal contra GDF-15 humano puede usarse para tratar caquexia por cáncer y también para tratar cáncer de tumores de xenoinjerto humano en ratones.

Además, un anticuerpo contra GDF-15 humano según la presente invención tiene una constante de disociación de equilibrio de aproximadamente 790 pM para GDF-15 recombinante incluso sin maduración de afinidad adicional, que es una mayor afinidad en comparación con la mayoría de los anticuerpos terapéuticos conocidos.

Por tanto, el anticuerpo contra GDF-15 humano según la presente invención tiene propiedades superiores en comparación con los anticuerpos conocidos en la técnica, y es particularmente útil para inhibir el crecimiento de cáncer y la caquexia por cáncer. Por tanto, el anticuerpo de la presente invención es útil para tratar cáncer y para tratar caquexia por cáncer. Por consiguiente, se completó la presente invención.

45 Breve descripción de la invención

La invención es tal como se define en las reivindicaciones adjuntas. La presente invención resuelve los objetos mencionados anteriormente proporcionando los anticuerpos monoclonales, kits y las líneas celulares capaces de producir los anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento.

En particular, los presentes inventores muestran sorprendentemente que los anticuerpos monoclonales contra GDF-15 humano y partes de unión a antígeno de los mismos según la invención son capaces de inhibir la caquexia por cáncer y/o el crecimiento de cáncer. Esto fue inesperado porque sólo se sabía que los anticuerpos monoclonales contra GDF-15 que se conocían previamente en la técnica (documentos WO 2005/099746, WO 2009/021293 y Johnen H *et al.*, Nature Medicine, 2007) provocaban una reversión de la pérdida de peso inducida por cáncer (es decir, una reversión de un síntoma secundario inducido por el GDF-15 expresado por el cáncer), pero se demostró que no logran inhibir el crecimiento del cáncer.

Al mostrar que los anticuerpos monoclonales contra GDF-15 humano según la invención pueden usarse para tratar la pérdida de peso inducida por cáncer y/o la caquexia por cáncer y tratar el cáncer, los presentes inventores también muestran sorprendentemente que la proteína GDF-15 humana puede seleccionarse como diana por los anticuerpos de la invención de manera que tanto se inhibe el crecimiento de cáncer como se trata la pérdida de peso inducida por cáncer y la caquexia por cáncer. Se espera que los mismos mecanismos de inhibición del crecimiento de cáncer y el tratamiento de la pérdida de peso inducida por cáncer y la caquexia por cáncer sean aplicables a un gran número de cánceres que sobreexpresan el GDF-15 humano, incluidos los cánceres que se enumeran a

continuación.

Los anticuerpos monoclonales y partes de unión a antígeno de los mismos según la invención derivan de un anticuerpo anti-GDF-15 murino, AcM-B1-23, que se describió en el documento WO 2014/049087 y se depositó ante la Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) con el número de registro DSM ACC3142 en virtud del Tratado de Budapest. Los anticuerpos anti-GDF-15 humano AcM-B1-23 según la invención pueden generarse reemplazando dominios constantes del anticuerpo murino AcM-B1-23 por los dominios constantes de un anticuerpo IgG1 humano.

10 Sorprendentemente, se observó que un anticuerpo B1-23 químérico y humanizado no mostró tendencia a agregarse. Se espera que las propiedades de estos anticuerpos según la invención aumenten la biodisponibilidad de estos anticuerpos y sean ventajosos para la formulación clínica de estos anticuerpos.

Por tanto, la presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal tal como se define en la reivindicación 1.

15 La presente invención también se refiere a un anticuerpo monoclonal capaz de unirse a GDF-15 humano, o una parte de unión a antígeno del mismo, para su uso en un método para tratar caquexia por cáncer en un mamífero, tal como se define en la reivindicación 13.

20 Además, la invención se refiere a un anticuerpo o una parte de unión a antígeno del mismo según la invención para su uso en un método para tratar cáncer en un mamífero. El método comprende administrar el anticuerpo o la parte de unión a antígeno del mismo a dicho mamífero.

25 Además, la invención se refiere a un anticuerpo o una parte de unión a antígeno del mismo según la invención para su uso en un método para tratar caquexia por cáncer en un mamífero. El método comprende administrar el anticuerpo o la parte de unión a antígeno del mismo a dicho mamífero.

Adicionalmente, la invención se refiere a un kit tal como se define en la reivindicación 10.

30 La invención también se refiere a un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para el anticuerpo o la parte de unión a antígeno del mismo según la invención.

Además, la invención se refiere a una línea celular capaz de producir un anticuerpo o una parte de unión a antígeno del mismo según la invención.

35 Por tanto, al proporcionar anticuerpos monoclonales contra GDF-15 humano, la presente invención proporciona medios para el tratamiento de caquexia por cáncer y un inhibidor del crecimiento de cáncer que satisface las necesidades definidas anteriormente en la técnica.

40 Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Expresión de NKG2D en células NK después del tratamiento con o sin GDF-15. La expresión en la superficie celular de NKG2D se determinó en células NK después del tratamiento con las citocinas indicadas en presencia o ausencia del anticuerpo anti-GDF-15 AcM B1-23. La figura muestra intensidades de fluorescencia específicas determinadas mediante citometría de flujo, cuantificadas en relación con un anticuerpo de control inespecífico.

Figura 2: Fosforilación de Akt en la línea celular de carcinoma de ovario SK-OV-3. Con el fin de cuantificar la inmunotransferencia de tipo Western para la línea celular de carcinoma de ovario SK-OV-3, se calculó la razón de Akt fosforilada con respecto a la cantidad total de Akt y se normalizó con respecto al control sin tratar.

Figura 3: Fosforilación de JNK1/2 en células inmunitarias. Para cuantificar la inmunotransferencia de tipo Western, se calculó y normalizó la razón de JNK1/2 fosforilada con respecto a la cantidad total de JNK para el control sin tratar.

55 Figura 4: Un efecto antitumoral de B1-23 murino *in vivo*. Se usaron ratones desnudos Balb/c^{nu/nu} en un entorno de xenoinjerto con la línea celular de melanoma UACC-257. El tamaño del tumor de la cohorte de animales tratados con B1-23 (cuadrados en blanco) disminuyó significativamente, en comparación con el grupo de control de PBS (círculos negros rellenos). La significación se definió como $p < 0,05$ según se evalúa mediante la prueba de rangos logarítmicos de Wilcoxon.

60 Figura 5: Tratamiento de caquexia por cáncer con anticuerpos anti-GDF-15. La figura muestra una comparación del peso corporal medio de todos los ratones desnudos Balb/c^{nu/nu} tratados, a los que se inocularon células UACC-257. Los cambios del peso corporal se representan en porcentaje en comparación con el peso corporal inicial en el día 0, durante un periodo de 38 días.

Figura 6: Tinción de Coomassie de anticuerpos usados en el estudio n.º 140123.

Figura 7: Solubilidad mejorada del anticuerpo químérico y humanizado a pH fisiológico.

5 **Descripción detallada de la invención**

Definiciones

10 A menos que se definan de otro modo a continuación, los términos usados en la presente invención se entenderán según su significado común conocido por el experto en la técnica.

15 El término "anticuerpo" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier anticuerpo funcional que es capaz de unirse de manera específica al antígeno de interés, tal como se expone de manera general en el capítulo 7 de Paul, W.E. (Ed.): *Fundamental Immunology* 2^a ed. Raven Press, Ltd., Nueva York 1989. Sin limitación particular, el término "anticuerpo" abarca anticuerpos de cualquier especie fuente apropiada, incluyendo gallina y mamíferos tales como ratón, cabra, primate no humano y humano. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. El anticuerpo es un anticuerpo monoclonal que puede prepararse mediante métodos bien conocidos en la técnica. El término "anticuerpo" abarca un anticuerpo de isotipo IgG-1, -2, -3 o -4, IgE, IgA, IgM o IgD. El término "anticuerpo" abarca anticuerpos monoméricos (tales como IgD, IgE, IgG) o anticuerpos oligoméricos (tales como IgA o IgM). El término "anticuerpo" también abarca, sin limitaciones particulares, anticuerpos aislados y anticuerpos modificados, tales como anticuerpos modificados por ingeniería genética, por ejemplo anticuerpos químéricos.

20 La nomenclatura de los dominios de anticuerpos sigue los términos conocidos en la técnica. Cada monómero de un anticuerpo comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras, tal como se conoce generalmente en la técnica. De estas, cada cadena pesada y ligera comprende un dominio variable (denominado V_H para la cadena pesada y V_L para la cadena ligera), que es importante para la unión al antígeno. Estos dominios variables de cadena pesada y ligera comprenden (en un orden del extremo N-terminal al C-terminal) las regiones FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4 (FR, región de entramado; CDR, región determinante de complementariedad que también se conoce como región hipervariable). La identificación y asignación de las regiones de anticuerpo mencionadas anteriormente dentro de la secuencia de anticuerpo es generalmente según Kabat *et al.* (*Sequences of proteins of immunological interest*, U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. 1983) o Chothia *et al.* (*Conformations of immunoglobulin hypervariable regions*. *Nature*. 1989 21-28 de diciembre; 342(6252):877-83.), o puede realizarse usando el software IMGT/V-QUEST descrito en Giudicelli *et al.* (IMGT/V-QUEST, an integrated software program for immunoglobulin and T cell receptor V-J and V-D-J rearrangement analysis. *Nucleic Acids Res.* 2004 1 de julio; 32 (problema del servidor web): W435-40.). Preferiblemente, las regiones de anticuerpo indicadas anteriormente se identifican y asignan usando el software IMGT/V-QUEST.

25 40 Un "anticuerpo monoclonal" es un anticuerpo de una población de anticuerpos esencialmente homogénea, en el que los anticuerpos tienen una secuencia sustancialmente idéntica (es decir, son idénticos excepto por una fracción menor de anticuerpos que contienen modificaciones de secuencia que se producen de manera natural, tales como modificaciones de aminoácidos en sus extremos N y C-terminal). A diferencia de los anticuerpos policlonales que contienen una mezcla de diferentes anticuerpos dirigidos a numerosos epitopos, los anticuerpos monoclonales se dirigen al mismo epitopo y, por tanto, son muy específicos. El término "anticuerpo monoclonal" incluye (pero no se limita a) anticuerpos que se obtienen a partir de una población de células monoclonales derivada de un clon celular individual, como por ejemplo los anticuerpos generados mediante el método de hibridoma descrito en Kohler y Milstein (*Nature*, 7 de agosto de 1975; 256(5517):495-7) o Harlow y Lane (*"Antibodies: A Laboratory Manual"* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York 1988). También puede obtenerse un anticuerpo monoclonal a partir de otros métodos adecuados, incluyendo técnicas de presentación en fagos tales como las descritas en Clackson *et al.* (*Nature*. 15 de agosto de 1991; 352(6336):624-8) o Marks *et al.* (*J Mol Biol.* 5 de diciembre de 1991; 222(3):581-97). Un anticuerpo monoclonal puede ser un anticuerpo que se ha optimizado para propiedades de unión a antígeno tales como valores de K_d disminuidos, cinética de asociación y disociación optimizada mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los valores de K_d pueden optimizarse mediante métodos de presentación que incluyen la presentación en fagos, lo que da como resultado anticuerpos monoclonales madurados por afinidad. El término "anticuerpo monoclonal" no se limita a secuencias de anticuerpo de especies de origen particulares o de una única especie de origen. Así, el significado del término "anticuerpo monoclonal" abarca anticuerpos monoclonales químéricos tales como anticuerpos monoclonales humanizados.

30 45 50 55 60 65 Los "anticuerpos humanizados" son anticuerpos que contienen secuencias humanas y una parte menor de secuencias no humanas que confieren especificidad de unión a un antígeno de interés (por ejemplo, GDF-15 humano). Normalmente, se generan anticuerpos humanizados reemplazando secuencias de región hipervariable de un anticuerpo receptor humano por secuencias de región hipervariable de un anticuerpo donador no humano (por ejemplo, un anticuerpo donador de ratón, conejo o rata) que se une a un antígeno de interés (por ejemplo, GDF-15 humano). En algunos casos, también pueden reemplazarse secuencias de región de entramado del anticuerpo receptor por las secuencias correspondientes del anticuerpo donador. Además de las secuencias derivadas de los anticuerpos donadores y aceptores, un "anticuerpo humanizado" puede o bien contener otros residuos o secuencias

(adicionales o sustitutos) o bien no contenerlos. Tales otros residuos o secuencias pueden servir para mejorar adicionalmente las propiedades de los anticuerpos, tales como propiedades de unión (por ejemplo, para disminuir los valores de K_d) y/o propiedades inmunogénicas (por ejemplo, para disminuir la antigenicidad en humanos). En la técnica se conocen ejemplos no limitativos de métodos para generar anticuerpos humanizados, por ejemplo a partir de Riechmann *et al.* (Nature. 24 de marzo de 1988; 332(6162):323-7) o Jones *et al.* (Nature. 29 de mayo-4 de junio de 1986; 321(6069):522-5).

El término "anticuerpo humano" se refiere a un anticuerpo que contiene secuencias de dominios variables y constantes humanos. Esta definición abarca anticuerpos que tienen secuencias humanas que portan sustituciones o modificaciones de aminoácidos individuales que pueden servir para mejorar adicionalmente las propiedades de los anticuerpos, tales como las propiedades de unión (por ejemplo, para disminuir los valores de K_d) y/o propiedades inmunogénicas (por ejemplo, para disminuir la antigenicidad en humanos). El término "anticuerpo humano" excluye los anticuerpos humanizados en los que una parte de secuencias no humanas confiere especificidad de unión a un antígeno de interés.

Una "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo tal como se usa en el presente documento se refiere a una parte de un anticuerpo que conserva la capacidad del anticuerpo de unirse de manera específica al antígeno (por ejemplo, GDF-15), es decir, la "parte de unión a antígeno" es capaz de competir con el anticuerpo por la unión específica al antígeno. La "parte de unión a antígeno" puede contener uno o más fragmentos del anticuerpo. Sin limitación particular, puede producirse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica, incluyendo métodos de ADN recombinante y preparación mediante fragmentación química o enzimática de anticuerpos. Las partes de unión a antígeno pueden ser fragmentos Fab, fragmentos F (ab'), fragmentos F(ab')₂, anticuerpos de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de dominio único, diacuerpos o cual(es)quier otra(s) parte(s) del anticuerpo que permita(n) conservar la unión al antígeno.

Un "anticuerpo" (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) o una "parte de unión a antígeno" pueden haberse derivatizado o ligado a una molécula diferente. Por ejemplo, las moléculas que pueden ligarse al anticuerpo son otras proteínas (por ejemplo, otros anticuerpos), un marcador molecular (por ejemplo, una molécula fluorescente, luminiscente, coloreada o radiactiva), un agente farmacéutico y/o tóxico. El anticuerpo o la parte de unión a antígeno puede ligarse directamente (por ejemplo, en forma de una fusión entre dos proteínas), o mediante una molécula ligadora (por ejemplo, cualquier tipo adecuado de ligador químico conocido en la técnica).

Tal como se usa en el presente documento, los términos "unión" o "unir" se refieren a la unión específica al antígeno de interés (por ejemplo, GDF-15 humano). Preferiblemente, el valor de K_d es menor de 100 nM, más preferiblemente menor de 50 nM, todavía más preferiblemente menor de 10 nM, todavía más preferiblemente menor de 5 nM y lo más preferiblemente menor de 2 nM.

El término "epítopo", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una pequeña parte de un antígeno que forma el sitio de unión para un anticuerpo.

En el contexto de la presente invención, la unión o unión competitiva de anticuerpos o sus partes de unión a antígeno al antígeno de interés (por ejemplo, GDF-15 humano) se mide usando mediciones de resonancia de plasmón superficial como un ensayo convencional de referencia, tal como se describe a continuación.

Los términos " K_D " o "valor de K_D " se refiere a la constante de disociación de equilibrio tal como se conoce en la técnica. En el contexto de la presente invención, estos términos se refieren a la constante de disociación de equilibrio de un anticuerpo con respecto a un antígeno particular de interés (por ejemplo, GDF-15 humano). La constante de disociación de equilibrio es una medida de la propensión de un complejo (por ejemplo, un complejo antígeno-anticuerpo) a disociarse reversiblemente en sus componentes (por ejemplo, el antígeno y el anticuerpo). Para los anticuerpos según la invención, los valores de K_D (tales como aquellos para el antígeno GDF-15 humano) se determinan generalmente usando mediciones de resonancia de plasmón superficial tal como se describe a continuación.

El término "crecimiento de cáncer" tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier crecimiento medible del cáncer. Para los cánceres que forman tumores sólidos, el "crecimiento de cáncer" se refiere a un aumento medible del volumen tumoral a lo largo del tiempo. Si el cáncer ha formado sólo un tumor, el "crecimiento de cáncer" se refiere sólo al aumento del volumen del tumor único. Si el cáncer ha formado múltiples tumores, tales como metástasis, el "crecimiento de cáncer" se refiere al aumento del volumen de todos los tumores medibles. Para los tumores sólidos, puede medirse el volumen tumoral mediante cualquier método conocido en la técnica, incluida la obtención de imágenes mediante resonancia magnética y la tomografía computarizada (TAC).

Para las leucemias que se caracterizan por la presencia de células cancerosas del sistema sanguíneo en la sangre, el "crecimiento de cáncer" se refiere a un aumento medible del número de células cancerosas por volumen de sangre. Para llevar a cabo tales mediciones, las células cancerosas pueden identificarse a partir de muestras de sangre usando cualquier método conocido en la técnica, incluidas las mediciones de morfología celular, o la tinción de proteínas marcadoras de células tumorales tales como proteínas de la superficie celular marcadoras de tumores,

por ejemplo mediante tinción con anticuerpos específicos, y pueden contarse las células cancerosas.

Los términos tales como "inhibición del crecimiento de cáncer" tal como se usa en el presente documento se refieren a una inhibición medible del crecimiento de cáncer en pacientes tratados con el anticuerpo. Preferiblemente, la inhibición es estadísticamente significativa. La inhibición del crecimiento de cáncer puede evaluarse comparando el crecimiento de cáncer en un grupo de pacientes tratados según la presente invención con un grupo de control de pacientes sin tratar, o comparando un grupo de pacientes que reciben un tratamiento convencional contra el cáncer de la técnica más un tratamiento según la invención con un grupo de control de pacientes que sólo reciben un tratamiento contra el cáncer convencional de la técnica. Tales estudios para evaluar la inhibición del crecimiento de cáncer están diseñados según normas aceptadas para estudios clínicos, por ejemplo estudios aleatorizados, doble ciego con suficiente poder estadístico. El término "inhibir el crecimiento de cáncer" incluye una inhibición del crecimiento de cáncer en la que el crecimiento de cáncer se inhibe parcialmente (es decir, en la que el crecimiento de cáncer en el paciente se retarda en comparación con el grupo de control de pacientes), una inhibición en la que el crecimiento de cáncer se inhibe por completo (es decir, en la que se detiene el crecimiento de cáncer en el paciente), y una inhibición en la que se revierte el crecimiento de cáncer (es decir, el cáncer se reduce).

Un "anticuerpo aislado" tal como se usa en el presente documento es un anticuerpo que se ha identificado y separado de la mayoría de los componentes (en peso) de su entorno fuente, por ejemplo de los componentes de un cultivo celular de hibridoma o un cultivo celular diferente que se usó para su producción (por ejemplo, células productoras tales como células CHO que expresan de manera recombinante el anticuerpo). La separación se realiza de tal manera que se retiren suficientemente los componentes que de otro modo podrían interferir con la idoneidad del anticuerpo contra las aplicaciones deseadas (por ejemplo, con un uso terapéutico del anticuerpo anti-GDF-15 humano según la invención). Los métodos para preparar anticuerpos aislados se conocen en la técnica e incluyen cromatografía de proteína A, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, filtración con retención viral y ultrafiltración. Preferiblemente, la preparación de anticuerpos aislados es pura en al menos el 70% (p/p), más preferiblemente pura en al menos el 80% (p/p), todavía más preferiblemente pura en al menos el 90% (p/p), todavía más preferiblemente pura en al menos el 95% (p/p), y lo más preferiblemente pura en al menos el 99% (p/p), medida usando el ensayo de proteínas de Lowry.

Un "diacuerpo", tal como se usa en el presente documento, es una pequeña parte de anticuerpo de unión a antígeno bivalente que comprende un dominio variable de cadena pesada ligado a un dominio variable de cadena ligera en la misma cadena de polipéptido ligada mediante un ligador peptídico que es demasiado corto como para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Esto da como resultado el apareamiento con los dominios complementarios de otra cadena y el ensamblaje de una molécula dimérica con dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos pueden ser bivalentes y monoespecíficos (tales como los diacuerpos con dos sitios de unión a antígeno para GDF-15 humano), o pueden ser bivalentes y biespecíficos (por ejemplo, diacuerpos con dos sitios de unión a antígeno, siendo uno un sitio de unión para GDF-15 humano, y siendo el otro un sitio de unión para un antígeno diferente). Puede hallarse una descripción detallada de los diacuerpos en Holliger P *et al.* ("Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments". Proc Natl Acad Sci U S A. 15 de julio de 1993; 90(14):6444-8.).

Un "anticuerpo de dominio único" (que también se denomina "Nanobody™") tal como se usa en el presente documento es un fragmento de anticuerpo que consiste en un único dominio de anticuerpo monomérico variable. Las estructuras y los métodos para producir anticuerpos de dominio único se conocen en la técnica, por ejemplo a partir de Holt LJ *et al.* ("Domain antibodies: proteins for therapy". Trends Biotechnol. nov. de 2003; 21(11):484-90.), Saerens D *et al.* ("Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics". Curr Opin Pharmacol. oct. de 2008; 8(5):600-8. publicación electrónica de 22 de agosto de 2008), y Arbabi Ghahroudi M *et al.* ("Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies". FEBS Lett. 1997, 15 de septiembre; 414 (3): 521-6.).

El término "mayor" tal como se usa en el presente documento significa que un valor (por ejemplo, un nivel de GDF-15) en una muestra de paciente es mayor que un valor en una muestra de control o grupo de muestras de control correspondiente. Preferiblemente, la diferencia es estadísticamente significativa.

El término "niveles elevados de GDF-15" tal como se usa en el presente documento significa que el paciente humano tiene mayores niveles de GDF-15 en suero sanguíneo antes de la administración del anticuerpo o de la parte de unión a antígeno del mismo según la invención, en comparación con la mediana de los niveles de GDF-15 en sueros sanguíneos de individuos de control humanos sanos como referencia.

Una mediana de referencia preferida para el nivel de GDF-15 en sueros sanguíneos de individuos de control humanos sanos es <0,8 ng/ml. El intervalo esperado es de entre 0,2 ng/ml y 1,2 ng/ml en controles humanos sanos (Referencia: Tanno T *et al.*: "Growth differentiation factor 15 in erythroid health and disease". Curr Opin Hematol. mayo de 2010; 17(3):184-190.).

Preferiblemente, los niveles son 1,2 veces mayores, más preferiblemente 1,5 veces mayores, todavía más preferiblemente 2 veces mayores y lo más preferiblemente 5 veces mayores.

El término "antes de la administración" tal como se usa en el presente documento significa el periodo de tiempo inmediatamente antes de la administración del anticuerpo o fragmento del mismo según la invención. Preferiblemente, el término "antes de la administración" significa un periodo de 30 días inmediatamente antes de la administración; lo más preferiblemente un periodo de una semana inmediatamente antes de la administración.

- 5 Los términos "significativo", "significativamente", etc., tal como se usan en el presente documento, se refieren a una diferencia estadísticamente significativa entre valores.
- 10 Los términos "cáncer" y "célula cancerosa" se usan en el presente documento según su significado común en la técnica (véase, por ejemplo, Weinberg R. *et al.*: *The Biology of Cancer*. Garland Science: Nueva York 2006. 850p.).
- 15 El término "pérdida de peso inducida por cáncer" se usa en el presente documento según su significado común en la técnica. La pérdida de peso inducida por cáncer se observa con frecuencia como un efecto adverso en las personas que tienen cáncer (véase, por ejemplo, Fearon K. *et al.*: *Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus*. *Lancet Oncol.* mayo de 2011; 12(5):489-95.; Tisdale MJ.: *Mechanisms of cancer cachexia*. *Physiol Rev.* abr. de 2009; 89(2):381-410.). El término "pérdida de peso inducida por cáncer" se refiere a la pérdida de peso corporal inducida por cáncer. Una pérdida de peso corporal adicional además de la pérdida de peso inducida por cáncer, por ejemplo la pérdida de peso corporal inducida por tratamientos contra el cáncer, tales como cirugía, quimioterapia y radioterapia, también puede producirse en individuos que tienen cáncer. Se entiende que el significado del término "pérdida de peso inducida por cáncer" no incluye esta pérdida de peso corporal adicional. Sin embargo, esto no excluye la posibilidad de que los anticuerpos de la presente invención, además de sus efectos sobre la pérdida de peso inducida por cáncer y el crecimiento de cáncer, puedan tener efectos beneficiosos contra tal pérdida de peso corporal adicional, por ejemplo al revertir o revertir parcialmente tal pérdida de peso adicional, o al prevenir o prevenir parcialmente tal pérdida de peso corporal adicional.
- 20
- 25 El peso corporal puede medirse fácilmente mediante pesada, y el peso corporal se expresa normalmente en unidades de masa, tales como kg.
- 30 El término "caquexia por cáncer" se usa en el presente documento según su significado común en la técnica (véase, por ejemplo, Fearon K. *et al.*: *Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus*. *Lancet Oncol.* mayo de 2011; 12(5):489-95.; Tisdale MJ.: *Mechanisms of cancer cachexia*. *Physiol Rev.* abr. de 2009; 89(2):381-410.). El síntoma más común de la caquexia por cáncer es la pérdida de peso inducida por cáncer. Por tanto, según una definición, la caquexia por cáncer se caracteriza por una pérdida continua de masa del músculo esquelético (con o sin pérdida de masa adiposa) que la nutrición convencional no puede revertir por completo. En pacientes humanos, la caquexia por cáncer puede definirse mediante una pérdida de peso de más del 5% durante los últimos 6 meses, o mediante un índice de masa corporal de menos de 20 g/m² y cualquier grado de pérdida de peso continua que sea mayor del 2%, o mediante sarcopenia (es decir, pérdida degenerativa de masa muscular) y una pérdida de peso continua que sea mayor del 2% (véase, Fearon K. *et al.*: *Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus*. *Lancet Oncol.* mayo de 2011; 12(5):489-95.). Un síntoma adicional de la caquexia por cáncer puede ser una reducción del tejido adiposo.
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- Con respecto a la caquexia por cáncer, un "tratamiento" según la presente invención puede ser un tratamiento para prevenir y/o un tratamiento para inhibir o revertir la caquexia por cáncer. Normalmente, un tratamiento para prevenir la caquexia por cáncer es un tratamiento que se administra de manera profiláctica en un estadio de la enfermedad oncológica en el que todavía no se ha producido caquexia por cáncer. Un tratamiento para inhibir la caquexia por cáncer es normalmente un tratamiento que se administra en un estadio de la enfermedad oncológica en el que se ha producido algo de caquexia por cáncer, para inhibir una progresión adicional de la caquexia por cáncer. Un tratamiento para revertir la caquexia por cáncer es normalmente un tratamiento que se inicia en un estadio del cáncer en el que se ha producido algo de caquexia por cáncer, y que revierte la caquexia por cáncer. El efecto del tratamiento puede ser un efecto parcial, es decir, una prevención parcial, una inhibición parcial o una reversión parcial de la caquexia por cáncer, o un efecto completo, es decir, una prevención completa, una inhibición completa o una reversión completa de la caquexia por cáncer. Preferiblemente, según la presente invención, el efecto del tratamiento es una prevención completa, una inhibición completa o una reversión completa de la caquexia por cáncer. Más preferiblemente, el efecto del tratamiento según la presente invención es una prevención completa o una reversión completa de la caquexia por cáncer.
- 60
- 65
- Tal como se usa en el presente documento, el término "(por) completo" en relación con un tratamiento de caquexia por cáncer según la invención significa que en caso de un tratamiento para prevenir, no se produce caquexia por cáncer en el individuo tratado durante y/o tras el tratamiento. En el caso de un tratamiento para inhibir la caquexia por cáncer, el término "(por) completo" significa que no se produce una progresión adicional de la caquexia por cáncer en el individuo tratado durante y/o tras el tratamiento. En caso de un tratamiento para revertir la caquexia por cáncer, el término "(por) completo" significa que durante o tras el tratamiento, la caquexia por cáncer se revierte por completo, de modo que no esté presente caquexia por cáncer en el individuo tratado.
- Con respecto a estos efectos del tratamiento según la invención, el término "sin caquexia por cáncer" significa que mediante el uso de métodos convencionales para mediciones y para diagnóstico conocidos en la técnica, no puede

detectarse caquexia por cáncer. Asimismo, el término "sin progresión adicional de la caquexia por cáncer" significa que mediante el uso de métodos convencionales para mediciones y para diagnóstico conocidos en la técnica, no puede detectarse progresión adicional de la caquexia por cáncer. Los métodos conocidos en la técnica y a los que se hace referencia en el presente documento se describen, por ejemplo, en Fearon KC.: Cancer cachexia: developing multimodal therapy for a multidimensional problem. Eur J Cancer. mayo de 2008; 44(8):1124-32; Fearon K. et al.: Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. Lancet Oncol. mayo de 2011; 12(5):489-95. o Tisdale MJ.: Mechanisms of cancer cachexia. Physiol Rev. abr. de 2009; 89(2):381-410.

Además de prevenir o revertir por completo la caquexia por cáncer, los métodos de tratamiento divulgados en el presente documento y los productos para su uso en estos métodos según la invención pueden aumentar el peso corporal del mamífero tratado en comparación con su peso corporal antes de la aparición de la caquexia por cáncer. Tal como se usa en el presente documento, el término "antes de la aparición de la caquexia por cáncer" significa un punto en el tiempo durante el transcurso de la enfermedad oncológica, después del cual la caquexia por cáncer se vuelve medible mediante los métodos conocidos en la técnica, tales como los métodos a los que se hizo referencia anteriormente.

Preferiblemente, los efectos definidos anteriormente del tratamiento para caquexia por cáncer según la invención son estadísticamente significativos cuando se evalúan frente a un grupo de control adecuado, mientras que los pacientes individuales que se tratan no mostrarán una caquexia significativa.

Según la presente invención, cada aparición del término "que comprende" puede sustituirse opcionalmente por el término "que consiste en".

Métodos y técnicas

En general, a menos que se definan de otro modo contrario en el presente documento, los métodos usados en la presente invención (por ejemplo, métodos de clonación o métodos relacionados con anticuerpos) se realizan según procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo los procedimientos descritos en Sambrook et al. ("Molecular Cloning: A Laboratory Manual.", 2^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York 1989), Ausubel et al. ("Current Protocols in Molecular Biology". Greene Publishing Associates and Wiley Interscience; Nueva York 1992) y Harlow y Lane ("Antibodies: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York 1988).

El peso molecular se mide mediante métodos conocidos en la técnica, tales como la espectrometría de masas. Se expresa en dalton (Da) o kilodalton (kDa).

La unión de anticuerpos monoclonales anti-GDF-15 humano según la invención se evalúa generalmente empleando mediciones de resonancia de plasmón superficial usando un sistema Bio-Rad® ProteOn™ XPR36 y chips de sensor Bio-Rad® GLC tal como se describe para el AcM-B1-23 anti-GDF-15 humano en el ejemplo 1.

Las alineaciones de secuencias de secuencias según la invención se realizan usando el algoritmo BLAST (véase Altschul et al. (1990) "Basic local alignment search tool." Journal of Molecular Biology 215. págs. 403-410.; Altschul et al.: (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.). Preferiblemente, se usan los siguientes parámetros: secuencias objetivo máx. 10; tamaño de palabra 3; matriz BLOSUM 62; costes por hueco: existencia 11, extensión 1; ajuste condicional de matriz de puntuación de composición. Por tanto, cuando se usa en relación con secuencias, términos como "identidad" o "idéntico" se refieren al valor de identidad obtenido mediante el uso del algoritmo BLAST.

Los anticuerpos monoclonales según la invención pueden producirse mediante cualquier método conocido en la técnica, incluidos entre otros, los métodos mencionados en Siegel DL ("Recombinant monoclonal antibody technology". Transfus Clin Biol. enero de 2002; 9(1):15-22.). En una realización preferida, un anticuerpo según la invención la produce la línea celular de hibridoma B1-23 depositada ante la Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) con el número de registro DSM ACC3142 en virtud del Tratado de Budapest. El depósito se presentó el 29 de septiembre de 2011.

La proliferación celular puede medirse mediante métodos adecuados conocidos en la técnica, incluyendo (pero sin limitarse a) microscopía óptica, ensayos metabólicos como los que miden el potencial redox mitocondrial (por ejemplo, MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio); tinción con resazurina, que también se conoce como ensayo con Alamar Blue®), tinción de biomarcadores de proliferación endógenos conocidos (por ejemplo, Ki-67) y métodos que miden la síntesis de ADN celular (por ejemplo, ensayos de incorporación de BrdU y [³H]-timidina).

La inmunosupresión puede medirse mediante métodos adecuados conocidos en la técnica, incluyendo (pero sin limitarse a) proliferación de células inmunitarias, secreción de citocinas, tinción de citocinas intracelulares mediante citometría de flujo, medición de citocinas mediante qRT-PCR, lisis de células diana redirigidas, ensayos de desgranulación o citotoxicidad adicional, regulación por disminución de la activación de receptores de células

inmunitarias (tales como NKG2D), regulación por incremento de receptores inhibidores de células inmunitarias, formación de sinapsis inmunológica, infiltración de células inmunitarias. Para que se aplique el término inmunosupresión, debe poderse medir un efecto en al menos uno de estos o en cualquier otro ensayo adecuado. La falta de efecto en una prueba específica no implica una ausencia general de inmunosupresión.

5 Los niveles de GDF-15 humano pueden medirse mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo mediciones de los niveles de ARNm de GDF-15 mediante métodos incluyendo (pero sin limitarse a) PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) para ARNm de GDF-15 humano usando cebadores específicos para hibridación *in situ* de ARNm de GDF-15 humano con sondas específicas para GDF-15 humano, métodos de secuenciación profunda de ARNm; e incluyendo mediciones de los niveles de proteína GDF-15 mediante métodos, incluyendo (pero sin limitarse a) espectrometría de masas para proteínas o péptidos derivados de GDF-15 humano, inmunotransferencia de tipo Western usando anticuerpos específicos contra GDF-15 humano, citometría de flujo usando anticuerpos específicos contra GDF humano-15, pruebas en tiras usando anticuerpos específicos contra GDF-15 humano, o inmunocitoquímica usando anticuerpos específicos contra GDF-15 humano. Para tales métodos que usan anticuerpos específicos contra GDF-15 humano, se prefieren los anticuerpos anti-GDF-15 humano de la presente invención, y el anticuerpo producido por la línea celular de hibridoma B1-23 depositado ante la Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) con el número de registro DSM ACC3142 es el más preferido.

Realizaciones de la invención

20 Tal como se describió anteriormente, los inventores muestran que la proteína GDF-15 humana puede seleccionarse como diana por un anticuerpo según la invención de manera que la caquexia por cáncer y la pérdida de peso inducida por cáncer puedan tratarse y que también se inhiba el crecimiento de cáncer.

25 Cuando se tiene en cuenta la presente invención, queda claro que los anticuerpos anti-GDF-15 conocidos a partir de los documentos WO 2005/099746, WO 2009/021293 y Johnen H *et al.*, *Nature Medicine*, 2007 sólo inhiben uno de los efectos del GDF-15 humano (es decir, la pérdida de peso inducida por cáncer), pero no inhiben otros efectos del GDF-15 humano, tales como los relacionados con el crecimiento de cáncer. En vista de la presente invención, una posible explicación para este fallo es que los anticuerpos conocidos a partir de los documentos anteriores sólo 30 pueden interferir en el transporte de GDF-15 humano a través de la barrera hematoencefálica (formando un gran complejo que no puede transportarse a través de la barrera hematoencefálica), pero son incapaces de unirse a GDF-15 humano de una manera que hace generalmente que sea incapaz de interaccionar con su receptor (por ejemplo, un receptor que reside en las células fuera del cerebro). Además, y de manera diferente de los anticuerpos de la presente invención, los anticuerpos anti-GDF-15 conocidos a partir de los documentos WO 2005/099746, WO 35 2009/021293 y Johnen H *et al.*, *Nature Medicine*, 2007 no condujeron a un aumento detectable del peso corporal de los mamíferos en comparación con su peso corporal antes de la aparición de la caquexia por cáncer.

Por consiguiente, los efectos de los anticuerpos para su uso según la invención son inesperados a la vista de la técnica.

40 Se espera que las siguientes propiedades de los anticuerpos de la presente invención contribuyan a su capacidad de inhibir los efectos del GDF-15 humano de manera más completa, incluido el tratamiento de caquexia y la inhibición del crecimiento de cáncer:

Amplia especificidad de unión a formas de GDF-15 humano

45 Los anticuerpos de la presente invención son capaces de unirse a GDF-15 humano recombinante maduro (representado por SEQ ID No: 8) y, por tanto, pueden unirse a GDF-15 humano activo, totalmente procesado (maduro).

50 Además, al realizar experimentos de tinción con el anticuerpo AcM-B1-23 murino en células humanas, los inventores muestran que el anticuerpo AcM-B1-23 es capaz de unirse al precursor de GDF-15 humano en células humanas.

55 Por tanto, se espera que la unión y los efectos de los anticuerpos según la presente invención, en particular la inhibición del crecimiento de cáncer, no se limiten generalmente a los efectos sobre una forma particular de GDF-15 humano.

60 En cuanto a los efectos del GDF-15 humano sobre la caquexia por cáncer, estos efectos pueden estar provocados por un subconjunto de formas de GDF-15 humano, por ejemplo, para formas solubles de GDF-15 humano, que son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica. Tal como se ejemplifica en los ejemplos de la presente invención, todos los anticuerpos anti-GDF-15 sometidos a prueba según la invención pueden usarse para tratar caquexia inducida por cáncer. Por tanto, los anticuerpos según la presente invención pueden interferir en las formas de GDF-15 humano que son responsables de la caquexia por cáncer.

Alta afinidad de unión

Los anticuerpos y partes de unión a antígeno de los mismos según la invención tienen una alta afinidad de unión, tales como lo demuestra el anticuerpo AcM-B1-23 que tiene una constante de disociación de equilibrio de aproximadamente 790 pM para el GDF-15 humano recombinante. Especialmente, tales valores de afinidad son superiores a la mayoría de los anticuerpos terapéuticos existentes, por ejemplo al anticuerpo terapéutico rituximab que tiene una constante de disociación de equilibrio de aproximadamente 8 nM.

La alta afinidad de unión garantizará que el anticuerpo contra GDF-15 humano según la invención se une de manera estable a GDF-15 humano, de modo que se inhiban efectivamente los efectos del GDF-15 humano, incluidos los efectos sobre el crecimiento de cáncer. Asimismo, se espera que la unión estable de los anticuerpos según la invención garantice que las formas de GDF-15 humano que provocan caquexia por cáncer no puedan llevar a cabo su función patológica. Esto puede deberse, por ejemplo, a un secuestro dependiente de anticuerpos de estas formas de GDF-15 humano de su posible sitio de acción en el cerebro. Tales unión y secuestro pueden tener lugar, por ejemplo, en el sitio del cáncer, o los anticuerpos según la invención pueden interferir en el transporte de GDF-15 humano a través de la barrera hematoencefálica.

Unión a un epítopo discontinuo o conformacional

Los anticuerpos y partes de unión a antígeno de los mismos según la invención se unen a un epítopo discontinuo o conformacional, tal como se demuestra a continuación para un anticuerpo AcM-B1-23 murino usado en el presente documento.

La unión de anticuerpos y partes de unión a antígeno de los mismos según la invención a un epítopo de GDF-15 discontinuo o conformacional puede ayudar a mantener el GDF-15 humano en una conformación específica. Esta especificidad de conformación puede ser ventajosa para mantener el GDF-15 en una forma que no puede liberarse del tumor, o que no puede atravesar la barrera hematoencefálica y provocar caquexia por cáncer en un posible sitio de acción en el cerebro. Además, tal unión a un epítopo de GDF-15 discontinuo o conformacional puede contribuir a la inhibición eficaz de los efectos del GDF-15 humano, incluidos los efectos sobre el crecimiento de cáncer, por ejemplo manteniendo el GDF-15 en una conformación que no puede interaccionar funcionalmente con su receptor.

Por tanto, la invención se refiere a las siguientes realizaciones:

A) Anticuerpos, vectores y líneas celulares.

Concretamente, la invención se refiere a un anticuerpo monoclonal tal como se define en la reivindicación 1.

En un aspecto preferido de esta realización, el dominio constante de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 29, o una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 98%, preferiblemente al menos el 99% a la misma, y el dominio constante de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 32, o una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 98%, preferiblemente al menos el 99% a la misma.

En otro aspecto preferido de esta realización, el dominio constante de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 85% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 29, y el dominio constante de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 32, o una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 85%, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, todavía más preferiblemente al menos el 98%, y lo más preferiblemente al menos el 99% a la misma.

En otro aspecto preferido de esta realización, el dominio constante de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 29, y el dominio constante de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 32, o una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 85%, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, todavía más preferiblemente al menos el 98%, y lo más preferiblemente al menos el 99% a la misma.

En otro aspecto preferido de esta realización, el dominio constante de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 95% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 29, y el dominio constante de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 32, o una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 85%, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, todavía más preferiblemente al menos el 98%, y lo más preferiblemente al menos el 99% a la misma.

En otro aspecto preferido de esta realización, el dominio constante de la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 98% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 29, y el dominio constante de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 32, o una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 85%, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, todavía más preferiblemente al menos el 98%, y lo más preferiblemente al menos el 99% a la misma.

En otro aspecto preferido de esta realización, el dominio constante de la cadena pesada comprende una secuencia

de aminoácidos idéntica en al menos el 99% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 29, y el dominio constante de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 32, o una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 85%, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, todavía más preferiblemente al menos el 98%, y lo más preferiblemente al menos el 99% a la misma.

5 En otro aspecto preferido de esta realización, el dominio constante de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 29, o una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 85%, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, todavía más preferiblemente al menos el 98%, y lo más preferiblemente al menos el 99% a la misma, y el dominio constante de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 85% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 32.

10 En otro aspecto preferido de esta realización, el dominio constante de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 29, o una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 85%, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, todavía más preferiblemente al menos el 98%, y lo más preferiblemente al menos el 99% a la misma, y el dominio constante de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 90% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 32.

15 En otro aspecto preferido de esta realización, el dominio constante de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 29, o una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 85%, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, todavía más preferiblemente al menos el 98%, y lo más preferiblemente al menos el 99% a la misma, y el dominio constante de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 95% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 32.

20 En otro aspecto preferido de esta realización, el dominio constante de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 29, o una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 85%, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, todavía más preferiblemente al menos el 98%, y lo más preferiblemente al menos el 99% a la misma, y el dominio constante de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 98% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 32.

25 En otro aspecto preferido de esta realización, el dominio constante de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 29, o una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 85%, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, todavía más preferiblemente al menos el 98%, y lo más preferiblemente al menos el 99% a la misma, y el dominio constante de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 99% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 32.

30 En otro aspecto preferido de esta realización, el dominio constante de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 29, o una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 85%, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, todavía más preferiblemente al menos el 98%, y lo más preferiblemente al menos el 99% a la misma, y el dominio constante de la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 99% a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 32.

35 En esta realización, lo más preferiblemente, el dominio constante de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 32, y el dominio constante de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 32.

40 En una realización según las realizaciones anteriores, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. Preferiblemente, todos los dominios variables del anticuerpo humanizado son dominios variables humanizados.

45 En una realización adicional según las realizaciones anteriores, el dominio variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal o la parte de unión a antígeno del mismo comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 28, o una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 95%, preferiblemente al menos el 98%, todavía más preferiblemente al menos el 99% a la misma, y el dominio variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal o la parte de unión a antígeno del mismo comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 31, o una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 95%, preferiblemente al menos el 98%, todavía más preferiblemente al menos el 99% a la misma. En el aspecto más preferido de esta realización, el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 28, y el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 31.

55 En una realización preferida adicional según las realizaciones anteriores, la cadena pesada del anticuerpo monoclonal o la parte de unión a antígeno del mismo comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 27, y la cadena ligera del anticuerpo monoclonal o la parte de unión a antígeno del mismo comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 30.

60 Preferiblemente, los anticuerpos de la invención capaces de unirse a GDF-15 humano o partes de unión a antígeno del mismo tienen una constante de disociación de equilibrio para el GDF-15 humano que es igual a o menor de 100 nM, menor de 20 nM, preferiblemente menor de 10 nM, más preferiblemente menor de 5 nM y lo más preferiblemente de entre 0,1 nM y 2 nM.

65 En otra realización de la invención, el anticuerpo capaz de unirse a GDF-15 humano o la parte de unión a antígeno del mismo se une al mismo epítopo de GDF-15 humano que el anticuerpo contra GDF-15 humano que puede obtenerse a partir de la línea celular B1-23 depositada ante la Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DMSZ) con el número de registro DSM ACC3142. Tal como se describe en el presente

- documento, la unión del anticuerpo a GDF-15 humano según la presente invención se evalúa mediante mediciones de resonancia de plasmón superficial como un método convencional de referencia, según los procedimientos descritos en el ejemplo 1. La unión al mismo epítopo en GDF-15 humano puede evaluarse de manera similar mediante experimentos de unión competitiva por resonancia de plasmón superficial del anticuerpo contra GDF-15 humano que puede obtenerse a partir de la línea celular B1-23 y el anticuerpo que se espera que se una al mismo epítopo de GDF-15 humano que el anticuerpo contra GDF-15 humano que puede obtenerse a partir de la línea celular B1-23.
- 5 En una realización preferida, el anticuerpo capaz de unirse a GDF-15 humano o la parte de unión a antígeno del mismo según la invención es un anticuerpo monoclonal humanizado o una parte de unión a antígeno del mismo. Para cualquier secuencia de anticuerpo no humano dada según la invención (es decir, una secuencia de anticuerpo donador), pueden generarse anticuerpos monoclonales humanizados anti-GDF-15 humano de la invención o partes de unión a antígeno de los mismos según técnicas conocidas en la técnica, tal como se describió anteriormente.
- 10 En una realización muy preferida, el anticuerpo monoclonal capaz de unirse a GDF-15 humano o la parte de unión a antígeno del mismo es un anticuerpo humanizado derivado del anticuerpo monoclonal capaz de unirse a GDF-15 humano que puede obtenerse a partir de la línea celular B1-23 depositada ante la Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DMSZ) con el número de registro DSM ACC3142, o una parte de unión a antígeno del mismo.
- 15 En otra realización de la invención según las realizaciones anteriores, el anticuerpo capaz de unirse a GDF-15 humano o la parte de unión a antígeno del mismo es un diacuerpo. En un aspecto de esta realización, el diacuerpo es bivalente y monoespecífico, con dos sitios de unión a antígeno idénticos para GDF-15 humano. En un segundo aspecto alternativo de esta realización, el diacuerpo es bivalente y biespecífico, con un sitio de unión a antígeno que es un sitio de unión para GDF-15 humano, y el otro sitio de unión a antígeno es un sitio de unión para un antígeno diferente. Ejemplos no limitativos para los diferentes antígenos según este segundo aspecto de esta realización son i) antígenos de superficie celular que se coexpresan con GDF-15 a altos niveles en el mismo cáncer (por ejemplo, a mayores niveles en comparación con una muestra de control del mismo paciente obtenida de una parte no cancerosa del tejido que es el tejido de origen del cáncer), y ii) antígenos de superficie celular en las células del sistema inmunitario que se conocen como antígenos útiles para el reclutamiento de células del sistema inmunitario al tumor.
- 20 En otra realización de la invención según las realizaciones anteriores, el anticuerpo capaz de unirse a GDF-15 humano o la parte de unión a antígeno del mismo es un diacuerpo. En un aspecto de esta realización, el diacuerpo es bivalente y monoespecífico, con dos sitios de unión a antígeno idénticos para GDF-15 humano. En un segundo aspecto alternativo de esta realización, el diacuerpo es bivalente y biespecífico, con un sitio de unión a antígeno que es un sitio de unión para GDF-15 humano, y el otro sitio de unión a antígeno es un sitio de unión para un antígeno diferente. Ejemplos no limitativos para los diferentes antígenos según este segundo aspecto de esta realización son i) antígenos de superficie celular que se coexpresan con GDF-15 a altos niveles en el mismo cáncer (por ejemplo, a mayores niveles en comparación con una muestra de control del mismo paciente obtenida de una parte no cancerosa del tejido que es el tejido de origen del cáncer), y ii) antígenos de superficie celular en las células del sistema inmunitario que se conocen como antígenos útiles para el reclutamiento de células del sistema inmunitario al tumor.
- 25 En otra realización de la invención según las realizaciones anteriores, el anticuerpo capaz de unirse a GDF-15 humano o la parte de unión a antígeno del mismo se liga a un fármaco. En aspectos no limitativos de esta realización, el fármaco puede ser un agente anticancerígeno conocido y/o una molécula inmunoestimuladora. Los agentes anticancerígenos conocidos incluyen agentes alquilantes tales como cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, mecloretamina, ciclofosfamida, clorambucilo e ifosfamida; antimetabolitos tales como azatioprina y mercaptopurina; alcaloides tales como alcaloides de la vinca (por ejemplo, vincristina, vinblastina, vinorelbina y vindesina), taxanos (por ejemplo, paclitaxel, docetaxel), etopósido y tenipósido; inhibidores de topoisomerasa tales como camptotecinas (por ejemplo, irinotecán y topotecán); antibióticos citotóxicos tales como actinomicina, antraciclinas, doxorubicina, daunorubicina, valrubicina, idarubicina, epirubicina, bleomicina, plicamicina y mitomicina; y radioisótopos. Se espera que el ligado de los anticuerpos o las partes de unión a antígeno de los mismos de la invención a los agentes anticancerígenos dé como resultado una inhibición más fuerte del crecimiento tumoral del cáncer en comparación con el anticuerpo sin el agente anticancerígeno, debido a que el conjugado resultante se acumulará en el sitio del tumor debido la presencia de GDF-15 en el tumor, lo que lleva a la acumulación del agente anticancerígeno en el sitio del tumor y a los efectos potenciados del agente anticancerígeno en el tumor.
- 30 En otra realización de la invención según las realizaciones anteriores, el anticuerpo capaz de unirse a GDF-15 humano o la parte de unión a antígeno del mismo se modifica mediante una etiqueta de aminoácidos. Los ejemplos no limitativos de tales etiquetas incluyen colas de polihistidina (His), etiqueta FLAG, etiqueta de hemaglutinina (HA), etiqueta de glicoproteína D (gD) y etiqueta c-myc. Las etiquetas pueden usarse con diversos propósitos. Por ejemplo, pueden usarse para ayudar a la purificación del anticuerpo capaz de unirse a GDF-15 humano o la parte de unión a antígeno del mismo, o pueden usarse para la detección del anticuerpo o la parte de unión a antígeno del mismo (por ejemplo, cuando se usan en ensayos de diagnóstico). Preferiblemente, tales etiquetas están presentes en el extremo C-terminal o el extremo N-terminal del anticuerpo capaz de unirse a GDF-15 humano o la parte de unión a antígeno del mismo.
- 35 En una realización preferida de la presente invención según las realizaciones anteriores, el anticuerpo capaz de unirse a GDF-15 humano o la parte de unión a antígeno del mismo es capaz de inhibir el crecimiento de cáncer en un mamífero, preferiblemente un paciente humano.
- 40 En otra realización preferida de la presente invención según las realizaciones anteriores, el GDF-15 humano es un GDF-15 humano recombinante que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No: 8.
- 45 En otra realización preferida de la presente invención según las realizaciones anteriores, la unión del anticuerpo capaz de unirse a GDF-15 humano o la parte de unión a antígeno del mismo es una unión a un epítopo

conformacional o discontinuo en el GDF-15 humano.

Preferiblemente, los anticuerpos monoclonales de la presente invención capaces de unirse a GDF-15 humano o partes de unión a antígeno de los mismos son anticuerpos aislados.

5 En una realización preferida de los anticuerpos anteriores o partes de unión a antígeno de los mismos según la invención, el anticuerpo tiene un tamaño de más de 100 kDa, preferiblemente más de 110 kDa, más preferiblemente más de 120 kDa, todavía más preferiblemente más de 130 kDa, y lo más preferiblemente más de 140 kDa. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa, más preferiblemente un anticuerpo IgG de longitud completa.

10 La invención también se refiere a un vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para el anticuerpo o la parte de unión a antígeno del mismo tal como se definió anteriormente.

15 Además, la presente invención también proporciona una línea celular capaz de producir un anticuerpo o una parte de unión a antígeno del mismo según la presente invención.

20 En una realización, la línea celular puede derivar de cualquier línea celular que se conozca en esa técnica y sea adecuada para la producción de anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos.

25 En otra realización preferida, la línea celular contiene un vector de expresión según la invención tal como se definió anteriormente.

B) Composiciones farmacéuticas

30 Las composiciones farmacéuticas que contienen los anticuerpos de la presente invención se preparan según criterios conocidos para la preparación de composiciones farmacéuticas que contienen anticuerpos y partes de los mismos.

35 Por ejemplo, las composiciones se preparan de manera que puedan almacenarse y administrarse apropiadamente, por ejemplo mediante el uso de componentes farmacéuticamente aceptables tales como portadores, excipientes o estabilizadores.

40 Tales componentes farmacéuticamente aceptables no son tóxicos en las cantidades usadas cuando se administra la composición farmacéutica a un paciente. Los componentes farmacéuticamente aceptables añadidos a las composiciones farmacéuticas pueden depender del uso pretendido particular de las composiciones farmacéuticas y la vía de administración.

45 En general, los componentes farmacéuticamente aceptables usados en relación con la presente invención se usan según el conocimiento disponible en la técnica, por ejemplo a partir de Remington's Pharmaceutical Sciences, Ed. AR Gennaro, 20^a edición, 2000, Williams & Wilkins, PA, EE. UU.

C) Métodos terapéuticos y productos para su uso en estos métodos

50 45 La presente divulgación se refiere además a un método para tratar caquexia por cáncer en un mamífero. El método comprende administrar un anticuerpo o una parte de unión a antígeno del mismo tal como se definió anteriormente, o una composición farmacéutica tal como se definió anteriormente a dicho mamífero. Alternativamente, la presente invención se refiere a un anticuerpo o una parte de unión a antígeno del mismo tal como se definió anteriormente para su uso en estos métodos. En un aspecto muy preferido de estas realizaciones, el mamífero es un paciente humano.

55 La presente divulgación se refiere además a un método para tratar cáncer en un mamífero. El método comprende administrar un anticuerpo o una parte de unión a antígeno del mismo tal como se definió anteriormente, o una composición farmacéutica tal como se definió anteriormente a dicho mamífero. Alternativamente, la presente invención se refiere a un anticuerpo o una parte de unión a antígeno del mismo tal como se definió anteriormente para su uso en estos métodos. En un aspecto muy preferido de estas realizaciones, el mamífero es un paciente humano.

60 60 Cuando se tiene en cuenta la presente invención, queda claro que los anticuerpos anti-GDF-15 conocidos a partir de los documentos WO 2005/099746, WO 2009/021293 y Johnen H *et al.*, *Nature Medicine*, 2007 sólo inhiben la pérdida de peso inducida por cáncer, pero no inhiben otros efectos de GDF-15 humano, tales como los relacionados con el crecimiento de cáncer.

65 La presente invención se refiere a varias ventajas sorprendentes en comparación con los efectos observados en la técnica.

En particular, un beneficio principal de la invención radica en que los anticuerpos anti-GDF-15 divulgados en el presente documento pueden usarse para tratar más eficazmente la pérdida de peso inducida por cáncer y/o la caquexia por cáncer.

- 5 Por ejemplo, el tratamiento con los anticuerpos según la invención puede prevenir por completo la caquexia por cáncer (cuando se administra de manera profiláctica) o revertir por completo la caquexia por cáncer (cuando se administra después de la aparición de la caquexia por cáncer).
- 10 Además, los anticuerpos según la invención pueden incluso aumentar el peso corporal del mamífero tratado durante un tratamiento profiláctico para la prevención de caquexia. Asimismo, se espera que en el transcurso de un tratamiento terapéutico iniciado después de la aparición de la caquexia por cáncer, los anticuerpos según la invención no sólo puedan revertir la pérdida de peso corporal, sino que también aumenten el peso corporal del mamífero tratado en comparación con su peso corporal antes de la aparición de la caquexia por cáncer.
- 15 Este efecto inesperado de los anticuerpos según la invención puede ser beneficioso en diversas situaciones clínicas. Por ejemplo, la administración de muchos componentes que son farmacéuticamente activos contra el cáncer (por ejemplo, diversos fármacos quimioterápicos) puede conducir a una pérdida de peso corporal de los mamíferos, incluidos los pacientes humanos. Tal pérdida adicional de peso corporal podría estar contrarrestada por el aumento del peso corporal debido a la administración de los anticuerpos según la invención. Por tanto, los usos de los anticuerpos según la invención pueden ser particularmente ventajosos y seguros para regímenes de combinación con fármacos quimioterápicos adicionales. De manera similar, los usos de los anticuerpos según la invención pueden ser particularmente ventajosos para mamíferos tales como pacientes humanos que ya tenían un bajo peso corporal antes de la aparición del cáncer y/o antes de la aparición de la caquexia por cáncer. Los pacientes con bajo peso corporal pueden ser, por ejemplo, pacientes con caquexia, por ejemplo pacientes con un índice de masa corporal menor de 18 kg/m^2 .

Además, inesperadamente, según la invención, los anticuerpos no sólo son eficaces para el tratamiento de caquexia por cáncer, sino también eficaces para el tratamiento de cáncer.

- 30 Por tanto, se espera que los productos para el uso de los anticuerpos según la invención sean particularmente beneficiosos para el tratamiento de subgrupos de pacientes con cáncer que experimentan pérdida de peso inducida por cáncer y/o caquexia por cáncer, respectivamente.
- 35 Sin embargo, también se espera que los efectos según la invención sean ventajosos para el tratamiento de un grupo completo de pacientes de un cáncer al que se hace referencia en el presente documento: usando los anticuerpos según la invención que son eficaces tanto contra el propio cáncer como contra la pérdida de peso inducida por cáncer y/o la caquexia por cáncer, los tratamientos contra el cáncer y la caquexia por cáncer pueden simplificarse mediante el uso del mismo tratamiento para todos los pacientes con cáncer, independientemente de si experimentan o no pérdida de peso inducida por cáncer y/o caquexia por cáncer. Esto se debe a que debido a los efectos duales de los anticuerpos contra el cáncer y la caquexia por cáncer, se espera que estos anticuerpos obvien la necesidad de fármacos adicionales para el tratamiento de caquexia por cáncer.

40 Asimismo, debido a los efectos duales de los anticuerpos según la invención, también puede volverse innecesario diagnosticar la pérdida de peso inducida por cáncer y/o la caquexia por cáncer. Por tanto, se espera que se reduzcan los costes globales de la terapia y el diagnóstico.

- 45 Por tanto, en una realización preferida de los anticuerpos anteriores, las partes de unión a antígeno de los mismos para su uso según la invención, el método para tratar la caquexia por cáncer es un método para prevenir por completo o revertir por completo la caquexia por cáncer. En una realización más preferida de los anticuerpos, las partes de unión a antígeno de los mismos para su uso en este método, el método para tratar la caquexia por cáncer es un método para prevenir por completo la caquexia por cáncer. En una realización más preferida alternativa de los anticuerpos, las partes de unión a antígeno de los mismos para su uso en este método, el método para tratar la caquexia por cáncer es un método para revertir por completo la caquexia por cáncer.
- 50 En una realización preferida de los anticuerpos anteriores, las partes de unión a antígeno de los mismos para su uso según la invención, sólo se tratan en el método mamíferos que padecen ambos de
- 55 i) cáncer y
- 60 ii) caquexia por cáncer.

65 En una realización preferida de los anticuerpos anteriores, las partes de unión a antígeno de los mismos para su uso según la invención, el método aumenta el peso corporal del mamífero en comparación con su peso corporal antes de la aparición de la caquexia por cáncer. Preferiblemente, el aumento del peso corporal del mamífero es de al menos el 1,5%, preferiblemente al menos el 2,5%, más preferiblemente al menos el 5% en comparación con su peso corporal antes de la aparición de la caquexia por cáncer.

- En una realización preferida de los anticuerpos anteriores, las partes de unión a antígeno de los mismos para su uso según la invención, el método es un método tanto para tratar el cáncer como para tratar la caquexia por cáncer en el mismo mamífero.
- 5 En una realización preferida de los anticuerpos anteriores, las partes de unión a antígeno de los mismos para su uso según la invención, el anticuerpo tiene un tamaño de más de 100 kDa, preferiblemente más de 110 kDa, más preferiblemente más de 120 kDa, todavía más preferiblemente más de 130 kDa, y lo más preferiblemente más de 140 kDa. Preferiblemente, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa, más preferiblemente un anticuerpo IgG de longitud completa.
- 10 En una realización preferida adicional de los anticuerpos anteriores, las partes de unión a antígeno de los mismos para su uso según la invención, el anticuerpo tiene una parte Fc que es capaz de unirse al receptor de Fc.
- 15 En una realización preferida de los anticuerpos anteriores, las partes de unión a antígeno de los mismos para su uso según la invención, las células cancerosas del mamífero expresan de manera endógena GDF-15 y/o las células cancerosas del mamífero estimulan la expresión endógena de GDF-15 en células no cancerosas del mamífero.
- 20 En una realización preferida de los anticuerpos anteriores, las partes de unión a antígeno de los mismos para su uso según la invención, las células cancerosas del mamífero se caracterizan porque expresan de manera endógena GDF-15.
- 25 En una realización preferida de los anticuerpos anteriores, las partes de unión a antígeno de los mismos para su uso según la invención, el mamífero es un paciente humano.
- 30 En una realización preferida de los anticuerpos anteriores, las partes de unión a antígeno de los mismos para su uso, el paciente humano tiene niveles elevados de GDF-15 en suero sanguíneo antes de la administración. En un subgrupo de pacientes con niveles elevados de GDF-15 en el suero sanguíneo, se espera que los métodos de tratamiento sean particularmente eficaces para inhibir el crecimiento de cáncer. En el aspecto más preferido de esta realización, los niveles de GDF-15 son niveles de proteína GDF-15 medidos usando el anticuerpo según la invención que puede obtenerse a partir de la línea celular de hibridoma B1-23 depositada ante la Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) con el número de registro DSM ACC3142, preferiblemente medido mediante inmunoquímica.
- 35 En otra realización de los anticuerpos anteriores, las partes de unión a antígeno de los mismos para su uso, el anticuerpo o la parte de unión a antígeno del mismo es el único principio farmacéuticamente activo contra el cáncer usado en el método.
- 40 En una realización alternativa de los anticuerpos anteriores, las partes de unión a antígeno de los mismos para su uso, el anticuerpo o la parte de unión a antígeno del mismo se usa en combinación con uno o más principios adicionales farmacéuticamente activos contra el cáncer. En un aspecto de esta realización, el uno o más principios adicionales farmacéuticamente activos contra el cáncer es un agente anticancerígeno conocido y/o una molécula inmunoestimuladora tal como se definió anteriormente. Por tanto, el agente anticancerígeno puede seleccionarse, por ejemplo, de agentes alquilantes tales como cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, mecloretamina, ciclofosfamida, clorambucilo e ifosfamida; antimetabolitos tales como azatioprina y mercaptopericina; alcaloides tales como alcaloides de la vinca (por ejemplo, vincristina, vinblastina, vinorelbina y vindesina), taxanos (por ejemplo, paclitaxel, docetaxel), etopósido y tenipósido; inhibidores de topoisomerasa tales como camptotecinas (por ejemplo, irinotecán y topotecán); antibióticos citotóxicos tales como actinomicina, antraciclinas, doxorubicina, daunorubicina, valrubicina, idarubicina, epirubicina, bleomicina, plicamicina y mitomicina; y radioisótopos. Debido al efecto creciente de los anticuerpos según la invención sobre el peso corporal de los mamíferos, incluidos pacientes humanos, se espera que estos usos combinados de los anticuerpos o las partes de unión a antígeno de los mismos y los principios farmacéuticamente activos contra el cáncer sean particularmente seguros, porque pueden compensar una posible pérdida de peso adicional resultante de la administración de los principios farmacéuticamente activos contra el cáncer.
- 45 En una realización preferida de los anticuerpos anteriores, las partes de unión a antígeno de los mismos para su uso, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cánceres cerebrales incluyendo glioma, cánceres del sistema nervioso, melanoma, cáncer de pulmón, cáncer de labio y cavidad oral, carcinoma hepático, leucemia, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cáncer de vejiga, cáncer de cuello uterino, cáncer de cuerpo uterino, cáncer de testículo, cáncer de tiroides, cáncer de riñón, cáncer de vesícula biliar, mieloma múltiple, cáncer de nasofaringe, cáncer de laringe, cáncer de faringe, cáncer de esófago, tumores gastrointestinales incluyendo cáncer de estómago y colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de ovario y cáncer de mama, preferiblemente del

grupo que consiste en melanoma, cáncer de próstata, cáncer de mama, cánceres cerebrales incluyendo glioma, cáncer colorrectal, cáncer de estómago, cáncer de esófago y cáncer de ovario, y lo más preferiblemente es melanoma. En una realización, el cáncer se selecciona del grupo anterior, que comprende además cáncer de endometrio, tal como carcinoma de endometrio, cáncer de mama de seno subtipos de cáncer de mama, en particular cáncer de mama triple negativo y cáncer de vejiga tal como carcinoma de células uroteliales.

5 En otra realización preferida de los anticuerpos anteriores, las partes de unión a antígeno de los mismos para su uso, el tumor o los tumores formados por el cáncer tienen mayores niveles de GDF-15 humano antes de la administración en comparación con una muestra de control del mismo paciente obtenida de una parte no cancerosa del tejido que es el tejido de origen del cáncer, preferiblemente niveles 1,2 veces mayores, más preferiblemente niveles 1,5 veces mayores, todavía más preferiblemente niveles 2 veces mayores y lo más preferiblemente niveles 5 veces mayores. En un subgrupo de pacientes que tiene mayores niveles de GDF-15 en el tumor o tumores formados por el cáncer en comparación con la muestra de control anterior, se espera que los métodos de tratamiento sean particularmente eficaces en la inhibición del crecimiento de cáncer.

10 15 En una realización muy preferida de los anticuerpos anteriores, las partes de unión a antígeno de los mismos para su uso, el método para tratar el cáncer comprende inhibir el crecimiento de cáncer. En un aspecto preferido de esta realización, se detiene el crecimiento de cáncer. En un aspecto más preferido, el cáncer se reduce.

20 25 30 En una realización preferida de los anticuerpos anteriores, las partes de unión a antígeno de los mismos para su uso, el método para tratar el cáncer comprende la inducción de la destrucción de células cancerosas por células NK (*natural killer*, linfocitos citolíticos naturales) y células T CD8+ en el paciente humano. Debido a su capacidad para prevenir la regulación por disminución mediada por GDF-15 del conocido regulador de vigilancia inmunitaria NKG2D, se espera que los anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos según la invención restablezcan la vigilancia inmunitaria e induzcan la destrucción de células cancerosas por células NK y células T CD8+, además de los efectos de los anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos que son independientes del sistema inmunitario.

D) Kits

35 40 45 La presente invención también proporciona kits tal como se definen en la reivindicación 10.

En una realización, los kits son kits para su uso en los métodos según la invención tal como se definieron anteriormente.

50 55 En realizaciones adicionales, la presente invención también proporciona un kit de diagnóstico que comprende cualquiera de los anticuerpos o partes de unión a antígeno de los mismos según la invención.

En una realización, el kit de diagnóstico puede usarse para detectar si el tumor o tumores de un paciente con cáncer formado(s) por el cáncer tienen mayores niveles de GDF-15 humano en comparación con una muestra de control del mismo paciente obtenida de una parte no cancerosa del tejido que es el tejido de origen del cáncer.

En otra realización, el kit de diagnóstico puede usarse para detectar si un paciente con cáncer humano tiene niveles elevados de GDF-15 en suero sanguíneo.

E) Secuencias

50 55 Las secuencias de aminoácidos a las que se hace referencia en la presente solicitud son las siguientes (en un orden del extremo N-terminal al C-terminal; representadas en el código de aminoácidos de una letra):

SEQ ID No: 1 (región del dominio variable de cadena pesada que comprende una región FR1, una CDR1, una FR2, una CDR2 y una FR3 de la secuencia de polipéptido del anticuerpo monoclonal anti-GDF-15 humano AcM-B1-23):

QVKLQQSGPGILQSSQTLSTCSFSGFSLSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKRY
NPTLKSRLTISKDPSRNQVFLKITSVDTADTATYYC

SEQ ID No: 2 (región del dominio variable de cadena ligera que comprende una región FR1, una CDR1, una FR2, una CDR2 y una FR3 de la secuencia de polipéptido del anticuerpo monoclonal anti-GDF-15 humano AcM-B1-23):

DIVLTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWFLQKPGQSPKALIYSASYRYSGVPDR
FTGSGSGTDFLTISNVQSEDLAEYFC

SEQ ID No: 3 (secuencia peptídica de la región CDR1 de cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-GDF-15

humano AcM-B1-23):

GFSLSTSGMG

- 5 SEQ ID No: 4 (secuencia peptídica de la región CDR2 de cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-GDF-15 humano AcM-B1-23):

IYWDDDK

- 10 SEQ ID No: 5 (secuencia peptídica de la región CDR3 de cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-GDF-15 humano AcM-B1-23):

ARSSYGAMDY

- 15 SEQ ID No: 6 (secuencia peptídica de la región CDR1 de cadena ligera del anticuerpo monoclonal anti-GDF-15 humano AcM-B1-23):

QNVGTN

- 20 Secuencia peptídica de la región CDR2 de cadena ligera del anticuerpo monoclonal anti-GDF-15 humano AcM-B1-23:

SAS

- 25 SEQ ID No: 7 (secuencia peptídica de la región CDR3 de cadena ligera del anticuerpo monoclonal anti-GDF-15 humano AcM-B1-23):

QQYNNFPYT

- 30 SEQ ID No: 8 (proteína GDF-15 humana madura recombinante):

GSARNGDHCPLGPGRCRCLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHA
QIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVLQTYDDLLAKDCHCI

SEQ ID No: 9 (proteína precursora de GDF-15 humano):

35

MPGQELRTVNGSQMLLVLLVLSLPHGGALSLAEASRASFPGPSELHSEDSRFRELRKRYE
DLLTRLRANQSWEDSNTDLVPAPAVRILTPEVRLGGGHLHLRISRAALPEGLPEASRLHR
ALFRLSPTASRSWDVTRPLRQLSLARPQAPALHLRLSPPPSQSDQLLAESSSARPQLELH
LRPQAARGRRRARARNGDHCPLGPGRCRCLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTMCIGAC
PSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVLQTYDDLLAKDC
HCl

SEQ ID No: 10 (proteína precursora de GDF-15 humano + ligador GSGS N-terminal y C-terminal):

40

GSGSGSGMPGQELRTVNGSQMLLVLLVLSLPHGGALSLAEASRASFPGPSELHSEDSRFR
ELRKRYEDLLTRLRANQSWEDSNTDLVPAPAVRILTPEVRLGGGHLHLRISRAALPEGLP
EASRLHRALFRLSPTASRSWDVTRPLRQLSLARPQAPALHLRLSPPPSQSDQLLAESSSA
RPQLELHLRPQAARGRRRARARNGDHCPLGPGRCRCLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQV
TMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVLQTYD
DLLAKDCHCIGSGSGSG

SEQ ID No: 11 (Péptido Flag): **DYKDDDDKGG**

- 45 SEQ ID No: 12 (péptido HA): **YPYDVPDYAG**

SEQ ID No: 13 (péptido derivado de GDF-15 humano):

ELHLRPQAAARGRR

5

SEQ ID No: 14 (péptido derivado de GDF-15 humano):

LHLRPQAAARGRRR

10 SEQ ID No: 15 (péptido derivado de GDF-15 humano):

HLRPQAAARGRRRA

15 SEQ ID No: 16 (péptido derivado de GDF-15 humano):

LRPQAAARGRRRRA

SEQ ID No: 17 (péptido derivado de GDF-15 humano):

20 RPQAAARGRRRARA

SEQ ID No: 18 (péptido derivado de GDF-15 humano):

PQAAARGRRRARAR

25

SEQ ID No: 19 (péptido derivado de GDF-15 humano):

QAARGRRRARARN

30 SEQ ID No: 20 (péptido derivado de GDF-15 humano):

MHAQIKTSLHRLK

SEQ ID No: 25 (péptido de GDF-15 que comprende parte del epítopo de GDF-15 que se une a B1-23):

35

EVQVTMCIGACPSQFR

SEQ ID No: 26 (péptido de GDF-15 que comprende parte del epítopo de GDF-15 que se une a B1-23):

40

TDTGVSLQTYDDLLAKDCHCI

Las secuencias de ácido nucleico a las que se hace referencia en la presente solicitud son las siguientes (en un orden de 5' a 3'; representadas según el código de ácido nucleico convencional):

45

SEQ ID No: 21 (secuencia de nucleótidos de ADN que codifica para la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID No: 1):

CAAGTGAAGCTGCAGCAGTCAGGCCCTGGGATATTGCAGTCCTCCCAGACCCCTCAGTCTGA
CTTGTCTTCTCTGGGTTTCACTGAGTACTCTGGTATGGGTGTGAGCTGGATTGTC
GCCTTCAGGAAAGGGCTGGAGTGGCTGGCACACATTACTGGATGATGACAAGCGCTAT
AACCCAACCCCTGAAGAGCCGGCTCACAACTCCAAGGGATCCCTCCAGAAACCAGGTATTCC
TCAAGATCACCAGTGTGGACACTGCAGATACTGCCACATACTACTGT

50

SEQ ID No: 22 (secuencia de nucleótidos de ADN que codifica para la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID No: 2):

GACATTGTGCTCACCCAGTCTCCAAAATTCATGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCG
TCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTAATGTGGCCTGGTTCTACAGAAACCAGG
GCAATCTCCTAAAGCACTTATTACTCGGCATCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGATCGC
TTCACAGGCAGTGGACTGGACAGATTCACTCTCACCACAGAACGTGCAGTCTGAAG
ACTTGGCAGAGTATTCTGT

SEQ ID No: 23 (secuencia de nucleótidos de ADN que codifica para la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID No: 5):

5 GCTCGAAGTTCTACGGGGCAATGGACTAC

SEQ ID No: 24 (secuencia de nucleótidos de ADN que codifica para la secuencia de aminoácidos definida en SEQ ID No: 7):

10 CAGCAATATAACAACCTTCCGTACACG

SEQ ID No: 27: (secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo anti-GDF-15 de B1-23 humanizado H1L5):

15 QITLKESGPTLVKPTQTLTLCFTSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKGLEWLAHIYWDDDKRY
NPTLKSRLTITKDPSKNQVVLMTNMDPVDTATYYCARSSYGAMDYWGQGTLTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCPCPAPELLGGPSVFLF
PPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

20 SEQ ID No: 28: (secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti-GDF-15 de B1-23 humanizado H1L5):

QITLKESGPTLVKPTQTLTLCFTSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKGLEWLAHIYWDDDKRY
NPTLKSRLTITKDPSKNQVVLMTNMDPVDTATYYCARSSYGAMDYWGQGTLTVSS

25 SEQ ID No: 29: (secuencia de aminoácidos del dominio constante de cadena pesada del anticuerpo anti-GDF-15 de B1-23 humanizado H1L5):

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSG
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCPCPAPELLGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

30 SEQ ID No: 30: (secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo anti-GDF-15 de B1-23 humanizado H1L5):

DIVLTQSPSFLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVAWFQQKPGKSPKALIYSASYRYSVPDR
FTGSGSGTEFTLTISLQPEDFAAYFCQQYNNFPYTFGGGTLEIKRAPSVFIFPPSDEQL
KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLKADY
EKKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC

SEQ ID No: 31: (secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo anti-GDF-15 de B1-

23 humanizado H1L5):

DIVLTQSPSFLSASVGDRVTITCKASQNVGTNVAWFQQKPGKSPKALIYSASYRYSVPDR
FTGSGSGTEFTLTISLQPEDFAAYFCQQYNNFPYTFGGGTKEIKR

5 SEQ ID No: 32: (secuencia de aminoácidos del dominio constante de cadena ligera del anticuerpo anti-GDF-15 de B1-23 humanizado H1L5):

APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
YSLSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10 SEQ ID No: 33: (secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo anti-GDF-15 de B1-23 quimérico):

QVKLQQSGPGILQSSQTLSTCSFGSLSSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKRY
NPTLKSRLTISKDPSRNQVFLKITSVDTADTATYYCARSSYGAMDYWGQGTSVTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAPLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS
VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

15 SEQ ID No: 34: (secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena pesada del anticuerpo anti-GDF-15 de B1-23 quimérico):

QVKLQQSGPGILQSSQTLSTCSFGSLSSTSGMGVSWIRQPSGKGLEWLAHIYWDDDKRY
NPTLKSRLTISKDPSRNQVFLKITSVDTADTATYYCARSSYGAMDYWGQGTSVTVSS

20 SEQ ID No: 35: (secuencia de aminoácidos del dominio constante de cadena pesada del anticuerpo anti-GDF-15 de B1-23 quimérico):

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAPLQSSG
LYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS
VFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

25 SEQ ID No: 36: (secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo anti-GDF-15 de B1-23 quimérico):

DIVLTQSPKFMSTSVGDRSVTCKASQNVGTNVAWFLQKPGQSPKALIYSASYRYSVPDR
FTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYNNFPYTFGGGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSTLTK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

30 SEQ ID No: 37: (secuencia de aminoácidos del dominio variable de cadena ligera del anticuerpo anti-GDF-15 de B1-23 quimérico):

DIVLTQSPKFMSTSVGDRSVTCKASQNVGTNVAWFLQKPGQSPKALIYSASYRYSVPDR
FTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYNNFPYTFGGGTKEIKRTVA

SEQ ID No: 38: (secuencia de aminoácidos del dominio constante de cadena ligera del anticuerpo anti-GDF-15 de B1-23 quimérico):

APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST
YSLSSTLTLSKADYEHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC

F) Ejemplos

- 5 La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos no limitativos:
- Ejemplo 1: Generación y caracterización del anticuerpo anti-GDF-15 murino B1-23, y generación de anticuerpos químicos y humanizados.
- 10 Se generó el anticuerpo B1-23 en un ratón deficiente en GDF-15. Se usó GDF-15 humano recombinante (SEQ ID No: 8) como inmunógeno.
- 15 Se depositó la línea celular de hibridoma B1-23 productora de AcM-B1-23 ante la Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DMSZ) con el número de registro DSM ACC3142, en virtud del Tratado de Budapest.
- 20 Mediante un sistema de tiras reactivas disponible comercialmente, se identificó B1-23 como un isótipo IgG2a (cadena kappa). Usando mediciones de resonancia de plasmón superficial, se determinó la constante de disociación (K_d) de la siguiente manera:
- 25 Se midió la unión del anticuerpo monoclonal anti-GDF-15 humano AcM-B1-23 anti-GDF-15 humano empleando mediciones de resonancia de plasmón superficial usando un sistema Bio-Rad® ProteOn™ XPR36 y chips de sensor Bio-Rad® GLC:
- 30 Para la preparación de los biosensores, se inmovilizó la proteína GDF-15 humana madura recombinante en las celdas de flujo 1 y 2. En una celda de flujo, se usó GDF-15 recombinante derivado de células de insecto transfectadas con baculovirus (células de insecto HighFive) y en la otra proteína recombinante derivada de la expresión en *E. coli*. Se activó el chip del sensor para GLC usando Sulfo-NHS (N-hidroxisulfosuccinimida) y EDC (clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida) (kit de acoplamiento de amino Bio-Rad® ProteOn™) según la recomendación del fabricante, posteriormente se cargó la superficie del sensor con las proteínas hasta una densidad de aproximadamente 600 UR (1 UR = 1 pg mm⁻²). Se extinguieron luego los grupos de acoplamiento sin reaccionar mediante perfusión con etanolamina 1 M, pH 8,5 y se equilibró el biosensor perfundiéndolo el chip con tampón de ejecución (HEPES 10 M, NaCl 150 mM, EDTA 3,4 mM, Tween®20 al 0,005%, pH 7,4, denominado HBS150). Como controles, se usaron dos celdas de flujo, una vacía sin proteína acoplada y otra acoplada con una pareja de proteína no fisiológica (Interleucina-5 humana), que se inmovilizó usando la misma química de acoplamiento y la misma densidad de acoplamiento. Para las mediciones de interacción, se disolvió el AcM-B1-23 anti-GDF-15 humano en HBS150 y se usó en seis concentraciones diferentes como analito (concentración: 0,4, 0,8, 3, 12, 49 y 98 nM). Se perfundió el analito por el biosensor usando la configuración de cinética de una sola inyección (*one-shot kinetics*) para evitar la regeneración intermitente, se realizaron todas las mediciones a 25°C y usando una velocidad de flujo de 100 µl min⁻¹. Para el procesamiento, se eliminaron el efecto de superficie aparente y la unión inespecífica a la matriz del sensor restando los datos de SPR de la celda de flujo vacía (celda de flujo 3) de todos los demás datos de SPR. El sensograma resultante se analizó usando el software ProteOn Manager versión 3.0. Para el análisis de la cinética de unión, se supuso una interacción de tipo Langmuir 1:1. Para la constante de velocidad de asociación, pudo determinarse un valor de $5,4 \pm 0,06 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ (k_{on}) y para la constante de velocidad de disociación un valor de $4,3 \pm 0,03 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (k_{off}) (los valores son para la interacción de AcM-B1-23 anti-GDF-15 humano con GDF-15 derivado de la expresión en células de insecto). Se calculó la constante de disociación de equilibrio usando la ecuación $K_D = k_{off}/k_{on}$ para producir un valor de aproximadamente 790 pM. Los valores de afinidad para la interacción de GDF-15 derivado de la expresión en *E. coli* y el AcM-B1-23 anti-GDF-15 humano difieren en menos de un factor de 2, las constantes de velocidad para GDF-15 derivado de células de insecto y *E. coli* se desvían en aproximadamente el 45% y, por tanto, están dentro de la precisión de las mediciones de SPR y probablemente no reflejen una diferencia real en la afinidad. En las condiciones usadas, el AcM-B1-23 anti-GDF-15 humano no muestra unión a la interleucina-5 humana y confirma así la especificidad de los datos de interacción y el AcM-B1-23 anti-GDF-15 humano.
- 55 La secuencia de aminoácidos de GDF-15 humano recombinante (tal como se expresa en células de insecto transfectadas con baculovirus) es:

GSARNGDHCP	LGPGRCCRLH	TVRASLEDLG	WADWVLSPRE	VQVTMCIGAC
PSQFRAANMH	AQIKTSLHRL	KPDTVPAPCC	VPASYNPMVL	IQKTDTGVL
QTYDDLLAKD	CHCI			

(SEQ ID No: 8)

Por tanto, usando mediciones de resonancia de plasmón superficial, se determinó la constante de disociación (Kd) de 790 pM. Como comparación: el anticuerpo usado terapéuticamente rituximab tiene una afinidad significativamente menor (Kd = 8 nM).

5 A partir del AcM-B1-23 murino anti-GDF-15 humano, se generó un anticuerpo químérico AcM-B1-23 anti-GDF-15 humano según la invención reemplazando dominios constantes del anticuerpo murino por los dominios constantes de un anticuerpo IgG1 humano (cadena principal de trastuzumab). La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de este anticuerpo químérico se muestra en la SEQ ID No: 33, y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de este anticuerpo químérico se muestra en la SEQ ID No: 36.

10 A partir del anticuerpo químérico AcM-B1-23 anti-GDF-15, se desarrolló un anticuerpo humanizado AcM-B1-23 anti-GDF-15 humano según la invención humanizando los dominios variables del anticuerpo químérico, es decir, reemplazando las regiones de entramado del anticuerpo químérico por secuencias humanas. La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de este anticuerpo humanizado se muestra en SEQ ID No: 27, y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de este anticuerpo humanizado se muestra en SEQ ID No: 30. Este anticuerpo se denomina anticuerpo anti-GDF-15 H1L5 o anticuerpo B1-23-H1L5 humanizado o anticuerpo H1L5.

15 Para generar el anticuerpo químérico AcM-B1-23 anti-GDF-15 mencionado anteriormente y el anticuerpo humanizado B1-23-H1L5 tal como se indicó anteriormente, se optimizaron los ADNc que codifican para las secuencias de anticuerpo y se sintetizaron los genes. Luego se clonaron las secuencias génicas en un sistema de vector de clonación/expresión. A partir de estos vectores, se sintetizó ADN de plásmido con bajos niveles de endotoxinas.

20 25 Luego, se transfeció el ADN de plásmido de manera transitoria en células CHO, seguido de un análisis y una cuantificación de la expresión de anticuerpos usando un biosensor de proteína A. Se secuenciaron los ADNc de los cultivos candidatos para la expresión de anticuerpos. Se analizaron los anticuerpos monoclonales obtenidos (véanse los ejemplos 7 a 9).

30 **Ejemplo 2:** Antagonización de los efectos mediados por GDF-15 con AcM B1-23

35 a) Se sabe que el receptor NKG2D (*Natural Killer Group 2D*, grupo de linfocitos citolíticos naturales 2D), que se expresa en células NK y células T CD8+, desempeña un papel importante en la vigilancia inmunitaria frente a tumores. Las células transformadas así como las infectadas por virus expresan ligandos, que se unen al receptor NKG2D, activando de ese modo las funciones efectoras citotóxicas de las células inmunitarias descritas. De ese modo, el sistema inmunitario puede detectar y eliminar las células transformadas. Después del tratamiento de células inmunitarias con o bien GDF-15 humano recombinante o bien GDF-15 secretado por células tumorales *in vitro* durante 72 horas, el nivel de expresión de NKG2D en la superficie celular de los linfocitos estaba regulado por disminución (figura 1).

40 45 Después de 72 horas de incubación, se tiñeron las células inmunitarias con los siguientes anticuerpos para FACS: anti-CD3, anti-CD56, anti-NKG2D. Usando esta combinación de anticuerpos, el experimento se centró en las células NK y su expresión en superficie de NKG2D. El bajo nivel de NKG2D en las células inmunitarias condujo a una lisis de células tumorales/diana alterada. El AcM B1-23 impidió la regulación por disminución de NKG2D mediada por GDF-15.

50 Por tanto, se concluye que el GDF-15 humano regula por disminución la expresión de NKG2D en la superficie celular de los linfocitos y, de ese modo, regula por disminución la vigilancia inmunitaria frente a tumores. Al unirse a GDF-15 humano, los anticuerpos de la presente invención son capaces de prevenir la regulación por disminución de NKG2D mediada por GDF-15 y deberían ser capaces de restaurar la vigilancia inmunológica e inducir la destrucción de células cancerosas por las células NK y células T CD8+. Dado que las regiones CDR del anticuerpo AcM B1-23 corresponden a las regiones CDR de los anticuerpos químéricos y humanizados, se espera que las propiedades funcionales, incluidas las propiedades de unión de estos anticuerpos, sean similares.

55 b) El tratamiento de la línea celular de cáncer de ovario SK-OV-3 con GDF-15 recombinante condujo a la fosforilación de AKT. AKT es una molécula, que forma parte de la ruta de PI3K y contribuye a la activación y proliferación de las células. En este experimento, se trataron células SK-OV-3 con GDF-15 recombinante 10 ng/ml durante 10 minutos a 37°C, el 5% de CO₂. Una preincubación durante 5 minutos de 2 µg de AcM-B1-23 con GDF-15 10 ng/ml a 37°C bloqueó la fosforilación de AKT mediada por GDF-15 (figura 2). Esto mostró el efecto neutralizante del AcM-B1-23.

60 65 c) El tratamiento de células inmunitarias con GDF-15 recombinante condujo a la fosforilación de JNK, una cinasa, que se activa por citocinas o por estrés. La antagonización de GDF-15 10 ng/ml con 2 µg de AcM-B1-23 (preincubación durante 5 minutos a 37°) bloqueó la fosforilación de JNK1/2 mediada por GDF-15 (figura 3).

Ejemplo 3: Inhibición de la proliferación de células cancerosas usando AcM B1-23

Los datos generados con B1-23 mostraron un efecto antiproliferativo del anticuerpo sobre células cancerosas *in vitro*. El efecto antiproliferativo más fuerte se observó usando la línea celular de cáncer de próstata LnCap, que produce gran cantidad de GDF-15. Un ensayo metabólico (ensayo con Alamar Blue®) mostró una disminución de la proliferación del 30% después de 72 horas cuando estaba presente el AcM-B1-23, en comparación con el grupo de control, en el que no se aplicó el anticuerpo. Dado que los efectos citotóxicos del anticuerpo se han excluido en diferentes ensayos, este efecto demuestra una tasa de división celular significativamente disminuida después del bloqueo de GDF-15.

Ejemplo 4: el AcM B1-23 inhibe el crecimiento de tumores *in vivo*

Se llevó a cabo el siguiente estudio *in vivo*:

Para evaluar un efecto antitumoral de B1-23 *in vivo*, se usaron ratones desnudos Balb/c^{nu/nu} en un entorno de xenoinjerto con la línea celular de melanoma UACC-257. Se trataron los ratones o bien con el anticuerpo B1-23 o bien con PBS. Cada cohorte de tratamiento contenía 10 ratones desnudos Balb/c^{nu/nu}.

Antes de la inyección, se hicieron crecer las células de melanoma UACC-257 en medio completo, excluyendo cualquier contaminación. Se recogieron las células cuando se alcanzó el 70-80% de confluencia en el matraz de cultivo celular. Luego se lavaron las células con PBS y se contaron. Se suspendieron 1×10^7 células viables en PBS.

La primera inyección/tratamiento se administró en ratones desnudos Balb/c^{nu/nu} de 6 semanas de edad. El área de inyección de los ratones se limpió con etanol. Se mezclaron las células UACC 257 y extrajeron en una jeringa sin aguja, para evitar la presión negativa sobre las células tumorales. La suspensión celular que contenía 1×10^7 células en PBS se inyectaron por vía subcutánea (s.c.) en el flanco inferior de los ratones.

La inyección intraperitoneal (i.p.) de B1-23 (25 mg/kg de peso corporal) o el mismo volumen de PBS se inició inmediatamente después de la inyección de células tumorales (definida como el día 1) y se administró dos veces por semana. Se dejaron crecer los tumores durante 48 días. Se midieron los diámetros tumorales con un calibre y se calculó el volumen tumoral en mm³ mediante la fórmula:

$$\text{Volumen} = (\text{anchura})^2 \times \text{longitud}/2$$

Los resultados que se obtuvieron del estudio se muestran en la figura 4.

Tal como se demostró en la figura, el tamaño tumoral de la cohorte de animales tratada con B1-23 disminuyó significativamente, en comparación con el grupo de control de PBS.

Dado que las regiones CDR del anticuerpo AcM B1-23 corresponden a las regiones CDR de los anticuerpos químéricos y humanizados, se espera que las propiedades funcionales incluidos los efectos anticancerígenos de estos anticuerpos sean similares.

Ejemplo 5: el AcM B1-23 reconoce un epítopo conformacional o discontinuo de GDF-15 humano

Mapeo de epítopos: anticuerpo monoclonal de ratón anti-GDF-15 contra péptidos lineales de 13 meros derivados de GDF-15

Antígeno: GDF-15:

GSGSGSGMPQELRTVNGSQMLLVLLVLSWLPHGGALSLAEASRASFPGPSELHSEDSRFR

ELRKRYEDLLTRLRANQSWEDENTDLVPAPAVRILTPPEVRLGGGGHLHLRISRAALPEGLP

EASRLHRALFRLSPTASRSWDVTRPLRRQLSLARPQAPALHLRLSPPPSQSDQLLAESSSA

RPQLELHLRPQAARGRRRARANGDHCPILGPGRCRCLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQV

TMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTGVSLOQYD

DLLAKDCHCIGSGSGSG (322 aminoácidos con el ligador) (SEQ ID No: 10)

Se tradujo la secuencia de la proteína en péptidos de 13 meros con un cambio de un aminoácido. Se elongaron los extremos C y N-terminal mediante un ligador GSGS neutro para evitar péptidos truncados (letras en negrita).

Péptidos de control:

Flag: **DYKDDDDDKGG** (SEQ ID No: 13), 78 manchas; HA: **YPYDVPDYAG** (SEQ ID No: 14), 78 manchas

(cada copia de alineamiento)

Identificador de chip de péptido:
000264_01 (10/90, ligador Ala2Asp)

Condiciones de tinción:

Tampón convencional: PBS, pH 7,4 + Tween®20 al 0,05%

Tampón de bloqueo: Tampón de bloqueo de Rockland MB-070

Tampón de incubación: tampón convencional con el 10% de tampón de bloqueo de Rockland MB-070

10 Muestra primaria: anticuerpo monoclonal de ratón anti-GDF-15 (1 µg/µl): tinción en tampón de incubación durante 16 h a 4°C a una dilución de 1:100 y agitación suave a 500 rpm

Anticuerpo secundario: IgG (H + L) de cabra anti-ratón IRDye680, tinción en tampón de incubación con una dilución de 1:5000 durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA).

Anticuerpos de control: anticuerpo monoclonal anti-HA (12CA5)-LL-Atto 680 (1:1000), anticuerpo monoclonal anti-FLAG (M2)-FluoProbes752 (1:1000); tinción en tampón de incubación durante 1 h a temperatura ambiente

Escáner:

Sistema de obtención de imágenes Odyssey®, LI-COR Biosciences

Ajustes: desplazamiento: 1 mm; resolución: 21 μm ; intensidad verde/rojo: 7/7

20

Resultados:

Después de hinchamiento previo durante 30 minutos en tampón convencional y 30 minutos en tampón de bloqueo, se incubó el alineamiento de péptidos con péptidos lineales derivados de B7H3 de 10, 12 y 15 meros con anticuerpo secundario de cabra anti-IgG de ratón (H + L) IRDye680 sólo a una dilución de 1:5000 durante 1 hora a temperatura ambiente para analizar las interacciones de fondo del anticuerpo secundario. Se lavó el microalineamiento PEPperCHIP® 2x1 min con tampón convencional, se enjuagó con agua dest. y se secó en una corriente de aire. Se realizó la lectura con el sistema de obtención de imágenes Odyssey® a una resolución de 21 μ m e intensidades verde/rojo de 7/7: se observó una interacción débil de péptidos ricos en arginina (SIHLR PQAARGRR (SEQ ID

No: 15), **LHLRPQAARGRRR** (SEQ ID No: 16), **HLRPQAARGRRRA** (SEQ ID No: 17), **LRPQAARGRRRAR** (SEQ ID No: 18), **RPOAARGRRRAR** (SEQ ID No: 19), **PQAARGRRRARAR** (SEQ ID No: 20) y **QAARGRPRARARN** (SEQ ID No: 21) que se conocen como agentes de unión frecuentes y con el péptido básico **MNAQIKTSLHRLK** (SEQ ID No: 22) debido a interacciones iónicas con el tinte de anticuerpos cargado.

35 Despues de hinchamiento previo durante 10 minutos en tampón convencional, se incubó el microalineamiento de péptidos durante la noche a 4°C con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-GDF-15 a una dilución de 1:100. El lavado repetido en tampón convencional (2x1 min) estuvo seguido por incubación durante 30 min con el anticuerpo secundario a una dilución de 1:5000 a temperatura ambiente. Despues de lavado durante 2x10 s en tampón convencional y enjuague corto con agua dest., se secó el microalineamiento PEPperCHIP® en una corriente de aire. 40 Se realizó la lectura con el sistema de obtención de imágenes Odyssey® a una resolución de 21 µm e intensidades verde/rojo de 7/7 antes y despues de la tinción de los péptidos de control con anticuerpos anti-HA y anti-FLAG(M2).

Se demostró que ninguno de los péptidos de 13 meros lineales derivados de GDF-15 interaccionaba con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-GDF-15 incluso a intensidades excesivamente reguladas. Sin embargo, la tinción de los péptidos de control Flag y HA que enmarcan el alineamiento dio lugar a intensidades de manchas buenas y homogéneas.

Resumen:

50 El mapeo de epítopos del anticuerpo monoclonal de ratón GDF-15 contra GDF-15 no reveló ningún epítopo lineal con los péptidos 13mer derivados del antígeno. Según este hallazgo, es muy probable que el anticuerpo monoclonal de ratón GDF-15 reconozca un epítopo conformacional o discontinuo con baja afinidad de epítopos parciales. Debido a la ausencia obvia de cualquier señal de GDF-15 por encima de la tinción de fondo del anticuerpo secundario solamente, se omitió la cuantificación de las intensidades puntuales con el analizador PepSlide® y la anotación posterior de péptidos.

Ejemplo 6: Identificación estructural de epítopos de ligandos peptídicos mediante escisión de epítopos y extracción

60 Se identificó el epítopo de GDF-15 humano recombinante que se une al anticuerpo B1-23 mediante el método de escisión de epítopos y el método de extracción de epítopos (Suckau *et al.* Proc Natl Acad Sci U S A. diciembre de 1999; 97(24): 12848-12853; P. Stefanescu *et al.* Eur. J. Mass Spectrom. 13: 69-75 (2007)).

Para la preparación de la columna de anticuerpos, se añadió el anticuerpo R1-23 a Sepharose acoplado a érido-6.

aminohexanoico activado con NHS. El anticuerpo acoplado a Sepharose B1-23 se cargó luego en una microcolumna de 0,8 ml y se lavó con tampones de bloqueo y lavado.

Experimento de extracción de epítopos:

5 Se digirió GDF-15 humano recombinante con tripsina durante 2 h a 37°C (en disolución), dando como resultado diferentes péptidos, según los sitios de escisión de tripsina en la proteína. Después de la digestión completa, se cargaron los péptidos en la columna de afinidad que contenía el anticuerpo B1-23 inmovilizado. Se usaron péptidos no unidos así como potencialmente unidos de GDF-15 para el análisis por espectrometría de masas. No fue posible 10 la identificación de péptidos mediante espectrometría de masas. Esto fue un indicador adicional de que la región de unión de GDF-15 en el complejo inmunitario B1-23 comprende un epítopo discontinuo o conformacional. En el caso de un epítopo lineal continuo, los péptidos digeridos deben unirse a su pareja de interacción, a menos que haya un sitio de escisión de tripsina en el péptido del epítopo. Un epítopo discontinuo o conformacional podría confirmarse mediante el método de escisión de epítopos descrito en la siguiente parte.

15 Experimento de escisión de epítopos:

El anticuerpo B1-23 inmovilizado en la columna de afinidad se incubó luego con GDF-15 recombinante durante 2 h. 20 El complejo inmunitario formado en la columna de afinidad se incubó luego con tripsina durante 2 horas a 37°C. La escisión dio como resultado diferentes péptidos derivados del GDF-15 recombinante. El anticuerpo inmovilizado en sí mismo es estable proteolíticamente. Los péptidos resultantes de la proteína GDF-15 digerida, que estaban protegidos por el anticuerpo y, por tanto, protegidos frente a la escisión proteolítica, se eluyeron en condiciones ácidas (TFA, pH2), se recogieron e identificaron mediante espectrometría de masas.

25 El método de escisión de epítopos usando la identificación mediante EM/EM dio como resultado los siguientes péptidos:

Péptido	Posición en la secuencia	Masa	Ion/Carga
EVQVTM C I G ACPSQFR (SEQ ID No: 25)	40-55	1769,91	590,50(3+)
TDTGV S L Q TYDD L LAK D CH C I (SEQ ID No: 26)	94-114	2310,96	771:33(3+)

30 La parte del GDF-15 humano, que se une al anticuerpo B1-23, comprende un epítopo discontinuo o conformacional. La espectrometría de masas identificó 2 péptidos en la proteína GDF-15, que son responsables de la formación del complejo inmunitario. Estos péptidos están restringidos a las posiciones 40-55 (EVQVTM**C**I**G**ACPSQFR) y 94-114 (TDTGV**S**L**Q**TYDD**L**LAK**D**CH**C**I) en la secuencia de aminoácidos de GDF-15. Por tanto, estos dos péptidos comprenden un epítopo de la proteína GDF-15 que se une al anticuerpo B1-23.

35 De nuevo, dado que las regiones CDR del anticuerpo AcM B1-23 corresponden a las regiones CDR de los anticuerpos químéricos y humanizados, se espera que las propiedades de unión de estos anticuerpos sean similares.

40 Ejemplo 7: Tratamiento de la pérdida de peso inducida por cáncer con anticuerpos anti-GDF-15. En el estudio con animales subyacente n.º 140123, se inocularon 10 ratones Balb/c^{nu/nu} por grupo de tratamiento por vía subcutánea con 10x10⁶ células UACC-257 por animal en una razón volumétrica 1:1 con Matrigel (100 µl de células + 100 µl de Matrigel). Se trataron los animales el mismo día con los anticuerpos respectivos, tal como se indica a continuación:

Grupos de estudio 1-6 (10 animales por grupo)	Cantidades de sustancias (durante 45 días)
1. Dacarbazina *	80 mg
(referencia, n.º de lote: C120522C)	
2. PBS (SIGMA, n.º de lote: RNBD0341)	30 ml
3. Anticuerpo anti-GDF-15 B1-23 (murino, n.º de lote: 515980)	75 mg
4. Anticuerpo anti-GDF-15 de B1-23 químérico (químérico; lote: PR0057)	75 mg
5. Anticuerpo anti-GDF-15 H1L5 (B1-23 humanizado, lote: PR3176)	75 mg
6. Anticuerpo de control de isotipo B12	75 mg

Grupos de estudio 1-6
(10 animales por grupo)

(Anticuerpo de isotipo, lote: ID3195)

* Detidemac 500 mg (cad.: 03/2015)

Cantidades de sustancias
(durante 45 días)

El grupo de dacarbazina (grupo 1) sirvió como grupo de referencia/control positivo para la detención del crecimiento tumoral (fármaco citostático para el tratamiento del melanoma maligno en humanos).

5 El grupo de PBS (grupo 2) sirvió como grupo de control de crecimiento/control de vehículo, porque todas las sustancias usadas de los otros grupos se administraron en PBS.

El grupo del anticuerpo candidato principal B1-23 murino (grupo 3) sirvió como grupo de referencia para una comparación con el anticuerpo B1-23 químérico y con el B1-23 H1L5 humanizado (grupos 4 y 5).

10 El grupo 4 es el grupo del anticuerpo candidato principal B1-23 quimerizado, que contiene dominios variables murinos y dominios constantes de un anticuerpo IgG1 humano (estructura principal de trastuzumab).

15 El grupo 5 es el grupo del anticuerpo candidato principal de B1-23 humanizado H1L5, que contiene regiones de entramado humanizadas dentro de las regiones variables murinas y dominios constantes de un anticuerpo IgG1 humano (estructura principal de trastuzumab).

20 El grupo 6 es el grupo del anticuerpo de isotipo B12. Para este grupo de control de isotipo, el anticuerpo B12 (número de lote: ID3195) fue producido por la empresa Evitria AG. B12 se une a un antígeno de VIH y, por tanto, no debe unirse ni a antígenos en ratones desnudos ni a antígenos del tumor humano. B12 se seleccionó como control de isotipo altamente adecuado, porque la estructura principal de inmunoglobulina de B12 también consiste en el anticuerpo IgG1 humano trastuzumab y, por tanto, es casi idéntico a los anticuerpos B1-23 químérico y de B1-23 humanizado H1L5, excepto por sus regiones variables.

25 Se llevó a cabo el estudio en un modo doble ciego para el tratamiento con los anticuerpos y para el tratamiento con PBS.

30 En los grupos 1, 2 y 6 que no recibieron anticuerpos anti-GDF-15, se observó más del 10% de pérdida de peso corporal (es decir, pérdida de peso con respecto a un peso corporal relativo de menos del 90% en comparación con el día 0). En cambio, en los grupos que habían recibido tratamiento con los anticuerpos anti-GDF-15 B1-23, B1-23 químérico y B1-23-H1L5 humanizado, respectivamente, se observó un aumento del peso corporal (figura 5).

35 Por tanto, sorprendentemente, el tratamiento con todos los anticuerpos anti-GDF-15 sometidos a prueba previene por completo la pérdida de peso inducida por cáncer en ratones. Este efecto fue significativo para todos los grupos tratados con anticuerpos anti-GDF-15 (ANOVA de dos vías; $p < 0,05$).

40 También cabe señalar que los ratones de los grupos que no recibieron tratamiento con anticuerpos anti-GDF-15 mostraron una pérdida de peso de más del 10%. En humanos, una pérdida de peso de tan sólo el 5% durante un periodo de 6 meses se considera indicativa de caquexia por cáncer (Fearon K. et al.: Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. Lancet Oncol. mayo de 2011; 12(5):489-95.). Dada la mayor pérdida de peso de los ratones observada en el presente estudio que incluso superó el 10%, se espera que los ratones en el estudio, que no recibieron tratamiento con anticuerpos anti-GDF-15, no sólo mostraran pérdida de peso sino que también mostraran caquexia por cáncer. Este efecto se previene por completo por los anticuerpos anti-GDF-15 sometidos a prueba. Por tanto, se espera que los anticuerpos anti-GDF-15 según la invención sean capaces tanto de tratar la pérdida de peso inducida por cáncer como de tratar la caquexia por cáncer.

45 50 En particular, la extensión de la pérdida de peso no se correlacionó con el tamaño tumoral respectivo ($r^2=10^{-6}$). Si la prevención de la pérdida de peso fuera sólo un efecto secundario resultante de la inhibición del crecimiento de cáncer y los tamaños tumorales más pequeños, se esperaría una correlación entre el tamaño tumoral y la pérdida de peso. Por tanto, la falta de dicha correlación muestra que los usos de los anticuerpos anti-GDF-15 según la invención dan como resultado dos efectos de tratamiento independientes:

- una inhibición del crecimiento de cáncer, y
- una prevención de la pérdida de peso como efecto adicional, que es independiente de la inhibición del crecimiento de cáncer y que se espera que refleje una prevención de caquexia por cáncer.

55 A pesar de su independencia mecanicista, se observó que estos efectos pueden producirse simultáneamente en los mismos animales.

60 Además de evaluar el peso corporal medio de los ratones, se evaluó el consumo de alimentos de los ratones

mediante comparaciones directas de los grupos de estudio (tabla 1). En particular, el consumo de alimentos de los ratones en los grupos de anticuerpos anti-GDF-15 (B1-23, B1-23 quimérico y B1-23-H1L5 humanizado) fue significativamente mayor que el consumo de alimentos de los ratones en los grupos que no recibieron los anticuerpos anti-GDF-15.

5

Tabla 1:

	Consumo de alimentos por ratón y día.	frente a B1-23 quimérico	frente a B1-23 humanizado	frente a B1-23
dacarbazina	2,8 ± 0,2 g	**	**	**
PBS	2,6 ± 0,4 g	**	**	**
B1-23 quimérico	3,5 ± 0,2 g	--	n.s.	n.s.
B12	2,7 ± 0,2 g	***	***	***
B1-23 humanizado	3,4 ± 0,2 g	n.s.	--	n.s.
B1-23	3,6 ± 0,2 g	n.s.	n.s.	--

(* p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001 según se evalúa mediante la prueba de la t de Student bilateral para datos independientes)

10 Tabla 1: Evaluación comparativa del consumo de alimentos entre los diferentes grupos de tratamiento. Para los intervalos de tiempo medidos (días 17-20, días 20-24, días 24-27, días 27-31, días 31-34), se calculó el consumo promedio de alimentos por ratón y día para cada grupo respectivo. Los valores se indican junto con su desviación estándar.

15 La calidad del anticuerpo anti-GDF-15 humanizado B1-23-H1L5 usado en el estudio se sometió a prueba usando electroforesis en gel y tinción con Coomassie de los anticuerpos (véase la figura 6). Especialmente, la banda del anticuerpo anti-GDF-15 humanizado B1-23-H1L5 era nítida y clara, mientras que las bandas del anticuerpo anti-GDF-15 B1-23 murino y el anticuerpo de control B12 parecían menos nítidas y a un mayor peso molecular. Esto sugiere que el anticuerpo anti-GDF-15 humanizado B1-23-H1L5 no es propenso a la agregación, y que cierta agregación puede haber desplazado el peso molecular de los otros anticuerpos a mayores valores.

20 Además, mediante el uso de un ensayo colorimétrico, se confirmó que todos los anticuerpos anti-GDF-15 usados en el estudio se unían a GDF-15 de manera dependiente de la concentración. Para determinar la unión de las variantes del anticuerpo B1-23 a GDF-15, se realizó un experimento de ELISA colorimétrico. El anticuerpo B12 sirvió como anticuerpo de isótipo, que no se une al GDF-15 humano. Por tanto, se recubrieron placas de 96 pocillos Maxisorp (Nunc) con hrGDF-15 (25 ng de proteína por pocillo, 50 µl de volumen) durante la noche a 4°C. Al día siguiente, se lavaron las placas para retirar la proteína no unida (3 veces con 150 µl de PBS -Tween® al 0,05%) y se bloquearon los sitios de unión inespecífica con 150 µl de PBS - BSA al 1% durante 2 horas a temperatura ambiente. De nuevo, se lavaron las placas y se aplicaron diferentes variantes de anticuerpos de prueba B1-23 (50 µl de volumen). Para averiguar la especificidad de la unión del anticuerpo, se realizó una dilución de punto final partiendo de 333 ng/ml y una dilución en serie 1:3. Como control de fondo, se aplicó PBS - BSA al 1%. Tras la unión durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavaron los pocillos tal como se describió anteriormente. Como anticuerpo secundario, se aplicó IgG anti-humano conjugada con HRP (Life technologies, 1:5000) durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavaron los pocillos tal como se describió anteriormente para retirar el anticuerpo secundario no unido. Para la detección, se añadieron 50 µl de sustrato de peróxido (TMB 1:100 en acetato de sodio 0,1 M, pH 6) y tras 10 minutos de incubación, se añadieron 50 µl de disolución de detención (H₂SO₄ 2 N). Como controles negativos, se incluyeron pocillos sin recubrimiento con GDF-15 y pocillos sin anticuerpo secundario. Para el análisis, se cuantificó la densidad óptica a 450 nm usando el lector de ELISA (Tecan Sunrise) y el software Magellan correspondientes. Se observó que en comparación con el anticuerpo B12, el anticuerpo H1L5 humanizado, el anticuerpo B1-23 quimérico y el anticuerpo B1-23 murino mostraron una unión a GDF-15 claramente dependiente de la concentración.

40 Ejemplo 8: Determinación de los valores de Kd de los anticuerpos anti-GDF-15. Se compararon los valores de Kd de diferentes anticuerpos anti-GDF-15 usando la tecnología de biosensores de chip de oro Surface Acoustic Wave (SAW) (SAW Instruments GmbH, Schwerberger Str. 16, D-53177 Bonn, Alemania):

Anticuerpo:	Valor de Kd (nM)
Anticuerpo anti-GDF-15 B1-23 (murino, IgG2a)	28.8 nM
Anticuerpo anti-GDF-15 de B1-23 quimérico (quimerizado, IgG1 humana)	14 nM

Anticuerpo:	Valor de Kd (nM)
B1-23 humanizado H1L5 (humanizado, IgG1 humana)	5,62 nM
Rituxumab (anticuerpo de control)	1116 nM
Herceptina (anticuerpo de control)	Sin unión

El anticuerpo murino (B1-23) así como el anticuerpo B1-23 químérico estaban presentes en forma purificada. El anticuerpo de B1-23 humanizado H1L5 era un sobrenadante de cultivo de células CHO libre de suero. El valor de Kd del B1-23 murino se desvió de los valores de Kd determinados mediante análisis Biacore® (resonancia de plasmón superficial) en un factor de 35.

Esta desviación puede explicarse, aparte de las diferencias en los métodos de medición, por una disponibilidad reducida de anticuerpo B1-23 murino libre, ya que se descubrió que este anticuerpo puede formar agregados en su forma como anticuerpo de ratón. Por tanto, se estabilizó la disolución del anticuerpo B1-23 murino mediante la adición de BSA al 0,2%. Por tanto, la unión del anticuerpo a la albúmina puede haber reducido la disponibilidad del anticuerpo B1-23 murino y podría explicar las diferencias en los valores de afinidad obtenidos mediante los diferentes métodos de medición. En comparación con el anticuerpo B1-23 murino, el anticuerpo de B1-23 humanizado H1L5 sorprendentemente no mostró tendencia a agregarse (véase también el ejemplo 9 a continuación).

En el presente ensayo, el anticuerpo anti-GDF-15 de B1-23 químérico y el anticuerpo de B1-23 humanizado H1L5 mostraron afinidades por el GDF-15 humano que fueron aproximadamente 2 veces y 5 veces mayores, respectivamente, que la afinidad del anticuerpo anti-GDF-15 B1-23 murino. Por tanto, el anticuerpo anti-GDF-15 de B1-23 químérico y el anticuerpo de B1-23 humanizado H1L5 son anticuerpos de alta afinidad.

Ejemplo 9: Estudios de agregación de los anticuerpos anti-GDF-15

Para someter a prueba las propiedades de agregación de los anticuerpos anti-GDF-15, se agitaron muestras de anticuerpos durante 48 horas a temperatura ambiente en tubos de microcentrífuga y, posteriormente, se analizaron visualmente los tubos para detectar precipitados de anticuerpos agregados.

Se observó que, en comparación con el anticuerpo B1-23 murino, el anticuerpo de B1-23 humanizado H1L5 sorprendentemente no mostró tendencia a agregarse, ni siquiera cuando el anticuerpo sólo estaba presente en solución salina tamponada con fosfato (PBS), y cuando no había presentes proteínas estabilizadoras tales como BSA.

Además, en experimentos de congelación/descongelación y dilución, se observó que el anticuerpo de B1-23 humanizado H1L5 no se agregaba durante ninguna de las etapas de dilución o ciclos de congelación/descongelación.

Además, se llevó a cabo el siguiente experimento (véase la figura 7):

Se cargaron 5 mg de anticuerpo (B1-23, B1-23 químérico = "Quim. B1-23", H1L5) en columnas de proteína A Proteus™, se eluyeron y se recogieron en un tampón TRIS a pH fisiológico. Después de la elución, se evaluó la calidad de los anticuerpos purificados mediante análisis en gel con azul brillante de Coomassie. La concentración de los anticuerpos eluidos se midió fotométricamente así como en un ensayo de Bradford (Roti-Quant, Carl Roth, Karlsruhe, Alemania). Las 3 disoluciones de anticuerpos (B1-23, Quim. B1-23, H1L5) mostraron concentraciones similares y se ajustaron a 0,5 mg/ml. Los anticuerpos se concentraron 10 veces a través de columnas de centrifugación (Centricon, MWCO 30). Después de esta etapa, la turbidez indicó la presencia de precipitados en la muestra que contenía B1-23, mientras que Quim. B1-23 y H1L5 no mostraron signos de agregación. Todos los eluatos concentrados se centrifugaron durante 5 minutos a 13000 rpm para precipitar los agregados de anticuerpos. La cantidad restante de anticuerpos solubles se determinó finalmente mediante el ensayo de Bradford del sobrenadante.

Se espera que estas propiedades de los anticuerpos sean ventajosas para la formulación clínica de los anticuerpos.

G) Aplicabilidad industrial

Los anticuerpos, las partes de unión a antígeno de los mismos y los kits según la presente invención pueden fabricarse a nivel industrial y venderse como productos para su uso (por ejemplo, para tratar caquexia por cáncer y cáncer), según criterios conocidos para la fabricación de productos farmacéuticos. Por consiguiente, la presente invención es aplicable a nivel industrial.

Bibliografía

- 5 Arbab Ghahroudi M *et al.*: "Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies." FEBS Lett. 15 de sep. de 1997;414(3):521-6.
- 10 Ausubel *et al.*: "Current Protocols in Molecular Biology." Greene Publishing Associates and Wiley Interscience; Nueva York 1992.
- 15 Bauskin AR *et al.*: "The propeptide mediates formation of stromal stores of PROMIC-1: role in determining prostate cancer outcome." Cancer Res. 15 de marzo de 2005;65(6):2330-6.
- 20 Brown DA *et al.*: "Macrophage inhibitory cytokine 1: a new prognostic marker in prostate cancer." Clin Cancer Res. 1 de nov. de 2009;15(21):6658-64.
- 25 Chothia C *et al.*: Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. Nature. 21-28 de dic. de 1989;342(6252):877-83.
- 30 Clackson T *et al.*: "Making antibody fragments using phage display libraries." Nature. 15 de agosto de 1991;352(6336):624-8.
- 35 Fearon KC.: Cancer cachexia: developing multimodal therapy for a multidimensional problem. Eur J Cancer. mayo de 2008;44(8):1124-32.
- 40 Fearon K. *et al.*: Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. Lancet Oncol. mayo de 2011; 12 (5) :489-95.
- 45 Giudicelli V *et al.*: IMGT/V-QUEST, an integrated software program for immunoglobulin and T cell receptor V-J and V-D-J rearrangement analysis. Nucleic Acids Res. 1 de julio de 2004;32(Web Server issue):W435-40.
- 50 Harlow and Lane: "Antibodies: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York 1988.
- 55 Holliger P *et al.*: "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments." Proc Natl Acad Sci U S A. 15 de julio de 1993;90(14):6444-8.
- 60 Holt LJ *et al.*: "Domain antibodies: proteins for therapy." Trends Biotechnol. nov. de 2003;21(11):484-90.
- 65 Huang CY *et al.*: "Molecular alterations in prostate carcinomas that associate with in vivo exposure to chemotherapy: identification of a cytoprotective mechanism involving growth differentiation factor 15." Clin Cancer Res. 1 de oct. de 2007;13(19):5825-33.
- 70 Johnen H *et al.*: "Tumor-induced anorexia and weight loss are mediated by the TGF-beta superfamily cytokine MIC-1." Nat Med. nov. de 2007;13(11):1333-40.
- 75 Jones PT *et al.*: "Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse." Nature. 29 de mayo-4 de junio de 1986;321(6069):522-5.
- 80 Kabat *et al.*: Sequences of proteins of immunological interest, U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. 1983.
- 85 Köhler G y Milstein C: "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." Nature. 7 de agosto de 1975;256(5517):495-7.
- 90 Marks JD *et al.*: "By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage." J Mol Biol. 5 de dic. de 1991;222(3):581-97.
- 95 Mimeault M y Batra SK: "Divergent molecular mechanisms underlying the pleiotropic functions of macrophage inhibitory cytokine-1 in cancer." J Cell Physiol. sep. de 2010;224(3):626-35.
- 100 Murphy KT y Lynch GS: Update on emerging drugs for cancer cachexia. Expert Opin Emerg Drugs. dic. de 2009;14(4):619-32.
- 105 Paul, W.E. (Ed.): "Fundamental Immunology" 2^a ed. Raven Press, Ltd., Nueva York 1989.
- 110 Documento WO 2014/049087.

- Remington's Pharmaceutical Sciences, Ed. AR Gennaro, 20^a edición, 2000, Williams & Wilkins, PA, EE.UU.
- 5 Riechmann L *et al.*: "Reshaping human antibodies for therapy." *Nature*. 24 de marzo de 1988;332(6162):323-7.
- Roth P *et al.*: "GDF-15 contributes to proliferation and immune escape of malignant gliomas." *Clin Cancer Res*. 1 de agosto de 2010;16(15):3851-9.
- 10 Saerens D *et al.*: "Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics." *Curr Opin Pharmacol*. oct. de 2008;8(5):600-8. publicación electrónica de 22 de agosto de 2008.
- Sambrook *et al.*: "Molecular Cloning: A Laboratory Manual.", 2^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York 1989.
- 15 Siegel DL: "Recombinant monoclonal antibody technology." *Transfus Clin Biol*. enero de 2002;9(1):15-22.
- Stefanescu R. *et al.*, *Eur.J.Mass Spectrom*. 13, 69-75 (2007).
- 20 Suckau *et al.* *Proc Natl Acad Sci U S A*. diciembre de 1990; 87(24):9848-9852.
- Tisdale MJ.: Mechanisms of cancer cachexia. *Physiol Rev*. abr. de 2009;89(2):381-410.
- Weinberg R. *et al.*: *The Biology of Cancer*. Garland Science: Nueva York 2006. 850p.
- 25 Documento WO 2005/099746.
- Documento WO 2009/021293.

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo monoclonal capaz de unirse a GDF-15 humano, o parte de unión a antígeno del mismo, en el que el dominio variable de cadena pesada comprende una región CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 3, una región CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 4 y una región CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 5, y en el que el dominio variable de cadena ligera comprende una región CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 6, una región CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos ser-ala-ser y una región CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 7,
- 5 en el que el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 28, o una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 90% a la misma, y en el que el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 31, o una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 90% a la misma,
- 10 en el que el dominio constante de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 29, o una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 85% a la misma, y en el que el dominio constante de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 32, o una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 85% a la misma.
- 15
- 20 2. Anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo o la parte de unión a antígeno del mismo tiene una constante de disociación de equilibrio para el GDF-15 humano que es igual a o menor de 10 nM, tal como se mide mediante mediciones de resonancia de plasmón superficial.
- 25 3. Anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que el anticuerpo o la parte de unión a antígeno del mismo es capaz de inhibir el crecimiento de cáncer en un mamífero.
- 30 4. Anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 28, o una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 95%, más preferiblemente al menos el 98%, todavía más preferiblemente al menos el 99% a la misma, y en el que el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 31, o una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 95%, más preferiblemente al menos el 98%, todavía más preferiblemente al menos el 99% a la misma.
- 35 5. Anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el dominio constante de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 29, o una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95% a la misma, y en el que el dominio constante de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 32, o una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95% a la misma;
- 40 45 o en el que el dominio constante de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 29, o una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 98%, preferiblemente al menos el 99% a la misma, y en el que el dominio constante de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 32, o una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 98%, preferiblemente al menos el 99% a la misma;
- 50 55 60 5. o en el que el dominio constante de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 29, y en el que el dominio constante de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 32.
6. Anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado, y en el que preferiblemente todos los dominios variables del anticuerpo son dominios variables humanizados.
7. Anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 28, y en el que el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 31; y/o
- 65 6. en el que la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 27, y en el que la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 30.

8. Anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la unión es unión a un epítopo conformacional o discontinuo en GDF-15 humano que está compuesto por las secuencias de aminoácidos de SEQ ID No: 25 y SEQ ID No: 26.
- 5 9. Anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso en un método para tratar caquexia por cáncer y/o cáncer en un mamífero, en el que el método es preferiblemente un método tanto para tratar el cáncer como para tratar la caquexia por cáncer en el mismo mamífero, y en el que el mamífero es preferiblemente un paciente humano.
- 10 10. Kit que comprende el anticuerpo o la parte de unión a antígeno del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
- 15 11. Vector de expresión que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica para el anticuerpo o la parte de unión a antígeno del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
12. Línea celular capaz de producir un anticuerpo o una parte de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 20 13. Anticuerpo monoclonal capaz de unirse a GDF-15 humano, o parte de unión a antígeno del mismo, en el que
- 25 (i) el dominio variable de cadena pesada comprende una región CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 3, una región CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 4 y una región CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 5, y en el que el dominio variable de cadena ligera comprende una región CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 6, una región CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos ser-ala-ser y una región CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 7, en el que el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 28, o una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 90% a la misma, y en el que el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 31, o una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 90% a la misma,
- 30 35 y/o
- (ii) la unión es unión a un epítopo conformacional o discontinuo en GDF-15 humano que está compuesto por las secuencias de aminoácidos de SEQ ID No: 25 y SEQ ID No: 26,
- 40 para su uso en un método para tratar la caquexia por cáncer en un mamífero.
- 45 14. Anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo para su uso según la reivindicación 13, en el que el anticuerpo o la parte de unión a antígeno del mismo tiene una constante de disociación de equilibrio para el GDF-15 humano que es igual a o menor de 10 nM, tal como se mide mediante mediciones de resonancia de plasmón superficial.
- 50 15. Anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 13-14, en el que el anticuerpo o la parte de unión a antígeno del mismo es capaz de inhibir el crecimiento de cáncer en un mamífero.
- 55 16. Anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 13-15 para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 13-15, en el que
- en el método, sólo se tratan mamíferos que padecen ambos de
- i) cáncer, y
- ii) caquexia por cáncer;
- 60 65 y/o
- en el que el método es un método tanto para tratar el cáncer como para tratar la caquexia por cáncer en el mismo mamífero, y/o
- en el que el mamífero es un paciente humano.

17. Anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16 para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, en el que el GDF-15 humano es GDF-15 humano recombinante que tiene la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID No: 8.
- 5 18. Anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 13-17 para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 13-17,
- 10 en el que el dominio constante de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 29, o una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 85%, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95% a la misma, y en el que el dominio constante de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 32, o una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 85%, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95% a la misma;
- 15 o en el que el dominio constante de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 29, o una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 98%, preferiblemente al menos el 99% a la misma, y en el que el dominio constante de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 32, o una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 98%, preferiblemente al menos el 99% a la misma;
- 20 o en el que el dominio constante de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 29, y en el que el dominio constante de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 32.
- 25 19. Anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 13-18 para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 13-18, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado, y en el que todos los dominios variables del anticuerpo son dominios variables humanizados.
- 30 20. Anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 13-19 para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 13-19, en el que el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 28, o una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 95%, más preferiblemente al menos el 98%, todavía más preferiblemente al menos el 99% a la misma, y en el que el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 31, o una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos el 95%, más preferiblemente al menos el 98%, todavía más preferiblemente al menos el 99% a la misma;
- 35 o en el que el dominio variable de cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 28, y en el que el dominio variable de cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 31.
- 40 21. Anticuerpo o parte de unión a antígeno del mismo según una cualquiera de las reivindicaciones 13-20 para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 13-20, en el que la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 27, y en el que la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 30.

Figura 1

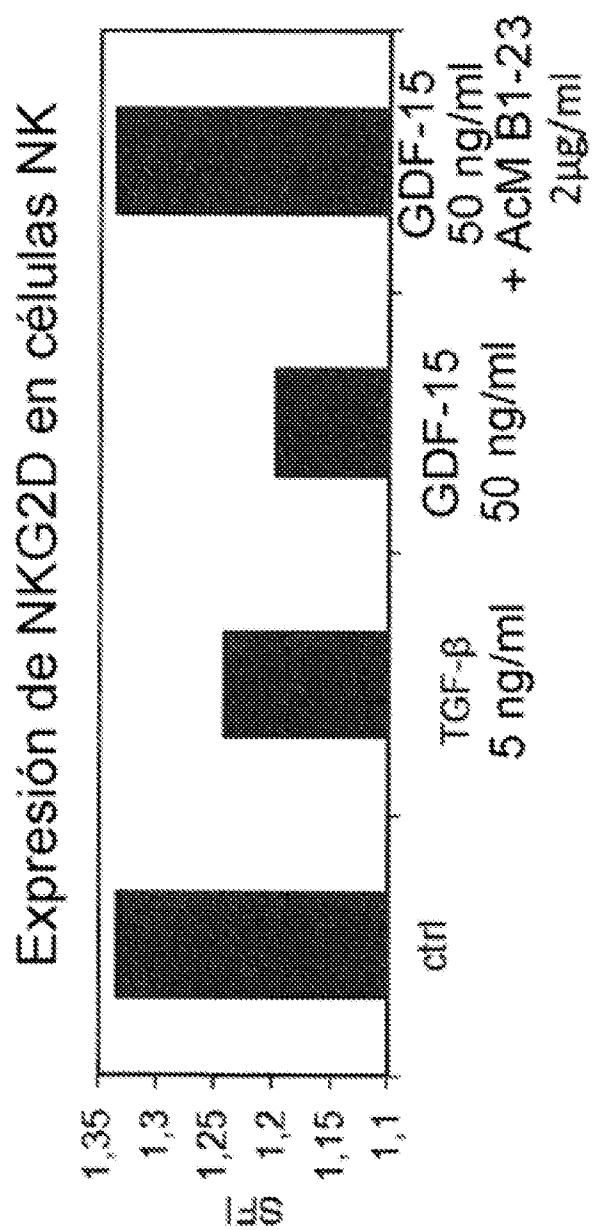


Figura 2

Fosforilación de AKT en la línea celular de cáncer de ovario SKOV-3

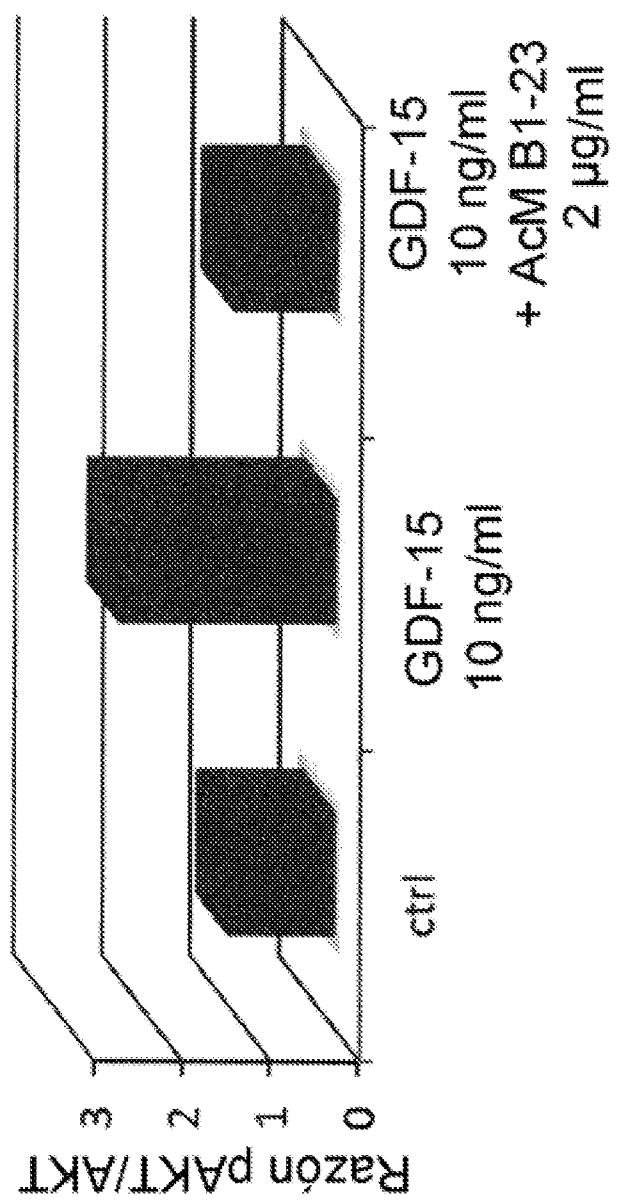


Figura 3

Fosforilación de JNK1/2 en células immunitarias

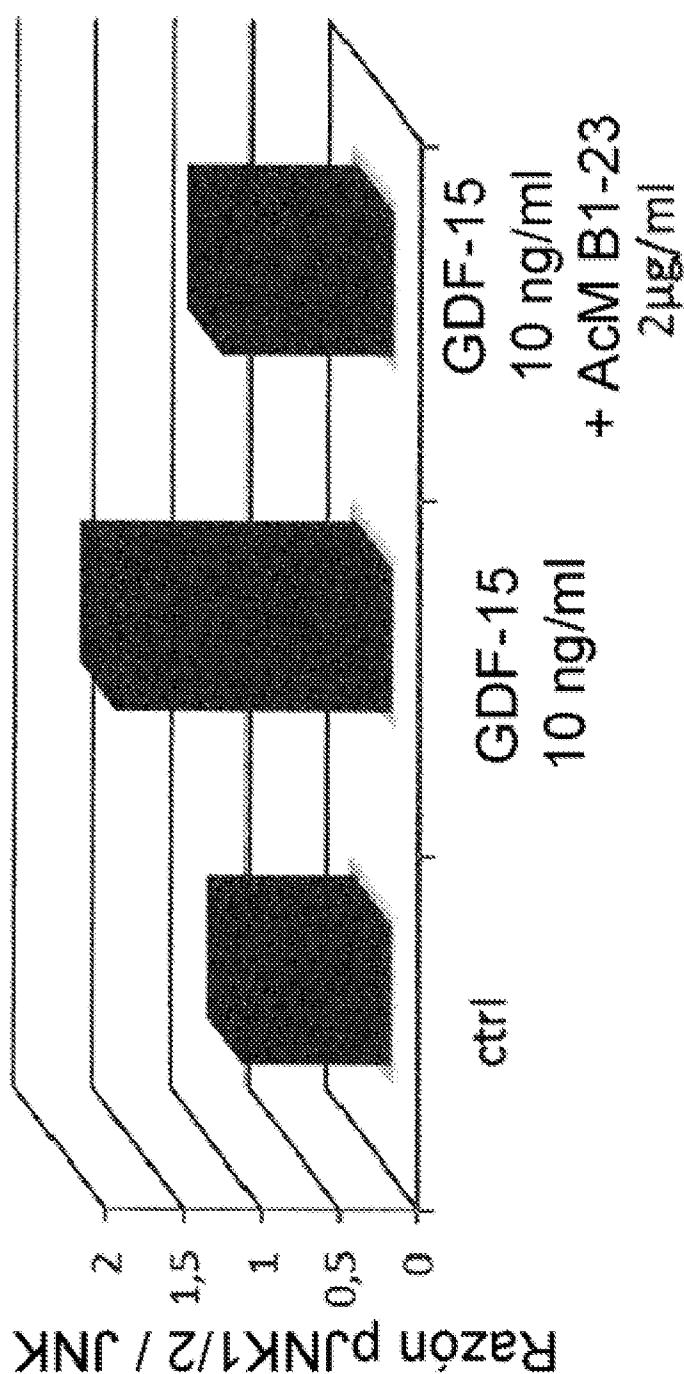


Figura 4

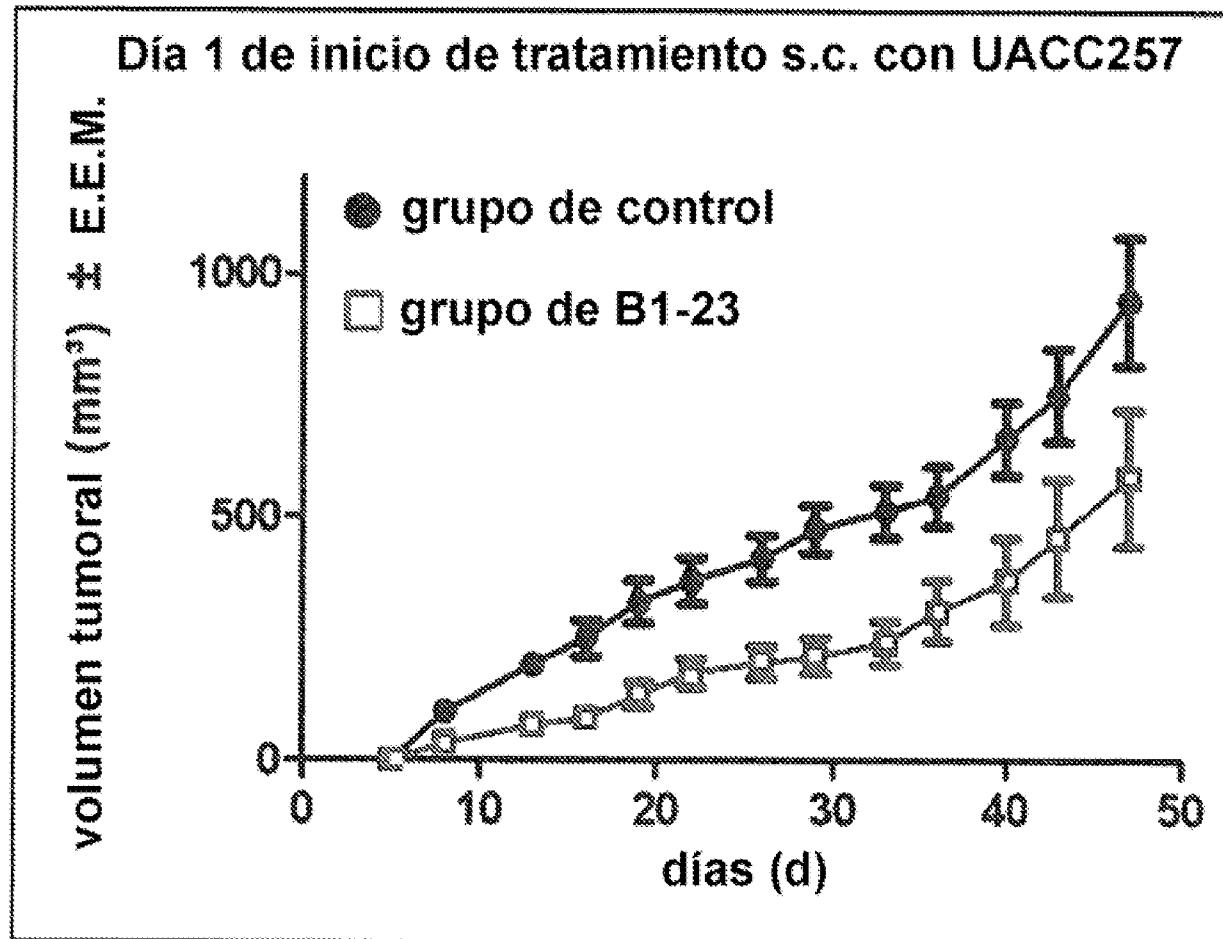


Figura 5

Peso corporal medio de ratones tras inoculación s.c.
con UACC-257

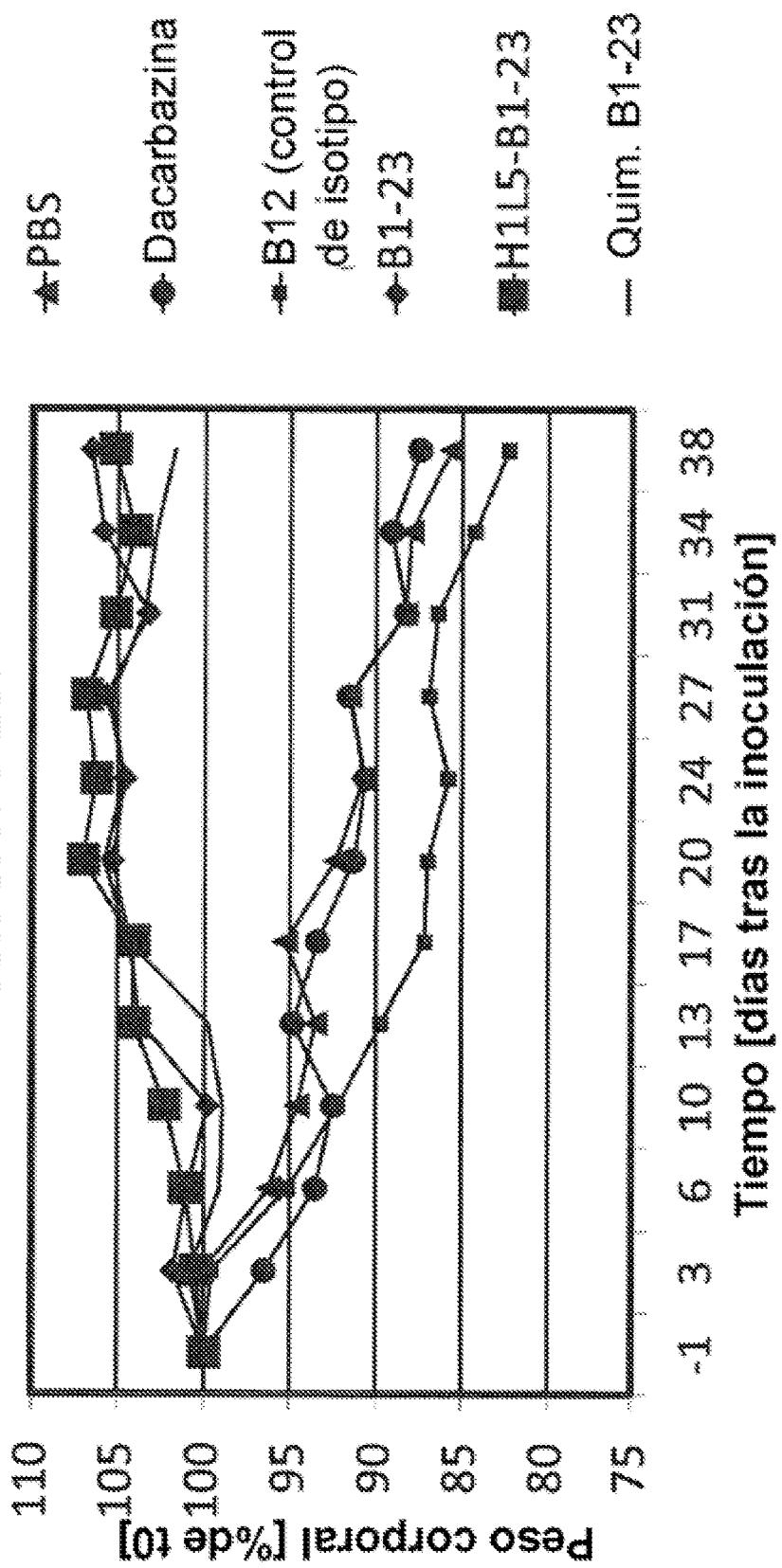


Figura 6

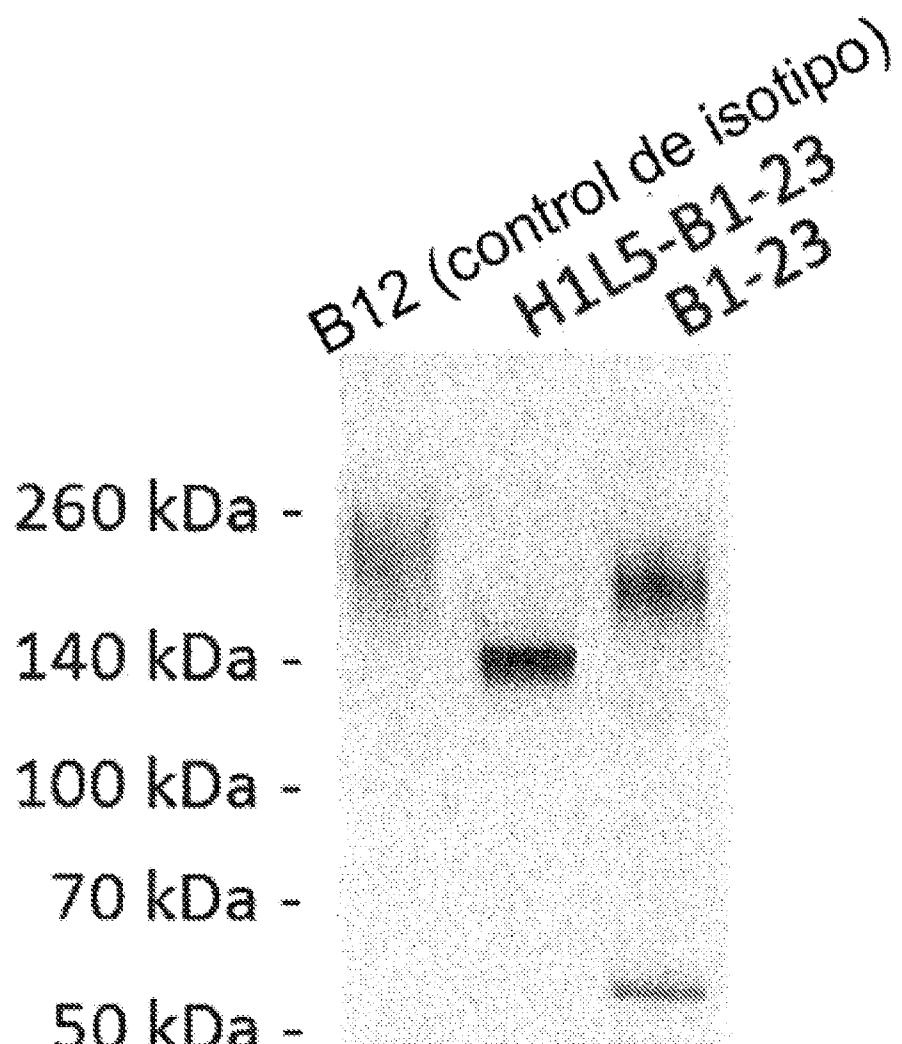


Figura 7

