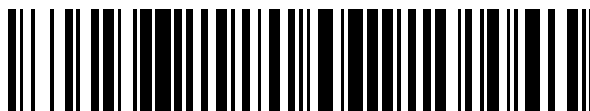


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 417 808**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18	(2006.01)
C12N 5/20	(2006.01)
G01N 33/574	(2006.01)
G01N 33/68	(2006.01)
G01N 33/577	(2006.01)
C07K 14/47	(2006.01)
C07K 16/40	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2006 E 10010572 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2013 EP 2332988**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína de mantenimiento de minicromosomas 2 y métodos para su uso en la detección de enfermedades cervicales**

30 Prioridad:

27.04.2005 US 675305 P
16.09.2005 US 718082 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.08.2013

73 Titular/es:

TRIPATH IMAGING, INC. (100.0%)
780 Plantation Drive
Burlington, NC 27215, US

72 Inventor/es:

FISCHER, TIMOTHY J.;
MALINOWSKI, DOUGLAS P. y
TAYLOR, ADRIANN J.

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 417 808 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína de mantenimiento de minicromosomas 2 y métodos para su uso en la detección de enfermedades cervicales.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a anticuerpos capaces de unirse a MCM2 y a métodos de uso de estos anticuerpos, concretamente en el diagnóstico de enfermedades cervicales.

10 **Antecedentes de la Invención**

El carcinoma de cérvix es el segundo neoplasma más común en mujeres, representando aproximadamente un 12% de todos los cánceres femeninos y ocasionando aproximadamente 250.000 muertes por año. Baldwin et al. (2003) Nature Reviews Cancer 3: 1-10. En muchos países en desarrollo en los que todavía no se encuentran disponibles programas de escrutinio masivo, el problema clínico es más serio. El cáncer cervical en estos países es la causa número uno de muerte en mujeres.

La mayoría de los casos de cáncer cervical representan carcinomas de células escamosas, aunque también se observan adenocarcinomas. El cáncer cervical puede ser evitado por medio de escrutinio de la población ya que éste evoluciona a través de fases intraepiteliales no invasivas bien definidas, que pueden ser distinguidas morfológicamente. Williams et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 14932-14937. Si bien no se conoce cómo se transforman las células normales, el concepto de un espectro continuo de cambios histopatológicos a partir del epitelio estratificado, normal por medio de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) a cáncer invasivo ha sido ampliamente aceptado durante años. El precursor del cáncer cervical es la displasia, también conocida en la técnica como NIC o lesiones intraepiteliales escamosas (LIE). Las anomalías intraepiteliales escamosas se pueden clasificar utilizando el sistema triple (NIC) o doble (Bethesda). En el sistema Bethesda, las lesiones intraepiteliales escamosas de grado bajo (LLIE), que corresponden a NICI e infección por VPH, generalmente representan infecciones por VPH productivas con un riesgo de progreso relativamente bajo a enfermedad invasiva. Las lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (HLIE), que corresponden a NICII y NICIII en el sistema triple, muestran un riesgo de progreso mayor a cáncer cervical que LLIE, aunque tanto LLIE como HLIE se contemplan como precursores potenciales de malignidad. Las muestras de los pacientes también se pueden clasificar como ASCUS (células escamosas atípicas de importancia no determinada) o AGUS (células glandulares atípicas de importancia no determinada) con este sistema.

Se ha establecido una fuerte asociación del cáncer cervical y la infección por tipos de virus de papiloma humano (HPV) de alto riesgo, tales como los tipos 16, 18, y 31. De hecho, un gran cúmulo de evidencias epidemiológicas y de biología molecular ha establecido la infección por VPH como un factor causal en la enfermedad cervical. Por otra parte, el VPH se encuentra en un 85% o más de los casos de enfermedad cervical de alto grado. Sin embargo, la infección por VPH es muy común, produciéndose en un 5-15% de las mujeres de más de 30 años de edad, pero pocas mujeres positivas al VPH desarrollarán alguna vez una enfermedad cervical de alto grado o cáncer. La presencia de VPH solo es indicativa únicamente de infección, no de enfermedad cervical de alto grado, y, por lo tanto, el ensayo para la infección para VPH solo da como resultado muchos falsos positivos. Véase, por ejemplo, Wright et al. (2004) Obstet. Gynecol. 103: 304-309.

Las publicaciones actuales sugieren que el VPH infecta las células pluripotenciales basales dentro del tejido subyacente del cérvix uterino. La diferenciación de las células pluripotenciales en queratinocitos maduros, con la migración resultante de las células al epitelio cervical estratificado, está asociada con la replicación viral del VPH y la re-infección de las células. Durante este proceso de replicación viral, se producen numerosos cambios celulares que incluyen la desregulación del ciclo, la proliferación activa, la replicación del ADN, la activación transcripcional y la inestabilidad genómica (Crum (2000) Modern Pathology 13: 243-251; Middleton et al. (2003) J. Virol. 77: 10186-10201; Pett et al. (2004) Cancer Res. 64: 1359-1368).

La mayor parte de las infecciones por VPH tienen una naturaleza transitoria, resolviéndose la infección viral por sí misma en un período de 12 meses. Para aquellos individuos que desarrollan infecciones persistentes con uno o más subtipos oncogénicos de VPH, existe el riesgo de desarrollo de neoplasia en comparación con los pacientes sin infección por VPH. Dada la importancia del VPH en el desarrollo de neoplasia cervical, la detección clínica del VPH se ha convertido en una importante herramienta de diagnóstico en la identificación de pacientes con riesgo de desarrollo de neoplasia cervical. La utilidad clínica del escrutinio basado en el VPH para enfermedades cervicales se encuentra en su valor predictivo negativo. Un resultado negativo para el VPH combinado con una historia de pruebas de Papanicolau normales es un indicador excelente de un estado libre de enfermedad y un bajo riesgo de desarrollo de neoplasia cervical durante los 1-3 años siguientes. Sin embargo, un resultado positivo para el VPH no es un diagnóstico de enfermedad cervical; en lugar de eso es una indicación de infección. Aunque la mayor parte de las infecciones por VPH es transitoria y se aclarará espontáneamente en un período de 12 meses, una infección

persistente con un subtipo viral de VPH de alto riesgo indica un riesgo mayor de desarrollo de neoplasia cervical. Para complementar el ensayo de VPH, se espera que la identificación de marcadores moleculares asociados con la neoplasia cervical mejore la especificidad clínica para la diagnosis de las enfermedades cervicales.

5 El examen citológico de frotis cervical teñido de Papanicolaou (prueba de Papanicolaou) actualmente es el método de elección para detectar el cáncer cervical. La prueba de Papanicolaou es un método subjetivo que ha permanecido esencialmente inalterado durante 60 años. Existen numerosas cuestiones, no obstante, referentes a su funcionamiento. La sensibilidad referida de una única prueba de Papanicolaou (la proporción de positivos para la enfermedad que son positivos para la prueba) es baja y muestra una amplia variación (30-87%). La especificidad de una única prueba de Papanicolaou (la proporción de negativos para la enfermedad que son negativos para la prueba) podría ser tan baja como un 86% en una población en escrutinio y considerablemente más baja en la población ASCUS PLUS para la determinación de enfermedad de alto grado subyacente. Véase, Baldwin *et al.*, *supra*. Un porcentaje significativo de pruebas de Papanicolaou caracterizadas como LLIE o NICI son realmente positivas para lesiones de alto grado. Además, hasta un 10% de las pruebas de Papanicolaou se clasifican como ASCUS (células escamosas atípicas de importancia no determinada), esto es, no es posible realizar una clasificación clara como lesión normal, moderada o grave, o tumor. No obstante, la experiencia demuestra que hasta el 10% de esta población ASCUS tiene lesiones de alto grado, que por consiguiente son pasadas por alto. Véase, por ejemplo, Manos *et al.* (1999) JAMA 281: 1605-1610. Por lo tanto, se necesitan biomarcadores moleculares que sean expresados en exceso selectivamente en las enfermedades cervicales de alto grado y composiciones para la detección de estos biomarcadores, para poner en práctica métodos fiables para el diagnóstico de enfermedades cervicales de alto grado.

Las proteínas de mantenimiento de minicromosomas (MCM) juegan un papel esencial en la replicación del ADN eucariótico. Las proteínas de mantenimiento de minicromosomas (MCM) funcionan en las fases tempranas de la replicación del ADN por medio de la carga del complejo de pre-replicación sobre el ADN y actuando como una helicasa para ayudar a desenrollar el ADN dúplex durante la síntesis de novo de la hebra de ADN duplicada. Cada una de las proteínas MCM tiene motivos ATPasa dependientes de ADN en su dominio central altamente conservado. Los niveles de proteínas MCM generalmente aumentan de una manera variable a medida que las células normales progresan de la fase G0 a la G1/S del ciclo celular. En la fase G0, las proteínas MCM2 y MCM5 son mucho menos abundantes que las proteínas MCM7 y MCM3. MCM6 forma un complejo con MCM2, MCM4, y MCM7, que une la histona H3. Además, el subcomplejo de MCM4, MCM6, y MCM7 tiene actividad helicasa, que está mediada por la actividad de unión a ATP de MCM6 y la actividad de unión a ADN de MCM4. Véanse, por ejemplo, Freeman *et al.* (1999) Clin. Cancer Res. 5: 2121-2132; Lei *et al.* (2001) J. Cell Sci. 114: 1447-1454; Ishimi *et al.* (2003) Eur. J. Biochem. 270: 1089-1101.

En las primeras publicaciones se ha demostrado que las proteínas MCM, y en concreto, MCM-5, son útiles para la detección de enfermedades cervicales (Williams *et al.* (1998) Proc Natl Acad Sci U.S.A. 95: 14932-14937), así como de otros cánceres (Freeman *et al.* (1999) Clin Cancer Res. 5: 2121-2132). La literatura publicada indica que los anticuerpos para MCM-5 son capaces de detectar células neoplásicas cervicales. No se ha demostrado la especificidad para la detección de enfermedades cervicales de alto grado para MCM-5 (Williams *et al.* (1998) Proc Natl Acad Sci U.S.A. 95: 14932-14937). La detección de la expresión de MCM-5 no está restringida a las enfermedades cervicales de alto grado sino que también se detecta en la displasia de bajo grado identificada y las células proliferativas que han vuelto a entrar en el ciclo celular después de la infección con VPH de alto riesgo. Además de MCM-5, se ha demostrado que otros miembros de la familia de MCM, incluyendo MCM-2 y MCM-7 son marcadores potencialmente útiles para la detección de neoplasia cervical en muestras de tejido (Freeman *et al.* (1999) Clin Cancer Res. 5: 2121-2132; Brake *et al.* (2003) Cancer Res. 63: 8173-8180). Resultados recientes han demostrado que MCM-7 parece ser un marcador específico para la detección de enfermedad cervical de alto grado utilizando formatos de inmunoquímica (Brake *et al.* (2003) Cancer Res. 63: 8173-8180; Malinowski *et al.* (2004) Acta Cytol. 43: 696). Abcam comercializa el anticuerpo anti-MCM2 G153.

Por lo tanto existe la necesidad en la técnica de anticuerpos que sean capaces de detectar la expresión de un biomarcador que sea expresado en exceso selectivamente en enfermedades cervicales de alto grado. Tales anticuerpos podrían ser utilizados en métodos para diferenciar enfermedades de alto grado de estados que no se consideran enfermedades clínicas, tales como la infección por VPH en fase temprana y la displasia leve.

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

Se proporcionan composiciones y métodos para diagnosticar enfermedades cervicales de alto grado. Las composiciones incluyen anticuerpos monoclonales capaces de unirse a proteínas biomarcadoras nucleares de la invención, concretamente proteínas MCM, más concretamente MCM2. Los fragmentos de unión a antígenos y las variantes de estos anticuerpos monoclonales, las líneas celulares de hibridoma capaces de producir estos anticuerpos, y los kits que comprenden los anticuerpos monoclonales de la invención también están incluidos en la presente memoria.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se proporcionan las composiciones y los métodos para diagnosticar una enfermedad cervical de alto grado. Las composiciones incluyen anticuerpos monoclonales que son capaces de unirse a proteínas biomarcadoras nucleares que son expresadas en exceso selectivamente en las enfermedades cervicales de alto grado, concretamente proteínas MCM, más concretamente MCM2. También se describen las líneas celulares de hibridoma que producen los anticuerpos monoclonales de la presente invención. Se proporcionan adicionalmente los kits que comprenden los anticuerpos monoclonales descritos en la presente memoria. Las presentes composiciones encuentran uso en los métodos para diagnosticar enfermedades cervicales de alto grado en un paciente.

Las composiciones de la invención incluyen anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a MCM2, o a una variante o un fragmento del mismo. En particular, se proporciona el anticuerpo para MCM2 denominado 26H6.19. La línea celular de hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal para MCM2, 26H6.19, fue depositada en el Depósito de Patentes de la Colección de Cultivos Tipo Americana (ATCC), Manassas, Virginia, 20110-2209 el 14 de Abril de 2005 y se le asignó el Número de Depósito de Patentes PTA-6667. Este depósito se mantendrá en los términos del Tratado de Budapest con el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los Fines del Procedimiento de Patentes. Este depósito se realizó meramente por conveniencia para los expertos en la técnica y no es un reconocimiento de que se requiera un depósito bajo 35 U.S.C. § 112.

También se describen en la presente memoria anticuerpos que tienen las características de unión del anticuerpo monoclonal 26H6.19. Tales anticuerpos incluyen, pero no están limitados a, anticuerpos que compiten en análisis de unión competitiva con estos anticuerpos, así como anticuerpos que se unen a un epítipo capaz de unirse al anticuerpo monoclonal 26H6.19. Asimismo se proporcionan las variantes y fragmentos del anticuerpo monoclonal 26H6.19 que conserva la capacidad para unirse específicamente a MCM2. Las composiciones incluyen adicionalmente líneas celulares de hibridoma que producen los anticuerpos monoclonales de la presente invención y kits que comprenden al menos un anticuerpo monoclonal descrito en la presente memoria.

Los "anticuerpos" y las "inmunoglobulinas" (Ig) son glicoproteínas que tienen las mismas características estructurales. Si bien los anticuerpos muestran una especificidad de unión hacia un antígeno, las inmunoglobulinas incluyen tanto anticuerpos como otras moléculas de tipo anticuerpo que carecen de especificidad hacia un antígeno. Los polipéptidos de esta última clase, por ejemplo, son producidos a bajos niveles por el sistema linfático y a niveles mayores por los mielomas.

Los términos "anticuerpo" y "anticuerpos" abarcan en sentido amplio las formas naturales de anticuerpos y anticuerpos recombinantes tales como los anticuerpos de cadena sencilla, los anticuerpos quiméricos y humanizados y los anticuerpos multi-específicos así como los fragmentos y derivados de todos los anteriores, cuyos fragmentos y derivados tienen al menos un sitio de unión antigénico. Los derivados de anticuerpos pueden comprender una proteína o un radical químico conjugados con el anticuerpo. El término "anticuerpo" se utiliza en su sentido más amplio y abarca anticuerpos totalmente ensamblados, fragmentos de anticuerpo que se pueden unir a un antígeno (p. ej., Fab', F'(ab)₂, Fv, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos biespecíficos), y péptidos recombinantes que comprenden los anteriores. Según se utiliza en la presente memoria, "anticuerpo para MCM2" hace referencia a cualquier anticuerpo que se une específicamente a MCM2 (SEQ ID NO: 1), o a una variante o fragmento del mismo, e incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos de cadena sencilla, y sus fragmentos que conservan la función de unión al antígeno del anticuerpo parental.

Los anticuerpos para MCM2 de la invención son anticuerpos óptimamente monoclonales. El término "anticuerpo monoclonal" según se utiliza en la presente memoria hace referencia a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos esencialmente homogéneos, esto es, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades mínimas.

Los "anticuerpos nativos" y las "inmunoglobulinas nativas" son normalmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 dalton, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera está conectada a una cadena pesada por medio de un enlace disulfuro covalente, si bien el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de los diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Cada cadena pesada y ligera tiene puentes disulfuro intracatenarios espaciados regularmente. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (VH) seguido de un número de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V), y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que residuos de aminoácido concretos forman una interfaz entre los dominios variables de la cadena ligera y pesada.

El término "variable" hace referencia al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren mucho en la secuencia entre los anticuerpos y se utilizan en la unión y la especificidad de cada anticuerpo concreto hacia su antígeno concreto. Sin embargo, la variabilidad no está uniformemente distribuida a lo largo de los dominios

- variables de los anticuerpos. Está concentrada en tres segmentos denominados regiones determinantes de la complementariedad (CDR) o regiones hipervariables en los dominios variables tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se denominan regiones marco (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera nativas comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan en su mayoría una configuración en lámina β , conectados por tres CDR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte de la estructura en lámina β . Las CDR de cada cadena se mantienen juntas en íntima proximidad por las regiones FR y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (véase Kabat et al., NIH Publ. No.91-3242, Vol. I, páginas 647-669 (1991)).
- Los dominios constantes no están directamente implicados en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero muestran diferentes funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos.
- El término "región hipervariable" cuando se utiliza en la presente memoria hace referencia a los residuos de aminoácido de un anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácido de una "región determinante de la complementariedad" o "CDR" (esto es, los residuos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) del dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) del dominio variable de la cadena pesada; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5 Ed. Public Health Service, National Institute of Health, i 25 Bethesda, MD. [1991]) y/o aquellos residuos de un "bucle hipervariable" (esto es, los residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) del dominio variable de la cadena ligera y 2632 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) del dominio variable de la cadena pesada; Clothia y Lesk, J. Mol. Biol., 196: 901-917 [1987]). Los residuos del "Marco" o "FR" son aquellos residuos del dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable considerados en la presente memoria.
- Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo intacto, preferiblemente la región de unión al antígeno o variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; anticuerpos biespecíficos; anticuerpos lineales (Zapata et al. (1995) Protein Eng. 8(10):1057-1062); moléculas de anticuerpo de cadena sencilla; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. La digestión con papaína produce dos fragmentos de unión al antígeno idénticos, denominados fragmentos "Fab", cada uno con un único sitio de unión al antígeno, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad para cristalizar rápidamente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación con el antígeno y todavía es capaz de presentar reacción cruzada con el antígeno.
- "Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento y unión al antígeno completo. En una especie Fv de dos cadenas, esta región consiste en un dímero de un dominio variable de la cadena pesada y uno de la cadena ligera en íntima asociación no covalente. En una especie Fv de cadena sencilla, un dominio variable de la cadena pesada y uno de la cadena ligera pueden estar unidos covalentemente por un conector peptídico flexible de manera que las cadenas ligera y pesada se pueden asociar en una estructura "dimérica" análoga a la de una especie de Fv de dos cadenas. Es en esta configuración en la que tres CDR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión al antígeno sobre la superficie del dímero V_H-V_L. Colectivamente, las seis CDR confieren al anticuerpo especificidad de unión al antígeno. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solamente tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse a un antígeno, aunque con una afinidad inferior a la del sitio de unión completo.
- El fragmento Fab también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (C_{H1}) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab difieren de los fragmentos Fab' por la adición de unos pocos restos en el extremo carboxi del dominio C_{H1} de la cadena pesada incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación en la presente memoria para Fab' en el que el residuo o los residuos de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ fueron producidos originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas de la bisagra entre ellos.
- Los fragmentos de los anticuerpos para MCM2 están incluidos en la invención con tal que conserven la afinidad deseada del anticuerpo completo. De este modo, por ejemplo, un fragmento de un anticuerpo para MCM2 conservará la capacidad de unirse al antígeno MCM2. Tales fragmentos se caracterizan por unas propiedades similares a las del anticuerpo completo correspondiente, esto es, los fragmentos se unirán específicamente a MCM2. Dichos fragmentos son referidos en la presente memoria como fragmentos de "unión al antígeno".
- Los fragmentos de unión al antígeno adecuados de un anticuerpo comprenden una porción de un anticuerpo completo, generalmente la región de unión al antígeno o variable del mismo. Los ejemplos de los fragmentos de anticuerpos incluyen, pero no está limitado a, fragmentos Fab, F(ab')₂, y Fv y moléculas de anticuerpo de cadena sencilla. Se pretende que "Fab" represente un fragmento de unión al antígeno monovalente de una inmunoglobulina que está compuesta por la cadena ligera y parte de la cadena pesada. Se pretende que F(ab')₂ represente un fragmento de unión al antígeno bivalente de una inmunoglobulina que contiene ambas cadenas ligeras y parte de

ambas cadenas pesadas. Se pretende que los fragmentos de anticuerpo "Fv de cadena sencilla" o "sFv" representen fragmentos que comprende los dominios V_H y V_L de un anticuerpo, donde estos dominios están presentes en una cadena polipeptídica sencilla. Véanse, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos Núms. 4.946.778, 5.260.203, 5.455.030, y 5.856.456. En general, el polipéptido Fv comprende adicionalmente un conector polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite que sFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno. Para una revisión de sFv véase Pluckthun (1994) en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, Vol. 113, ed. Rosenberg and Moore (Springer-Verlag, Nueva York), págs. 269-315.

Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo pueden ser aislados de genotecas de fagos con anticuerpos generadas utilizando las técnicas descritas, por ejemplo, por McCafferty et al. (1990) *Nature* 348:552-554 (1990) y la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.514.548. Clackson et al. (1991) *Nature* 352:624-628 y Marks et al. (1991) *J. Mol. Biol.* 222:581-597 describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, utilizando genotecas de fagos. Publicaciones posteriores describen la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad (intervalo nM) mediante barajado de cadenas (Marks et al. (1992) *Bio/Technology* 10:779-783), así como infección combinatoria y recombinación *in vivo* como estrategia para construir genotecas de fagos muy grandes (Waterhouse et al. (1993) *Nucleic. Acids Res.* 21:2265-2266). De este modo, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas de hibridoma de anticuerpos monoclonales tradicionales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

Se han desarrollado varias técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos. Tradicionalmente, estos fragmentos fueron obtenidos mediante digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véase, p. ej., Morimoto et al. (1992) *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) y Brennan et al. (1985) *Science* 229:81). Sin embargo, estos fragmentos pueden ser producidos ahora directamente por medio de células anfitrionas recombinantes. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo se pueden aislar de las genotecas de fagos con anticuerpos comentadas más arriba. Alternativamente, los fragmentos Fab'-SH pueden ser recuperados directamente de *E. coli* y acoplados químicamente para formar fragmentos $F(ab')_2$ (Carter et al. (1992) *Bio/Technology* 10:163-167). De acuerdo con otro enfoque, los fragmentos $F(ab')_2$ pueden ser aislados directamente del cultivo de células anfitrionas recombinantes. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpos serán evidentes para el profesional especializado.

Preferiblemente los anticuerpos de la invención son de naturaleza monoclonal. Como se ha indicado más arriba, se pretende que "anticuerpo monoclonal" represente un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos esencialmente homogéneos, esto es, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades mínimas. El término no está limitado en lo que se refiere a la especie o fuente del anticuerpo. El término incluye inmunoglobulinas completas así como fragmentos tales como Fab, $F(ab)_2$, Fv, y otros que conservan la función de unión al antígeno del anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico, esto es, un epítipo concreto dentro de la proteína MCM2, como se define más abajo en la presente memoria. Además, en contraste con las preparaciones de anticuerpo convencionales (policlonales) que incluyen típicamente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante en el antígeno. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo si se interpreta que son obtenidos de una población esencialmente homogénea de anticuerpos, y no se considera que requiera la producción del anticuerpo mediante ningún método concreto. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a utilizar de acuerdo con la presente invención se pueden elaborar mediante el método del hibridoma descrito primero por Kohler et al. (1975) *Nature* 256:495, o se pueden elaborar mediante métodos de ADN recombinante (véase, p. ej., la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden ser aislados de genotecas de anticuerpos en fagos utilizando las técnicas descritas, por ejemplo, por Clackson et al. (1991) *Nature* 352:624-628; Marks et al. (1991) *J. Mol. Biol.* 222:581-597; y la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.514.548.

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar utilizando el método de Kohler et al. (1975) *Nature* 256:495-496, o una de sus modificaciones. Por lo general, un ratón es inmunizado con una solución que contiene un antígeno. La inmunización se puede realizar mezclando o emulsionando la solución que contiene antígeno en solución salina, preferiblemente en un coadyuvante tal como coadyuvante completo de Freund, e inyectando la mezcla o emulsión parenteralmente. Se puede utilizar cualquier método de inmunización conocido en la técnica para obtener los anticuerpos monoclonales de la invención. Después de la inmunización del animal, se separa el bazo (y opcionalmente, varios ganglios linfáticos grandes) y se disocia en células individuales. Las células del bazo pueden ser escrutadas aplicando una suspensión celular a una placa o pocillo recubierto con el antígeno de interés. Las células B que expresan la inmunoglobulina unida a la membrana específica para el antígeno (esto es, las células productoras de anticuerpo) se unen a la placa y no se enjuagan. Las células B resultantes, o todas las células de bazo disociadas, son inducidas después a fusionarse con células de mieloma para formar hibridomas productores de anticuerpos monoclonales, y cultivadas en un medio selectivo. Las células resultantes se cultivan en placa mediante dilución seriada y se analizan para determinar la producción de anticuerpos que se unen específicamente al antígeno de interés (y que no se unen a antígenos no relacionados). Los hibridomas secretores del anticuerpo monoclonal seleccionado (mAb) se cultivan después o bien *in vitro* (p. ej., en botellas para el cultivo de tejidos o

reactores de fibra hueca), o bien *in vivo* (en forma de ascitis en ratones). También se pueden producir anticuerpos monoclonales utilizando la tecnología de Múltiples Sitios de de inmunizaciones Repetidas (RIMMS). Véanse, por ejemplo, Kilpatrick et al. (1997) *Hybridoma* 16(4):381-389; Wring et al. (1999) *J. Pharm. Biomed. Anal.* 19(5):695-707; y Bynum et al. (1999) *Hybridoma* 18(5):407-411 .

5 Como alternativa al uso de hibridomas, se puede producir anticuerpo en una línea celular tal como una línea de células CHO, como se describe en las Patentes de los Estados Unidos Núms. 5.545.403; 5.545.405; y 5.998.144. Brevemente, se transfecta la línea celular con vectores capaces de expresar una cadena ligera y una cadena pesada, respectivamente. Transfectando las dos proteínas sobre vectores separados, se pueden producir anticuerpos quiméricos. Otra ventaja es la glicosilación correcta del anticuerpo. También se puede identificar y aislar un anticuerpo monoclonal escrutando una genoteca de inmunoglobulinas combinatoria recombinante (p. ej., una genoteca de presentación en fagos de anticuerpos) con una proteína biomarcadora para aislar de ese modo los miembros de la genoteca de inmunoglobulina que se unen a la proteína biomarcadora. Los kits para generar y escrutir genotecas de presentación en fagos se encuentran disponibles en el mercado (p. ej., Pharmacia *Recombinant Phage Antibody System*, Núm. de Catálogo 27-9400-01; y el kit *SurfZAP & Phage Display* de Stratagene, Núm. de Catálogo 240612). Por otra parte, los ejemplos de los métodos y reactivos particularmente adecuados para su uso en la generación y escrutinio de genotecas de presentación de anticuerpos se pueden encontrar, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.223.409; las Publicaciones PCT Núms. WO 92/18619; WO 91/17271; WO 92/20791; WO 92/15679; 93/01288; WO 92/01047; 92/09690; y 90/02809; Fuchs et al. (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay et al. (1992) *Hum. Antibody Hybridomas* 3:81-85; Huse et al. (1989) *Science* 246:1275-1281; Griffiths et al. (1993) *EMBO J.* 12:725-734.

25 En algunos aspectos de la invención, se pueden seleccionar los anticuerpos basándose en la tinción deseable de muestras citológicas, en lugar de histológicas. Esto es, en realizaciones concretas se seleccionan los anticuerpos con el tipo de muestra final en consideración (p. ej., preparaciones de citología) y para la especificidad de unión. Los anticuerpos dirigidos a biomarcadores específicos de interés, tales como MCM2, se seleccionan y se purifican por medio de un procedimiento de escrutinio de múltiples etapas.

30 También se proporcionan los anticuerpos que tienen las características de unión de un anticuerpo monoclonal de la invención. Las "características de unión" o la "especificidad de unión" cuando se utilizan en referencia a un anticuerpo significan que el anticuerpo reconoce el mismo o similar epítipo antigénico que un anticuerpo de comparación. Los ejemplos de tales anticuerpos incluyen, por ejemplo, un anticuerpo que compite con un anticuerpo monoclonal de la invención en un análisis de unión competitiva. Un experto en la técnica podría determinar si un anticuerpo interfiere competitivamente con otro anticuerpo utilizando métodos convencionales.

35 Por "epítipo" se pretende significar la parte de una molécula antigénica para la cual se produce un anticuerpo y a la cual se unirá el anticuerpo. Un "epítipo de MCM2" comprende la parte de la proteína MCM2 a la cual se une un anticuerpo monoclonal para MCM2. Los epítopos pueden comprender residuos de aminoácido lineales (esto es, los residuos dentro del epítipo están dispuestos secuencialmente uno después de otro de una manera lineal), residuos de aminoácido no lineales (referidos en la presente memoria como "epítopos no lineales"; estos epítopos no están dispuestos secuencialmente), o residuos de aminoácido tanto lineales como no lineales. Por lo general, los epítopos son secuencias de aminoácido cortas, p. ej. de aproximadamente cinco aminoácidos de longitud. Los mecanismos sistemáticos para identificar epítopos son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.708.871 y en los ejemplos mostrados más abajo. En resumen, en un método, se puede sintetizar un grupo de oligopéptidos solapantes derivados del antígeno y unirlos a una matriz de nanopipetas en fase sólida, con un único oligopéptido en cada nanopipeta. La matriz de nanopipetas puede comprender una placa de microtitulación de 96 pocillos, permitiendo analizar 96 oligopéptidos de manera simultánea, p. ej., para la unión a un anticuerpo monoclonal específico del biomarcador. Como alternativa, se encuentran disponibles en el mercado en la actualidad kits de genotecas de péptidos de presentación en fagos (New England BioLabs) para el cartografiado epitópico. Utilizando estos métodos, se puede determinar la afinidad de unión para cada posible subgrupo de aminoácidos consecutivos con el fin de identificar el epítipo al que se une un anticuerpo dado. Los epítopos también pueden ser identificados por deducción cuando se utilizan secuencias peptídicas de la longitud del epítipo para inmunizar animales a partir de los cuales se obtienen los anticuerpos.

55 Las variantes de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo monoclonal descrito en la presente memoria también están incluidas en la presente invención. Las variantes pueden ser preparadas mediante mutaciones en la secuencia de ADN clonada que codifica el anticuerpo de interés. Los métodos para la mutagénesis y las alteraciones de la secuencia de nucleótidos son bien conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Walker y Gastra, eds. (1983) *Techniques in Molecular Biology* (MacMillan Publishing Company, Nueva York); Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492; Kunkel et al. (1987) *Methods Enzymol.* 154:367-382; Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, New York); Patente de los Estados Unidos Núm. 4.873.192; y las referencias allí citadas. Las pautas en cuanto a las sustituciones de aminoácidos apropiadas que no afectan a la actividad biológica del polipéptido de interés se pueden encontrar en el modelo de Dayhoff et al. (1978) en el *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.). Se pueden preferir las sustituciones

conservativas, tales como el cambio de un aminoácido por otro que tiene propiedades similares. Los ejemplos de las sustituciones conservativas incluyen, pero no están limitadas a, Gly↔Ala, Val↔Ile↔Leu, Asp↔Glu, Lys↔Arg, Asn↔Gln, y Phe↔Trp↔Tyr.

5 En la construcción de las variantes del polipéptido de interés, se realizan modificaciones de manera que las variantes sigan teniendo la actividad deseada, esto es, similar afinidad de unión al biomarcador. Obviamente, cualquiera de las mutaciones realizadas en el ADN que codifica el polipéptido variante no debe situar la secuencia fuera del marco de lectura y preferiblemente no creará regiones complementarias que puedan producir una estructura de ARNm secundaria. Véase la Publicación de la Solicitud de Patente EP Núm. 75.444.

10 Preferiblemente, las variantes de un polipéptido de referencia tienen secuencias de aminoácidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 70% o 75%, preferiblemente una identidad de secuencia de al menos 80% o 85%, más preferiblemente una identidad de secuencia de al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94% o 95% con respecto a la secuencia de aminoácidos para la molécula de anticuerpo de referencia, o con respecto a una porción más corta de la molécula de anticuerpo de referencia. Más preferiblemente, las moléculas comparten una identidad de secuencia de al menos 96%, 97%, 98% o 99%. Para los fines de la presente invención, el porcentaje de identidad de la secuencia se determina utilizando el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman utilizando una búsqueda de espacios afines con una penalización de apertura del espacio de 12 y una penalización de extensión del espacio de 2, matriz BLOSUM de 62. El algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman es ilustrado en Smith y Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2:482-489. Una variante puede diferir, por ejemplo, del anticuerpo de referencia en tan pocos como 1 a 15 residuos de aminoácidos, tan pocos como 1 a 10 residuos de aminoácidos, tal como 6-10, tan pocos como 5, tan pocos como 4, 3, 2, o incluso 1 residuo de aminoácido.

25 Con respecto al alineamiento óptimo de dos secuencias de aminoácidos, el segmento contiguo de la secuencia de aminoácidos variante puede tener residuos de aminoácido adicionales o residuos de aminoácido suprimidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de referencia. El segmento contiguo utilizado para la comparación con la secuencia de aminoácidos de referencia incluirá al menos 20 residuos de aminoácido contiguos, y puede tener 30, 40, 50, o más residuos de aminoácido. Se pueden realizar correcciones de la identidad de secuencia asociada con las sustituciones de residuos conservativas o los espacios (véase el algoritmo de búsqueda de homología de Smith-Waterman).

Los anticuerpos monoclonales para MCM2 de la invención pueden estar marcados con una sustancia detectable como se describe más abajo para facilitar la detección de la proteína biomarcadora en la muestra. Tales anticuerpos encuentran uso en la práctica de los métodos de la invención. Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de la invención pueden ser acoplados a una sustancia detectable para facilitar la detección de la unión al anticuerpo. La palabra "marca" cuando se utiliza en la presente memoria hace referencia a un compuesto o composición detectable que están conjugados directamente o indirectamente con el anticuerpo con el fin de generar un anticuerpo "marcado". La marca puede ser detectable por sí misma (p. ej., marcas radioisotópicas o marcas fluorescentes) o, en el caso de una marca enzimática, puede catalizar la alteración química de un compuesto o composición sustrato que sea detectable. Los ejemplos de las sustancias detectables con el objetivo de marcar anticuerpos incluyen diferentes enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminescentes, materiales bioluminescentes, y materiales radiactivos. Los ejemplos de las enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; los ejemplos de los complejos con grupos prostéticos incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de los materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilaminofluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminescente incluye el luminol; los ejemplos de los materiales bioluminescentes incluyen luciferasa, luciferina, y aequorina; y los ejemplos de los materiales radiactivos adecuados incluyen I^{125} , I^{131} , S^{35} , o H^3 .

50 También se proporcionan los kits que comprenden al menos un anticuerpo monoclonal para MCM2 de la invención. Por "kit" se quiere significar cualquier manufactura (p. ej., un paquete o un recipiente) que comprenda al menos un reactivo, esto es., un anticuerpo, para detectar específicamente la expresión de MCM2. El kit puede ser promocionado, distribuido, o vendido como una unidad para realizar los métodos de la presente invención. Además, los kits pueden contener un inserto en el paquete que describa el kit y los métodos para su utilización.

55 Los kits de la invención comprenden generalmente al menos un anticuerpo monoclonal dirigido a MCM2, compuestos químicos para la detección de la unión al anticuerpo, una contratinción, y, opcionalmente, un agente de añil para facilitar la identificación de células de tinción positiva. Cualquier compuesto químico que detecte la unión antígeno-anticuerpo puede ser utilizado en los kits de la invención. En algunas realizaciones, los compuestos químicos para la detección comprenden un polímero marcado conjugado con un anticuerpo secundario. Por ejemplo, se puede proporcionar un anticuerpo secundario que está conjugado con una enzima que cataliza el depósito de un cromógeno en el sitio de unión antígeno-anticuerpo. Tales enzimas y mecanismos para su utilización en la detección de la unión al anticuerpo son bien conocidas en la técnica. En una realización, el kit comprende un anticuerpo secundario que está conjugado con un polímero marcado con HRP. Además se pueden proporcionar los

5 cromógenos compatibles con la enzima conjugada (p. ej., DAB en el caso de un anticuerpo secundario marcado con HRP) y las soluciones, tales como peróxido de hidrógeno, para bloquear la tinción no específica. En otras realizaciones, se detecta la unión de un anticuerpo a una proteína biomarcadora por medio del uso de un reactivo sonda de ratón que se une a anticuerpos monoclonales, seguido de la adición de un polímero de dextrano conjugado con HRP que se une al reactivo sonda de ratón. Dichos reactivos de detección son asequibles comercialmente, por ejemplo, de Biocare Medical.

10 Los kits de la presente invención pueden comprender además un reactivo bloqueador de peroxidasa (p. ej., peróxido de hidrógeno), un reactivo bloqueador de proteína (p. ej., caseína), y una contratinción (p. ej., hematoxilina). Se puede proporcionar por otra parte un agente de añil (p. ej., hidróxido de amonio o TBS, pH 7,4, con Tween-20 y azida de sodio) en el kit para facilitar la detección de células de tinción positiva. Los kits también pueden comprender muestras de control positivo y negativo con el propósito de controlar la calidad.

15 En otra realización, los kits de la invención comprenden dos anticuerpos monoclonales para MCM2, más concretamente donde al menos uno de los anticuerpos es el anticuerpo monoclonal 26H6.19. Se proporciona además un kit que comprende dos anticuerpos monoclonales para MCM2 y un tercer anticuerpo dirigido a la topoisomerasa II alfa (Topo2A). Cuando se encuentran presentes múltiples anticuerpos en el kit, cada anticuerpo puede ser proporcionado en forma de un reactivo individual o, alternativamente, en forma de un cóctel de anticuerpos que comprende todos los anticuerpos de interés. Además, cualquiera o todos los reactivos del kit pueden ser proporcionados dentro de recipientes que los protegen del medio externo, por ejemplo en recipientes sellados. Los kits de la invención son útiles en la diagnosis de enfermedades cervicales de alto grado y pueden incluir además reactivos para la tinción de Papanicolau (p. ej., EA50 y Orange G).

25 Las composiciones de la invención encuentran uso en los métodos para diagnosticar enfermedades cervicales de alto grado en un paciente. Se pretende que "diagnosticar enfermedades cervicales de alto grado" incluya, por ejemplo, diagnosticar o detectar la presencia de enfermedades cervicales, controlar el progreso de las enfermedades, e identificar o detectar células o muestras que son indicativas de enfermedades cervicales de alto grado. Los términos diagnosticar, detectar, e identificar enfermedades cervicales de alto grado se utilizan indistintamente en la presente memoria. Se pretende que "enfermedad cervical de alto grado" incluya aquellas afecciones clasificadas mediante colposcopia como patología premaligna, patología maligna, displasia moderada a grave, y cáncer cervical. La enfermedad cervical subyacente de alto grado incluye la identificación histológica de NICII, NICIII, HLIE, carcinoma *in situ*, adenocarcinoma, y cáncer (fases FIGO I-IV).

35 Los métodos de la invención comprenden la detección de la expresión en exceso de al menos un biomarcador nuclear que es expresado en exceso selectivamente en enfermedades cervicales de alto grado. Por "biomarcador nuclear" se quiere significar cualquier gen de proteína que sea expresado predominantemente en el núcleo de la célula. Un biomarcador nuclear puede ser expresado en un grado menor en otras partes de la célula. Por "expresado en exceso selectivamente en una enfermedad cervical de alto grado" se quiere significar que el biomarcador nuclear de interés es expresado en exceso en la enfermedad cervical de alto grado pero no es expresado en exceso en afecciones clasificadas como LLIE, NICI, muestras infectadas por VPH sin displasia presente, células metaplásticas inmaduras, y otras afecciones que no se consideran enfermedades clínicas. De este modo, la detección de los biomarcadores nucleares de la invención permite la diferenciación de muestras indicativas de enfermedad cervical subyacente de alto grado de muestras que son indicativas de proliferación benigna, fase temprana de infección por VPH, o displasia leve. Los biomarcadores nucleares de particular interés incluyen las proteínas MCM, concretamente MCM2, y Topo2A.

50 En un aspecto concreto de la invención, los métodos comprenden poner en contacto una muestra obtenida de un paciente con al menos un anticuerpo monoclonal para MCM2 de la invención, y detectar la unión del anticuerpo a MCM2. En otras realizaciones, la muestra se pone en contacto con al menos dos anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a MCM2, concretamente donde al menos uno de los anticuerpos es el anticuerpo monoclonal 26H6.19. En una realización adicional, la muestra se pone en contacto con estos dos anticuerpos monoclonales para MCM2 y un tercer anticuerpo que se une específicamente a Topo2A. Los mecanismos para detectar la unión a anticuerpos son bien conocidos en la técnica. La unión de un anticuerpo a un biomarcador de interés puede ser detectada por medio del uso de reactivos químicos que generan una señal detectable que corresponde al nivel de unión del anticuerpo y, por consiguiente, al nivel de expresión de la proteína biomarcadora. Se puede utilizar cualquier método para detectar la unión anticuerpo-antígeno para poner en práctica los métodos de la invención. Según se utiliza en la presente memoria, "muestra cervical" hace referencia a cualquier muestreo de células, tejidos, o fluidos corporales del cérvix en el cual se puede detectar la expresión de un biomarcador. Los ejemplos de tales muestras corporales incluyen, pero no están limitadas a, fluidos ginecológicos, biopsias, y frotis. Las muestras cervicales se pueden obtener de un paciente mediante una variedad de mecanismos incluyendo, por ejemplo, rascar o realizar un frotis de una zona o mediante el uso de una aguja para aspirar fluidos corporales. Los métodos para recoger muestras cervicales son bien conocidos en la técnica. En reacciones concretas, la muestra cervical comprende células cervicales, concretamente en una preparación con una base líquida. En una realización, las muestras cervicales se recogen de acuerdo con las pautas de preparación de especímenes de citología con una

base líquida tales como, por ejemplo, la preparación SurePath® (TriPath Imaging, Inc.) o ThinPrep® (CYTYC, Inc.). Las muestras cervicales pueden ser transferidas a un porta de vidrio para su observación con aumento. Se pueden aplicar a las células del porta de vidrio soluciones de fijación y tinción para conservar el espécimen y para facilitar su examen. En una realización, la muestra cervical se recogerá y se tratará para proporcionar una muestra en monocapa, como se muestra en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.346.831.

Un experto en la técnica apreciará que cualquiera o todas las etapas de los métodos de la invención podrían ser implementados por el personal de una manera manual o automática. De este modo, las etapas de preparación de la muestra cervical, el anticuerpo, y la detección de la unión al anticuerpo se pueden automatizar. Los métodos de la invención también se pueden combinar con las técnicas de tinción de Papanicolau convencionales para permitir un diagnóstico más exacto la enfermedad cervical de alto grado.

Se ofrecen los siguientes ejemplos a modo de ilustración y no a modo de limitación:

EXPERIMENTACIÓN

Ejemplo 1: Producción de Anticuerpos Monoclonales de Ratón para MCM2

Se generaron anticuerpos monoclonales de ratón específicos para MCM2. El antígeno (un polipéptido inmunogénico) fue una proteína MCM2 etiquetada con hexahistidina recombinante completa. El antígeno fue expresado utilizando un sistema de expresión de baculovirus en células Tni. Específicamente, la secuencia codificante para la MCM2 etiquetada con hexahistidina (SEQ ID NO: 10) fue clonada en el plásmido pFastBac1 (Invitrogen) para su expresión en células Tni. Los métodos para producir proteínas recombinantes utilizando sistemas de expresión de baculovirus son bien conocidos en la técnica. La proteína MCM2 etiquetada fue purificada utilizando agarosa quelante cargada con iones Ni^{+2} (Ni-NTA de Qiagen) y se utilizó como inmunógeno. La secuencia de aminoácidos del polipéptido MCM2 inmunogénico se proporciona en el SEQ ID NO: 11.

Las inmunizaciones de ratón y las fusiones con el hibridoma se realizaron esencialmente como describen Kohler et al. (1975) Nature 256:495-496. Los ratones fueron inmunizados con la proteína MCM2 etiquetada inmunogénica en solución. Las células productoras de anticuerpo fueron aisladas de los ratones inmunizados y fusionadas con células de mieloma para formar hibridomas productores de anticuerpos monoclonales. Los hibridomas se cultivaron en un medio selectivo. Las células resultantes se cultivaron en placa mediante dilución seriada y se analizaron para determinar la producción de anticuerpos que se unen específicamente a MCM2 (y que no se unen a antígenos no relacionados). Para confirmar que los anticuerpos monoclonales de interés reaccionaban con la proteína MCM2 solamente y no con la etiqueta de hexahistidina, se escrutaron los hibridomas seleccionados contra la proteína etiquetada con MCM2-FLAG. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para la proteína MCM2-FLAG se muestran en los SEQ ID NO: 12 y 13, respectivamente. Después se cultivaron los hibridomas que secretaban el anticuerpo monoclonal seleccionado (mAb).

Los anticuerpos se purificaron a partir de los sobrenadantes de los medios de cultivo de células de hibridoma "agotadas" (esto es., células que se hacen crecer hasta que la viabilidad cae entre 0-15%) utilizando resina recubierta de Proteína A recombinante (STREAMLINE®, Amersham, Inc.). Los anticuerpos se hicieron eluir utilizando un pH bajo seguido de la neutralización inmediata del pH. Las fracciones con absorbancias significativas a 280 nM se reunieron. La reserva resultante se sometió a diálisis frente a PBS. Los anticuerpos purificados se sometieron a caracterización adicional. Se determinó que los anticuerpos monoclonales para MCM2 26H6.19 y 27C5.6 eran ambos de isotipo IgG₁. Los detalles del cartografiado epitópico de estos anticuerpos se describen más abajo.

Ejemplo 2: Aislamiento de Anticuerpos Monoclonales a partir de Células de Hibridoma

Se utiliza el siguiente procedimiento para aislar anticuerpos monoclonales a partir de células de hibridoma:

Preparación del medio

- A una botella de almacenamiento de 1.000 ml estéril, añadir 100 ml de Suero Bovino Fetal Hyclone (FBS).
- Añadir 10 ml de MEM-Solución de Aminoácidos no Esenciales.
- Añadir 10 ml de Solución de Penicilina-Estreptomicina-L-Glutamina.
- Cantidad Suficiente para aproximadamente 1.000 ml con medio ExCell 610-HSF.
- Colocar un tapón estéril en la botella y asegurar herméticamente. Agitar suavemente para mezclar.
- Conectar una unidad de filtro de vacío de acetato estéril de 1.000 ml (0,2 μ m) a un sistema de bomba de vacío.
- Verter cuidadosamente aproximadamente la mitad de la solución del medio en una unidad de filtro de vacío de acetato estéril y poner en marcha el vacío.
- Una vez que se ha filtrado la primera mitad del medio, verter el medio restante en la unidad del filtro y

continuar filtrando.

- Después de haber filtrado todo el medio, desconectar la manguera de vacío de la unidad de filtro de vacío y apagar la bomba de vacío. Eliminar la porción receptora de la unidad del filtro de la botella del filtro. Colocar un nuevo tapón estéril en la botella.
- Almacenar de 2°C a 10°C. Proteger de la luz.

Cultivo inicial de células de hibridoma

- Descongelar un vial de cultivo congelado de hibridoma de partida en un baño de H₂O a 37°C pre-calentado.
- Pulverizar el exterior del vial congelado con etanol del 70%.
- Trasladar el vial descongelado a la Cámara de Seguridad Biológica.
- Separar las células del vial congelado y transferir las células a un tubo de centrifuga de 15 ml.
- Añadir 7 ml de medio de cultivo celular gota a gota al tubo de centrifuga de 15 ml que contiene las células congeladas.
- Centrifugar el tubo de centrifuga de 15 ml que contiene las células descongeladas y cultivar el medio durante 5 minutos a una fuerza de 200 g.
- Mientras las células están en la centrifuga, añadir 45 ml de medio de cultivo celular a un matraz T-225.
- Después de la centrifugación, inspeccionar visualmente el tubo para determinar la presencia de un sedimento celular.
- Separar el medio del tubo de centrifuga teniendo cuidado de no desplazar el sedimento celular. Nota: Si se altera el sedimento celular, repetir la etapa de centrifugación.
- Añadir 5 ml de medio de cultivo celular al tubo de centrifuga de 15 ml que contiene las células sedimentadas. Pipetear para volver a suspender el sedimento celular en el medio.
- Transferir los contenidos completos de las células resuspendidas y el medio de cultivo al matraz T-225 que contenía los 45 ml de medio.
- Tapar el matraz T-225.
- Observar para determinar la presencia de células intactas al microscopio. Colocar el matraz T-225 inmediatamente en una incubadora con CO₂ y permitir la incubación de las células durante la noche.

Expansión de la línea celular de hibridoma

- Continuar controlando el cultivo celular para determinar la viabilidad, la concentración, y la presencia de contaminación.
- Controlar y ajustar la suspensión celular del matraz T-225 inicial hasta que la concentración sea aproximadamente de 600.000 células/ml a 800.000 células/ml y un total de 200 a 250 ml de medio.
- Desplazar la células y añadir medio adicional según se necesite para satisfacer los requerimientos mínimos de densidad celular.
- Dividir y transferir la suspensión celular a un nuevo matraz T-225 estéril. Colocar los matraces 2 x T-225 en la incubadora con CO₂.
- Controlar las células de los matraces 2 x T-225 hasta que la concentración sea de aproximadamente 600.000 células/ml a 800.000 células/ml, y un total entre 200 y 250 ml de medio para cada matraz.
- Desplazar las células y añadir más medio según se necesite para satisfacer los requerimientos de densidad celular mínima. Dividir y transferir las suspensiones celulares a 2 nuevos matraces T-225 estéril adicionales para un total de 4 x matraces T-225. Devolver todos los matraces a la incubadora con CO₂.
- Controlar las células, y ajustar el volumen de los 4 x matraces T-225 hasta que la concentración celular sea de aproximadamente 600.000 células/ml a 800.000 células/ml con un volumen total de aproximadamente 250 ml por matraz T-225 (o aproximadamente 1000 ml en total).
- Continuar controlando las células de los 4 x matraces T-225 hasta que las células hayan crecido hasta el agotamiento, con una viabilidad final de 0%-15%. El sobrenadante del cultivo celular está listo ahora para el Procedimiento de Aclaramiento.

Aclaramiento del sobrenadante

- Encender la centrifuga de sobremesa. Colocar los adaptadores de tubos de 500 ml en las cubetas del rotor, cerrar la tapa y ajustar la temperatura a 4°C (+/-) 4°C.
- Utilizar técnicas asépticas, verter el medio de los cuatro matraces T-225 no agotados ahora en 2 X tubos de centrifuga cónicos de 500 ml.
- Asegurarse de que los 2 tubos de 500 ml están equilibrados. Transferir el sobrenadante de un tubo a otro según sea necesario para equilibrarlos.
- Centrifugar el sobrenadante agotado a 1350 g (+/- 40 g) durante 15 minutos de 2°C a 10°C.
- Una vez completada la centrifugación, decantar asépticamente el sobrenadante en una botella de almacenamiento de 1000 ml estéril y asegurar con un tapón estéril.
- Transferir asépticamente 1 ml al tubo de microcentrifuga. Almacenar el tubo de microcentrifuga con la muestra de 2°C a 10°C (Proteger de la luz).

- La muestra de sobrenadante aclarada está lista para la evaluación de IgG utilizando Easy-Titer® Assay.

Preparación del tampón

5 **Tampón de unión:**

- Añadir aproximadamente 600 ml de H₂O DI a un vaso de precipitados limpio.
- Añadir 77,28 ml de solución de Ácido Bórico (4% P/V). Agitar a la temperatura ambiente con una varilla de agitación limpia.
- 10 • Pesar 233,76 g de Cloruro de Sodio y colocar en la solución mientras se continúa agitando.
- Llevar la solución a aproximadamente 950 con H₂O DI y continuar agitando.
- Cuando el Cloruro de Sodio se haya disuelto y la solución esté clara, ajustar el pH a 9,0 ± 0,2 con Hidróxido de Sodio.
- 15 • Separar la solución a un cilindro graduado de 1000 ml limpio y añadir la cantidad suficiente para 1000 ml con H₂O DI.
- Transferir el tampón completado a una botella de almacenamiento apropiada. Este tampón puede ser almacenado hasta durante 7 días antes de su uso.
- Repetir este procedimiento completo para preparar 0,2 litros adicionales a 1,0 litros de Tampón de Unión.

20 **Tampón de Elución**

- Pesar 1,725 g de fosfato de sodio monobásico y colocar en un vaso de precipitados de 250 ml limpio con una varilla de agitación limpia.
- Pesar 3,676 g de citrato de sodio y colocar en el mismo vaso de precipitados de 250 ml limpio.
- 25 • Añadir aproximadamente 175 ml de H₂O DI y agitar a la temperatura ambiente hasta que se disuelva.
- Pesar 4,38 g de Cloruro de Sodio y colocar en la solución mientras se continúa agitando.
- Llevar la solución a aproximadamente 225 ml con H₂O DI y continuar agitando.
- Cuando el Cloruro de Sodio se haya disuelto y la solución esté clara, ajustar el pH a 3,5 ± 0,2 con Ácido Clorhídrico.
- 30 • Separar la solución a un cilindro graduado limpio de 250 ml y añadir cantidad suficiente hasta 250 ml con H₂O DI.
- Conectar una unidad de filtro de vacío de acetato estéril de 500 ml (0,2 µm) a un sistema de bomba de vacío y filtrar la solución en condiciones estériles.
- Separar el filtro y cerrar el recipiente con un tapón estéril.

35 ***Adsorción de Anticuerpo***

- Verter el Sobrenadante Aclarado (~1 L) en un vaso de precipitados de plástico de 4.000 ml limpio con una varilla de agitación limpia.
- 40 • Añadir una cantidad aproximadamente igual (~1 L) del Tampón de Unión al vaso de precipitados de plástico de 4.000 ml limpio que contenía el sobrenadante aclarado. Añadir una varilla de agitación limpia.
- Cubrir el vaso de precipitados con un envoltorio de plástico limpio y etiquetar como "Unión al Anticuerpo".
- Calcular la cantidad aproximada de Proteína A STREAMLINE® que será necesaria utilizando los datos de la Tabla 1.

45

Tabla 1: Volumen Requerido de Resina con Proteína A

Cantidad de IgG (µg /ml) en el Sobrenadante	Volumen Requerido de Resina con Proteína A en Mililitros (ml)
>180 - ≤200	12,0
>160 - ≤180	11,0
>140 - ≤160	10,0
>120 - ≤140	9,0
>100 - ≤120	8,0
>80 - ≤100	7,0
>60 - ≤80	6,0
>40 - ≤60	4,5
>20 - ≤40	3,5

Cantidad de IgG ($\mu\text{g}/\text{ml}$) en el Sobrenadante	Volumen Requerido de Resina con Proteína A en Mililitros (ml)
≤ 20	2,0

- Asegurar una Columna desechable limpia y un ensamblaje con llave de paso a una abrazadera con soporte anular. Cerrar la llave de paso.
- 5 • Mezclar una cantidad apropiada de cuentas de Proteína A STREAMLINE invirtiendo la botella varias veces. Retirar el volumen requerido y colocar en la Columna Desechable.
- Lavar las cuentas de Proteína A STREAMLINE con 10 ml de H₂O DI. Abrir la llave de paso y permitir que el H₂O DI se vacíe. Cerrar la llave de paso. Repetir con 10 ml más de H₂O DI.
- Lavar las cuentas de Proteína A STREAMLINE con 10 ml de Tampón de Unión. Abrir la llave de paso y permitir que el Tampón de Unión se vacíe. Cerrar la llave de paso. Repetir con 10 ml más de Tampón de Unión.
- 10 • Resuspender las cuentas de Proteína A STREAMLINE en ~10 ml de la solución de Sobrenadante Aclarado y Tampón de Unión (desde el vaso de precipitados de 4.000 ml) y transferir las cuentas al vaso de precipitados de 4.000 ml que contenía la solución de Sobrenadante Aclarado y Tampón de Unión. Repetir según se requiera para transferir cualquier cuenta restante. Cuando se haya completado, descartar la columna y la llave de paso.
- Permitir que la mezcla se mezcle vigorosamente de 2°C a 10°C durante aproximadamente 18 horas.
- 15 • Cuando la mezcla se haya completado, apagar la placa de agitación y devolver el vaso de precipitados "Unión de Anticuerpo" con el sobrenadante tamponado y la suspensión de cuentas a la zona de la mesa de laboratorio. Permitir que las cuentas de Proteína A STREAMLINE sedimenten en la base del vaso de precipitados (aproximadamente 5 minutos).
- Asegurar una Columna Desechable limpia y un ensamblaje con llave de paso a una abrazadera con soporte anular. Cerrar la llave de paso.
- 20 • Etiquetar una botella de 250 ml, limpia o un recipiente adecuado "Unión Post-Lavado de la Columna".
- Etiquetar un vaso de precipitados de plástico limpio "Post-Unión en el Sobrenadante".
- Decantar el sobrenadante desde el vaso de precipitados de 4.000 ml al vaso de precipitados de plástico de 2 litros, etiquetado limpio, dejando las cuentas en el fondo del vaso de precipitados de 4.000 ml. Cubrir el vaso de precipitados de 2.000 ml que contenía la solución " Post-Unión en el Sobrenadante" con un envoltorio de plástico limpio y almacenar de 2°C a 10°C.
- 25 • Añadir aproximadamente 15 ml de Tampón de Unión al vaso de precipitados "Unión al Anticuerpo" de 4.000 ml decantado. Resuspender las cuentas de Proteína A STREAMLINE y transferirlas a la columna. Abrir la llave de paso y permitir que el Tampón de Unión se vacíe al recipiente "Unión Post-Lavado de la Columna". Cerrar la llave de paso cuando se haya vaciado.
- 30 • Transferir las cuentas de Proteína A STREAMLINE restantes al vaso de precipitados "Unión al Anticuerpo" añadiendo más Tampón de Unión, mezclar, y transferir a la columna como en las etapas anteriores. Cerrar la llave de paso cuando se vacíe.
- Calcular la cantidad aproximada de Tampón de Unión necesaria para lavar las cuentas de Proteína A STREAMLINE de la columna utilizando los datos de la Tabla 2.
- 35

Tabla 2: Volumen del Tampón de Unión para el Lavado de la Columna

Cantidad de IgG ($\mu\text{g}/\text{ml}$) en el Sobrenadante	Volumen de Tampón de Unión Requerido en Mililitros (ml)
> 180 - ≤ 200	total de 5 lavados de la columna con con 15,0 ml cada uno
> 160 - ≤ 180	total de 5 lavados de la columna con con 15,0 ml cada uno
> 140 - ≤ 160	total de 5 lavados de la columna con con 12,5 ml cada uno
> 120 - ≤ 140	total de 5 lavados de la columna con con 12,5 ml cada uno
> 100 - ≤ 150	total de 5 lavados de la columna con con 12,5 ml cada uno
> 80 - ≤ 100	total de 5 lavados de la columna con con 10,0 ml cada uno
> 60 - ≤ 80	total de 5 lavados de la columna con con 10,0 ml cada uno
> 40 - ≤ 60	total de 5 lavados de la columna con

Cantidad de IgG ($\mu\text{g}/\text{ml}$) en el Sobrenadante	Volumen de Tampón de Unión Requerido en Mililitros (ml)
	con 7,5 ml cada uno
> 20 - \leq 40	total de 5 lavados de la columna con con 5,0 ml cada uno
\leq 20	total de 5 lavados de la columna con con 5,0 ml cada uno

- Lavar las cuentas de Proteína A STREAMLINE en la columna con el volumen apropiado de Tampón de Unión para el número apropiado de lavados, continuar la recogida del efluente en el recipiente "Unión Post-Lavado de la Columna".
- 5 • Cuando se haya completado, cerrar la llave de paso. Almacenar el recipiente "Unión Post-Lavado de la Columna" de 2°C a 10°C.
- Determinar los Volúmenes Totales de Tampón de Elución y Tampón de Neutralización necesarios para hacer eluir las cuentas de Proteína A STREAMLINE en la columna de la Tabla 3.

Tabla 3: Determinación de la Cantidad de Tampón de Elución y Tampón de Neutralización

Cantidad de IgG ($\mu\text{g}/\text{ml}$) en el Sobrenadante	Volumen Total de Tampón de Elución Requerido (ml)	Volumen Total de Tampón de Neutralización Requerido (ml)	Volumen de Tampón de Elución Requerido por fracción (ml)	Volumen de Tampón de Neutralización Requerido por fracción (ml)
>180- \leq 200	72	7,2	12	1,2
> 160- \leq 180	66	6,6	11	1,1
> 140 - \leq 160	60	6,0	10	1,0
> 120 - \leq 140	54	5,4	9	0,9
> 100 - \leq 120	48	4,8	8	0,8
> 80 - \leq 100	42	4,2	7	0,7
> 60 - \leq 80	36	3,6	6	0,6
> 40 - \leq 60	27	2,7	4,5	0,45
>20- \leq 40	21	2,1	3,5	0,35
\leq 20	12	1,2	2	0,2

- 10 • Etiquetar 9 tubos de centrifuga cónicos estériles como "Anticuerpo Eluido", Fracción núm. (1 a 9).
- Colocar el volumen apropiado de Tampón de Neutralización requerido por fracción (determinado a partir de la Tabla "C" anterior) en cada uno de los 9 tubos de fracción de "Anticuerpo Eluido" y colocar de manera segura en la salida de la llave de paso de la columna.
- 15 • Hacer eluir las cuentas de Proteína A STREAMLINE en la fracción de la columna por fracción con el volumen apropiado de Tampón de Elución requerido por fracción (determinado a partir de la Tabla 3 anterior) a la vez que se recoge el producto eluido en cada uno de los tubos de "Anticuerpo Eluido" que contienen el Tampón de Neutralización.
- Cuando las eluciones se hayan completado, mezclar suavemente cada tubo de fracción con "Anticuerpo Eluido" removiendo varias veces. Separar aproximadamente 50 μl de la fracción núm. 3 y colocar sobre una tira de papel de ensayo para el pH para asegurarse de que el producto eluido ha sido neutralizado a un pH aproximado entre 6,5 y 8,5. Si se requiere, añadir más Tampón de Neutralización o Tampón de Elución según se necesite para llevar el pH al intervalo.
- 20 • Cuando se complete la evaluación del pH, realizar un Barrido de Absorbancia de una muestra de cada fracción a 280 nm - 400 nm para determinar la concentración aproximada de IgG en el producto eluido antes de continuar con el Procedimiento de Diálisis. Aceptar las fracciones como parte de la Reserva de Producto Eluido si el valor A280-A400 es \geq 0,200.
- 25

Rechazar las fracciones como parte de la Reserva de Producto Eluido si el valor A280-A400 es < 0,200.

- Etiquetar un tubo de centrifuga cónico estéril como "Anticuerpo Eluido", "Reserva de Producto Eluido", y combinar todas las fracciones que fueron aceptadas como parte la reserva.
- Realizar el Barrido de Absorbancia de una muestra de la Reserva de Producto Eluido para determinar la concentración aproximada de IgG en el producto eluido antes de continuar con el Procedimiento de Diálisis.
- Estimar el volumen de la Reserva de Producto Eluido y calcular los mg totales aproximados de IgG.
- Volumen de la Reserva de Producto Eluido: $_m\text{ls} \times \text{IgG mg/ml} = _ \text{Total mgs de IgG}$

Diálisis de Anticuerpo

- Separar el tubo de "Anticuerpo Eluido" de 2°C a 10°C.
- Calcular la longitud aproximada del Tubo de Diálisis que se necesitará para someter a diálisis el producto eluido de anticuerpo utilizando el volumen aproximado de producto eluido y los datos de la Tabla 4.

Tabla 4: Cálculo de la Longitud de Tubo de Diálisis Necesario

Volumen Aproximado de Eluyente (ml)	Razón volumen/longitud del Tubo de Diálisis	Longitud Aproximada Requerida para la Muestra de Eluyente (cm)	Espacio de Cabeza del 20% (cm)	Longitud Aproximada Requerida para Muestra más Espacio de cabeza (cm)	Longitud Aproximada Requerida para Ligar el Tubo (cm)	Longitud Aproximada Total del Tubo de Diálisis Requerido (cm)
39,6	2	20	4	24	15	63
36,3	2	18	4	22	15	59
33,0	2	17	3	20	15	55
29,7	2	15	3	18	15	51
26,4	2	13	3	16	15	47
23,1	2	12	2	14	15	43
19,8	2	10	2	12	15	39
14,85	2	7	1	9	15	33
11,55	2	6	1	7	15	29
6,6	2	3	1	4	15	23

- Cortar la longitud apropiada de tubo de diálisis requerido. (Spectra/Por® 2 Regenerated Cellulose Membrane, Corte de Peso Molecular (CPM) 12.000 -14.000 Dalton, Diámetro 16 mm, Spectrum Laboratories Inc., Núm. Cat. 132678)
- Hidratar el tubo de membrana de diálisis en 1.000 ml de H₂O DI durante > 30 minutos.
- Calcular el volumen aproximado de Tampón de Diálisis necesario para someter a diálisis el producto eluido de anticuerpo utilizando los datos de la Tabla 5.

Tabla 5: Volumen de Tampón de Diálisis Requerido

Cantidad de Sobrenadante con IgG (µg/ml)m	Volumen Final de Anticuerpo Eluido en Mililitros (ml)	Longitud de Tubo de Diálisis Requerido (cm)	Volumen de Tampón de Diálisis (1XPBS) Requerido en Litros
> 180 - ≤200	39,6 ml	63 cm	3 cambios completos de 4,0 Litros
> 160 - ≤180	36,3 ml	59 cm	3 cambios completos de 3,6 Litros
> 140 - ≤160	33,0 ml	55 cm	3 cambios completos de 3,3 Litros
> 120 - ≤140	29,7 ml	51 cm	3 cambios completos de 3,0

			Litros
> 100 - ≤120	26,4 ml	47 cm	3 cambios completos de 2,6 Litros
> 80 - ≤ 100	23,1 ml	43 cm	3 cambios completos de 2,3 Litros
> 60 - ≤80	19,8 ml	39 cm	3 cambios completos de 1,9 Litros
> 40 - ≤60	14,85 ml	33 cm	3 cambios completos de 1,5 Litros
> 20 - ≤40	11,55 ml	29 cm	3 cambios completos de 1,2 Litros
≤20	6,6 ml	23 cm	3 cambios completos de 0,7 Litros

- Colocar la cantidad apropiada de Tampón de Diálisis en un vaso de precipitados de plástico del tamaño adecuado. Etiquetar el vaso de precipitados como "Anticuerpo Sometido a Diálisis". Añadir una varilla de agitación limpia y colocar el vaso de precipitados sobre una placa de agitación en el interior del refrigerador o cámara refrigerada de 2°C a 10°C.
- 5 • Enjuagar el tubo de diálisis cuidadosamente en H₂O DI. Atar dos nudos terminales a aproximadamente 7 cm de un extremo del tubo de diálisis y asegurar fuertemente.
- Añadir aproximadamente 5 ml de H₂O DI al tubo de diálisis.
- Llenar el tubo de diálisis con el anticuerpo eluido del tubo de recogida "Anticuerpo Eluido".
- 10 • Atar dos nudos terminales a aproximadamente 7 cm del extremo abierto restante del tubo de diálisis y asegurar fuertemente. Asegurarse de que el espacio de cabeza es aproximadamente el obtenido de la Tabla 4.
- Colocar el tubo de diálisis lleno y cerrado en el reservorio de diálisis con el volumen apropiado de 1X PBS (de la Tabla 5).
- Cubrir el vaso de precipitados con envoltorio de plástico limpio. Ajustar la velocidad de la placa de agitación de manera que la muestra de diálisis gire libremente, pero no baje dentro del vórtice del producto sometido a diálisis.
- 15 La diálisis debe tener lugar de 2°C a 10°C con 3 cambios de tampón en total en un período de 24 horas.

Filtración de Anticuerpo

- Etiquetar el tubo de recolección estéril como "Anticuerpo Sometido a Diálisis".
- 20 • Separar el tubo de la muestra sometida a diálisis del vaso de precipitados de diálisis. Cortar el tubo de diálisis abierto en un extremo y transferir la muestra sometida a diálisis al tubo de centrifuga "Anticuerpo Sometido a Diálisis".
- Etiquetar otro tubo de recolección estéril como "Anticuerpo Sometido a Diálisis".
- Seleccionar una jeringa Luer Lok estéril con capacidad adecuada para contener el volumen sometido a diálisis final.
- 25 • Anclar un Filtro de Jeringa Acrodisc® a la abertura de la jeringa (0,2 µm HT Tuffryn® Membrane, Low Protein Binding, Gelman Laboratories, Núm. Cat. 4192). Separar el émbolo de la jeringa y mientras se sostiene la jeringa hacia arriba, transferir el anticuerpo monoclonal sometido a diálisis del tubo "Anticuerpo Sometido a Diálisis" a la jeringa. Recolocar el émbolo.
- 30 • Sostener el Filtro de Jeringa Acrodisc® sobre el tubo de recolección etiquetado como "Anticuerpo Purificado" estéril, abierto, y hacer bajar el émbolo de la jeringa para filtrar el anticuerpo purificado en el tubo de "Anticuerpo Purificado".
- Cuando la filtración se ha completado, tapar el tubo de "Anticuerpo Purificado" y almacenar de 2°C a 10°C.
- Determinar la concentración de anticuerpo monoclonal purificado utilizando el procedimiento A280.
- 35

Ejemplo 3: Método General Para el Cartografiado Epitópico

Enfoque General

- 40 El cartografiado epitópico se realiza para identificar la secuencia de aminoácidos lineal con una proteína antigénica (esto es el epítipo) que es reconocida por un anticuerpo monoclonal concreto. Un enfoque general para el cartografiado epitópico requiere la expresión de la proteína completa, así como de varios fragmentos (esto es, formas truncadas) de la proteína, generalmente un sistema de expresión heterólogo. Estas diferentes proteínas recombinantes se utilizan después para determinar si el anticuerpo monoclonal específico es capaz de unirse a una
- 45 o más de las formas truncadas de la proteína diana. Por medio del uso del truncamiento reiterativo y la generación de proteínas recombinantes con regiones de aminoácidos solapantes, es posible identificar la región que es reconocida por el anticuerpo monoclonal en investigación. Se emplea el análisis de transferencia Western o un

ELISA para determinar si el anticuerpo monoclonal específico en investigación es capaz de unirse a uno o más de los fragmentos de proteína recombinantes. Este enfoque puede identificar por último las regiones peptídicas que contienen el epítipo y, en algunos casos, refinar el epítipo con precisión para una secuencia de 8-11 aminoácidos.

5 **Diseño y creación del Constructo**

La primera etapa en el cartografiado epitópico es el diseño de truncamientos de genes anidados. Frecuentemente, el gen se divide en cuatro partes iguales para un análisis adicional.

10 **Estrategia de clonación de genes**

La estrategia de clonación general comienza con la generación basada en la PCR de los fragmentos génicos clonados. Con el fin de expresar eficazmente el fragmento clonado, especialmente cuando se utilizan regiones de aminoácidos pequeñas; el fragmento clonado es expresado como una proteína de fusión, esto es, fusionado con otra proteína portadora que es expresada establemente en el sistema. Frecuentemente se utiliza proteína fluorescente verde (GFP) como proteína portadora. Se incluye GFP como compañero de unión para estabilizar los fragmentos del truncamiento y mejorar la expresión durante la siguiente etapa de expresión de la proteína *in vitro*. La GFP también permite seguir la pista de la expresión de la proteína de fusión utilizando anticuerpos anti-GFP.

15 Se lleva a cabo la clonación para crear el constructo de proteína-GFP utilizando o bien el enfoque del mega-cebado o bien utilizando la clonación de plásmidos en el vector pScreen-GFP. Generalmente, los fragmentos de truncamiento se fusionan con GFP y con las secuencias de control necesarias para la expresión de proteína empleando una técnica denominada mega-cebado.

20 El mega-cebado es la unión de dos o más fragmentos de ADN mediante hibridación de regiones homólogas en el extremo de los respectivos fragmentos y la extensión del ADN de hebra sencilla hibridado con una ADN polimerasa termoestable. Este procedimiento crea un fragmento de ADN grande a partir de dos o más fragmentos más pequeños, conectándolos por su secuencia compartida. Este fragmento grande se amplifica después utilizando una PCR convencional.

25 Si no se puede utilizar con éxito el mega-cebado, los fragmentos del truncamiento pueden ser clonados en un plásmido que contenga GFP y secuencias de control de expresión de la proteína. Esta clonación crea fusiones de GFP/fragmento necesarias para el cartografiado epitópico. El resto del protocolo puede continuar después como se describe más abajo.

30 **Expresión de la proteína**

Los constructos de expresión creados, por ejemplo por medio del mega-cebado son introducidos después en el Sistema de Traducción Rápida (RTS). El RTS es un sistema de expresión de proteínas libre de células derivado de productos lisados de *E. coli*. Este sistema permite la expresión rápida (3-4 horas) de proteínas a partir de moldes de ADN.

35 Si el RTS no produce niveles de expresión de proteína adecuados, los fragmentos de truncamiento serán clonados en el plásmido de expresión de la proteína GFP. Estos plásmidos de fusión se transforman después en una cepa de *E. coli* optimizada para la expresión de la proteína. La expresión de la proteína es inducida en un cultivo en crecimiento de bacterias y, después de la proliferación, las células se someten a lisis. Las proteínas del producto lisado celular complejo se separan después mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), y el resto del protocolo es el mismo de más abajo.

40 **Detección de proteína y cartografiado epitópico**

Los fragmentos de proteína producidos mediante RTS se separan utilizando PAGE y se transfieren a membranas de nitrocelulosa. Las proteínas unidas a la membrana se exponen después al anticuerpo que se está investigando en solución. Se identifica la unión anticuerpo/proteína utilizando mecanismos colorimétricos conocidos en la técnica.

50 La unión al anticuerpo de la proteína completa y algún subgrupo de los fragmentos de proteína truncados constituye un resultado positivo. Si la ausencia de una sección concreta de la proteína elimina la unión al anticuerpo, el epítipo se encuentra en ese fragmento.

55 Si el anticuerpo que se va a cartografiar no reconoce la proteína unida a las membranas de nitrocelulosa, se utilizan métodos alternativos para detectar las interacciones anticuerpo/proteína, tales como, por ejemplo, ELISA o inmunoprecipitación. Los métodos para detectar las interacciones anticuerpo/proteína son bien conocidos en la técnica.

Mejora de la localización epitópica

Puesto que el protocolo descrito más arriba solamente estrechará la localización del epítipo a aproximadamente un cuarto de la proteína, es necesario repetir el procedimiento en el cuarto de la proteína que se ha determinado que contiene el epítipo con el fin de resolver la localización del epítipo. Para una proteína muy grande, puede ser necesario repetir este procedimiento de dos a tres veces para estrechar el epítipo a 8-15 aminoácidos.

Ejemplo 4: Caracterización de Epítopos para los Anticuerpos Monoclonales para MCM2 27C5.6 y 26H6.19

El cartografiado epitópico para los Anticuerpos Monoclonales para MCM2 27C5.6 y 26H6.19 se llevó a cabo esencialmente como se describe en el Ejemplo 3. Específicamente, se utilizó la PCR para crear truncamientos del gen MCM2, seguido de RTS para generar fragmentos de la proteína MSCM recombinante, y finalmente transferencia western para detectar la unión del anticuerpo a MCM2. Se unió GFP a los truncamientos del gen MCM2 en una segunda ronda de PCR para asegurar una expresión robusta y estable en la RTS.

La secuencia codificante completa para MCM2 (SEQ ID NO: 2; NM_004526) tiene un tamaño de 2715 pb. Sin embargo, el ADNc que se utilizó para expresar la proteína MCM2 recombinante y que se utilizó para inmunizar ratones durante la producción de anticuerpos para MCM2 tenía un tamaño del gen de 2688 pb (SEQ ID NO: 5). Al ADNc de MCM2 truncado utilizado le faltaba una región de 27 pb en el extremo 5' de la proteína MCM2, específicamente el fragmento ATGGCGGAATCATCGGAATCCTTACC (SEQ ID NO: 6). Las siguientes etapas sucesivas se llevaron a cabo con el fin de cartografiar epitópicamente el anticuerpo MCM2-27C5.6:

Puesto que el gen MCM2 era grande (>1000 pb) y para minimizar el número de repeticiones necesarias de la PCR, el gen fue dividido igualmente en seis regiones [1-6] de aproximadamente 400 pb. Las secuencias solapantes, que contienen secuencias homólogas que permiten el mega-cebado durante un segundo ciclo de PCR y los sitios de restricción para una segunda opción de sub-clonación en el plásmido pScreen-GFP, fueron añadidos al gen de interés durante la primera PCR. La primera ronda de PCR creó fragmentos de PCR de la secuencia de nucleótidos de MCM2 truncada (SEQ ID NO: 5) que incluían: la región [1] que tenía 1-426 pb, la región [1-2] que tenía 1-888 pb, la región [1-3] que tenía 1-1377 pb, la región [1-4] que tenía 1-1845 pb, la región [1-5] que tenía 1-2241 pb, la región [1-6] que tenía 1-2688 pb, y finalmente la región [2-6] que tenía 427 -2688 pb. Las regiones individuales (por ejemplo la región [5]) no fueron expresadas para evitar la pérdida de epítopos que estaban presentes en la secuencia de empalme presente entre regiones.

Los productos de la primera ronda de PCR de MCM2 fueron subclonados en pSCREEN-GFP (BamH1-Xho1), ya que los tamaños de los fragmentos eran demasiado grandes para el mega-cebado. El único truncamiento que no tuvo éxito fue la región [1-6] completa. Los cebadores originales utilizados para amplificar el gen completo y los truncamientos fueron diseñados para que incluyeran sitios de restricción (extremo 5' BAMH1; extremo 3' XHO1) para permitir la subclonación directa en pSCREEN-GFP.

Las fusiones GFP-gen creadas fueron utilizadas como molde para la producción de proteína en la reacción RTS utilizando el kit RTS 100 *E. coli* HY de Roche. Los productos proteicos de la RTS se hicieron precipitar con acetona, se cargaron directamente sobre un gen de poliacrilamida desnaturizante, y se analizaron mediante transferencia western. La transferencia western fue sondeada directamente con el anticuerpo monoclonal 27C5.6 y anticuerpos para GFP.

La primera ronda de productos de RTS fue sondeada tanto con anticuerpos GFP como con el anticuerpo monoclonal para MCM2 27C5.6. Se detectó una banda positiva en la región [1-3]. El procedimiento anterior se repitió utilizando el fragmento incluido en la región [1-3] como secuencia de partida.

Una segunda ronda de RTS produjo un resultado positivo para el anticuerpo 27C5.6 en la región MCM2-3Q3 (CQSAGPFEVNMEETIYQNYQRIRIQESP (SEQ ID NO: 7); correspondiente a los residuos de aminoácido 355 a 382 del SEQ ID NO: 1). El procedimiento anterior se repitió utilizando el fragmento incluido en la región MCM2-3Q3 como secuencia de partida.

Una tercera ronda de RTS produjo un resultado positivo para el anticuerpo 27C5.6 en la región MCM2-3Q3.2 (IYQNYQR1RIQESP (SEQ ID NO: 3); correspondiente a los residuos de aminoácido 369 a 382 del SEQ ID NO: 1). No se obtuvieron resultados positivos en la región MCM2-3Q3.1 (CQSAGPFEVNMEET (SEQ ID NO: 8); correspondiente a los residuos de aminoácido 355 a 368 del SEQ ID NO: 1) o en MCM2-3Q3.2 (EVNMEETIYQNYQR (SEQ ID NO: 9); correspondiente a los residuos de aminoácido 362 a 375 del SEQ ID NO: 1).

Resultados

Los resultados iniciales demostraron que el epítipo para el anticuerpo monoclonal para MCM2 27C5.6 está localizado dentro de la región N-terminal de la proteína MCM2. Los truncamientos continuados de la proteína MCM2

demonstraron que el epítipo reconocido por 27C5.6 está localizado en una región de catorce aminoácidos, que corresponde específicamente a los residuos de aminoácido 369-382 del SEQ ID NO: 1 (IYQNYQRIRIQESP (SEQ ID NO: 3)). Rondas adicionales de RTS pueden mejorar aún más la localización epitópica.

- 5 El procedimiento idéntico descrito más arriba se utilizó para identificar el epítipo para el anticuerpo monoclonal para MCM2 26H6.19. Los resultados iniciales indicaron que el epítipo estaba localizado en la región C-terminal de la proteína MCM2. El epítipo fue definido de forma preliminar en una región de veintitrés aminoácidos, que correspondía específicamente a los residuos de aminoácido 688-710 del SEQ ID NO: 1 (PSNKEEEGLANGSAAEPAMPNTY (SEQ ID NO: 4)). Una análisis adicional hizo más preciso el epítipo del anticuerpo monoclonal para MCM2 26H6.19 a una región de diez aminoácidos que comprendía los residuos de aminoácido 683-692 del SEQ ID NO: 1 (HVRHHPSNKE (SEQ ID NO: 14)).
- 10

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> Fischer, Timothy J.
 Malinowski, Douglas P.
 Taylor, Adriann J.

10 <120> ANTICUERPOS MONOCLONALES Y MÉTODOS PARA SU USO EN LA DETECCIÓN DE
 ENFERMEDADES CERVICALES

<130> 46143/310882

15 <150> 60/675.305
 <151> 27-04-2005

<150> 60/718,082
 <151> 16-09-2005

20 <160> 14

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1
 <211> 904

25 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 1

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

30

ES 2 417 808 T3

Gln Ile Phe Asp Glu Ala Ala Leu Glu Val Val Leu Ala Met Tyr Pro
 260 265 270
 Lys Tyr Asp Arg Ile Thr Asn His Ile His Val Arg Ile Ser His Leu
 275 280 285
 Pro Leu Val Glu Glu Leu Arg Ser Leu Arg Gln Leu His Leu Asn Gln
 290 295 300
 Leu Ile Arg Thr Ser Gly Val Val Thr Ser Cys Thr Gly Val Leu Pro
 305 310 315 320
 Gln Leu Ser Met Val Lys Tyr Asn Cys Asn Lys Cys Asn Phe Val Leu
 325 330 335
 Gly Pro Phe Cys Gln Ser Gln Asn Gln Glu Val Lys Pro Gly Ser Cys
 340 345 350
 Pro Glu Cys Gln Ser Ala Gly Pro Phe Glu Val Asn Met Glu Glu Thr
 355 360 365
 Ile Tyr Gln Asn Tyr Gln Arg Ile Arg Ile Gln Glu Ser Pro Gly Lys
 370 375 380
 Val Ala Ala Gly Arg Leu Pro Arg Ser Lys Asp Ala Ile Leu Leu Ala
 385 390 395 400
 Asp Leu Val Asp Ser Cys Lys Pro Gly Asp Glu Ile Glu Leu Thr Gly
 405 410 415
 Ile Tyr His Asn Asn Tyr Asp Gly Ser Leu Asn Thr Ala Asn Gly Phe
 420 425 430
 Pro Val Phe Ala Thr Val Ile Leu Ala Asn His Val Ala Lys Lys Asp
 435 440 445
 Asn Lys Val Ala Val Gly Glu Leu Thr Asp Glu Asp Val Lys Met Ile
 450 455 460
 Thr Ser Leu Ser Lys Asp Gln Gln Ile Gly Glu Lys Ile Phe Ala Ser
 465 470 475 480
 Ile Ala Pro Ser Ile Tyr Gly His Glu Asp Ile Lys Arg Gly Leu Ala
 485 490 495
 Leu Ala Leu Phe Gly Gly Glu Pro Lys Asn Pro Gly Gly Lys His Lys
 500 505 510
 Val Arg Gly Asp Ile Asn Val Leu Leu Cys Gly Asp Pro Gly Thr Ala
 515 520 525
 Lys Ser Gln Phe Leu Lys Tyr Ile Glu Lys Val Ser Ser Arg Ala Ile
 530 535 540
 Phe Thr Thr Gly Gln Gly Ala Ser Ala Val Gly Leu Thr Ala Tyr Val
 545 550 555 560
 Gln Arg His Pro Val Ser Arg Glu Trp Thr Leu Glu Ala Gly Ala Leu
 565 570 575
 Val Leu Ala Asp Arg Gly Val Cys Leu Ile Asp Glu Phe Asp Lys Met
 580 585 590
 Asn Asp Gln Asp Arg Thr Ser Ile His Glu Ala Met Glu Gln Gln Ser
 595 600 605
 Ile Ser Ile Ser Lys Ala Gly Ile Val Thr Ser Leu Gln Ala Arg Cys
 610 615 620
 Thr Val Ile Ala Ala Ala Asn Pro Ile Gly Gly Arg Tyr Asp Pro Ser
 625 630 635 640
 Leu Thr Phe Ser Glu Asn Val Asp Leu Thr Glu Pro Ile Ile Ser Arg
 645 650 655
 Phe Asp Ile Leu Cys Val Val Arg Asp Thr Val Asp Pro Val Gln Asp
 660 665 670
 Glu Met Leu Ala Arg Phe Val Val Gly Ser His Val Arg His His Pro
 675 680 685
 Ser Asn Lys Glu Glu Glu Gly Leu Ala Asn Gly Ser Ala Ala Glu Pro
 690 695 700
 Ala Met Pro Asn Thr Tyr Gly Val Glu Pro Leu Pro Gln Glu Val Leu
 705 710 715 720
 Lys Lys Tyr Ile Ile Tyr Ala Lys Glu Arg Val His Pro Lys Leu Asn
 725 730 735

ES 2 417 808 T3

Gln Met Asp Gln Asp Lys Val Ala Lys Met Tyr Ser Asp Leu Arg Lys
 740 745 750
 Glu Ser Met Ala Thr Gly Ser Ile Pro Ile Thr Val Arg His Ile Glu
 755 760 765
 Ser Met Ile Arg Met Ala Glu Ala His Ala Arg Ile His Leu Arg Asp
 770 775 780
 Tyr Val Ile Glu Asp Asp Val Asn Met Ala Ile Arg Val Met Leu Glu
 785 790 795 800
 Ser Phe Ile Asp Thr Gln Lys Phe Ser Val Met Arg Ser Met Arg Lys
 805 810 815
 Thr Phe Ala Arg Tyr Leu Ser Phe Arg Arg Asp Asn Asn Glu Leu Leu
 820 825 830
 Leu Phe Ile Leu Lys Gln Leu Val Ala Glu Gln Val Thr Tyr Gln Arg
 835 840 845
 Asn Arg Phe Gly Ala Gln Gln Asp Thr Ile Glu Val Pro Glu Lys Asp
 850 855 860
 Leu Val Asp Lys Ala Arg Gln Ile Asn Ile His Asn Leu Ser Ala Phe
 865 870 875 880
 Tyr Asp Ser Glu Leu Phe Arg Met Asn Lys Phe Ser His Asp Leu Lys
 885 890 895
 Arg Lys Met Ile Leu Gln Gln Phe
 900

<210> 2
 <211> 3453
 <212> ADN
 5 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (58)...(2772)

10

<400> 2
 acttttcgcg cgaaacctgg ttgttgctgt agtggcggag aggatcgtgg tactgct atg 60
 Met
 1

 gcg gaa tca tcg gaa tcc ttc acc atg gca tcc agc ccg gcc cag cgt 108
 Ala Glu Ser Ser Glu Ser Phe Thr Met Ala Ser Ser Pro Ala Gln Arg
 5 10 15

 cgg cga ggc aat gat cct ctc acc tcc agc cct ggc cga agc tcc cgg 156
 Arg Arg Gly Asn Asp Pro Leu Thr Ser Ser Pro Gly Arg Ser Ser Arg
 20 25 30

 cgt act gat gcc ctc acc tcc agc cct ggc cgt gac ctt cca cca ttt 204
 Arg Thr Asp Ala Leu Thr Ser Ser Pro Gly Arg Asp Leu Pro Pro Phe
 35 40 45

 gag gat gag tcc gag ggg ctc cta ggc aca gag ggg ccc ctg gag gaa 252
 Glu Asp Glu Ser Glu Gly Leu Leu Gly Thr Glu Gly Pro Leu Glu Glu
 50 55 60 65

 gaa gag gat gga gag gag ctc att gga gat ggc atg gaa agg gac tac 300
 Glu Glu Asp Gly Glu Glu Leu Ile Gly Asp Gly Met Glu Arg Asp Tyr
 70 75 80

 cgc gcc atc cca gag ctg gac gcc tat gag gcc gag gga ctg gct ctg 348
 Arg Ala Ile Pro Glu Leu Asp Ala Tyr Glu Ala Glu Gly Leu Ala Leu

ES 2 417 808 T3

85					90					95						
gat	gat	gag	gac	gta	gag	gag	ctg	acg	gcc	agt	cag	agg	gag	gca	gca	396
Asp	Asp	Glu	Asp	Val	Glu	Glu	Leu	Thr	Ala	Ser	Gln	Arg	Glu	Ala	Ala	
		100					105					110				
gag	cgg	gcc	atg	cgg	cag	cgt	gac	cgg	gag	gct	ggc	cgg	ggc	ctg	ggc	444
Glu	Arg	Ala	Met	Arg	Gln	Arg	Asp	Arg	Glu	Ala	Gly	Arg	Gly	Leu	Gly	
	115					120					125					
cgc	atg	cgc	cgt	ggg	ctc	ctg	tat	gac	agc	gat	gag	gag	gac	gag	gag	492
Arg	Met	Arg	Arg	Gly	Leu	Leu	Tyr	Asp	Ser	Asp	Glu	Glu	Asp	Glu	Glu	
130					135					140					145	
cgc	cct	gcc	cgc	aag	cgc	cgc	cag	gtg	gag	cgg	gcc	acg	gag	gac	ggc	540
Arg	Pro	Ala	Arg	Lys	Arg	Arg	Gln	Val	Glu	Arg	Ala	Thr	Glu	Asp	Gly	
				150					155					160		
gag	gag	gac	gag	gag	atg	atc	gag	agc	atc	gag	aac	ctg	gag	gat	ctc	588
Glu	Glu	Asp	Glu	Glu	Met	Ile	Glu	Ser	Ile	Glu	Asn	Leu	Glu	Asp	Leu	
			165					170					175			
aaa	ggc	cac	tct	gtg	cgc	gag	tgg	gtg	agc	atg	gcg	ggc	ccc	cgg	ctg	636
Lys	Gly	His	Ser	Val	Arg	Glu	Trp	Val	Ser	Met	Ala	Gly	Pro	Arg	Leu	
		180					185					190				
gag	atc	cac	cac	cgc	ttc	aag	aac	ttc	ctg	cgc	act	cac	gtc	gac	agc	684
Glu	Ile	His	His	Arg	Phe	Lys	Asn	Phe	Leu	Arg	Thr	His	Val	Asp	Ser	
	195					200					205					
cac	ggc	cac	aac	gtc	ttc	aag	gag	cgc	atc	agc	gac	atg	tgc	aaa	gag	732
His	Gly	His	Asn	Val	Phe	Lys	Glu	Arg	Ile	Ser	Asp	Met	Cys	Lys	Glu	
210					215					220					225	
aac	cgt	gag	agc	ctg	gtg	gtg	aac	tat	gag	gac	ttg	gca	gcc	agg	gag	780
Asn	Arg	Glu	Ser	Leu	Val	Val	Asn	Tyr	Glu	Asp	Leu	Ala	Ala	Arg	Glu	
				230					235					240		
cac	gtg	ctg	gcc	tac	ttc	ctg	cct	gag	gca	ccg	gcg	gag	ctg	ctg	cag	828
His	Val	Leu	Ala	Tyr	Phe	Leu	Pro	Glu	Ala	Pro	Ala	Glu	Leu	Leu	Gln	
			245					250					255			
atc	ttt	gat	gag	gct	gcc	ctg	gag	gtg	gta	ctg	gcc	atg	tac	ccc	aag	876
Ile	Phe	Asp	Glu	Ala	Ala	Leu	Glu	Val	Val	Leu	Ala	Met	Tyr	Pro	Lys	
		260					265					270				
tac	gac	cgc	atc	acc	aac	cac	atc	cat	gtc	cgc	atc	tcc	cac	ctg	cct	924
Tyr	Asp	Arg	Ile	Thr	Asn	His	Ile	His	Val	Arg	Ile	Ser	His	Leu	Pro	
	275					280					285					
ctg	gtg	gag	gag	ctg	cgc	tcg	ctg	agg	cag	ctg	cat	ctg	aac	cag	ctg	972
Leu	Val	Glu	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Gln	Leu	His	Leu	Asn	Gln	Leu	
290					295					300				305		
atc	cgc	acc	agt	ggg	gtg	gtg	acc	agc	tgc	act	ggc	gtc	ctg	ccc	cag	1020
Ile	Arg	Thr	Ser	Gly	Val	Val	Thr	Ser	Cys	Thr	Gly	Val	Leu	Pro	Gln	
				310					315				320			
ctc	agc	atg	gtc	aag	tac	aac	tgc	aac	aag	tgc	aat	ttc	gtc	ctg	ggc	1068
Leu	Ser	Met	Val	Lys	Tyr	Asn	Cys	Asn	Lys	Cys	Asn	Phe	Val	Leu	Gly	

ES 2 417 808 T3

565					570					575					
ctg gct gac	cga gga	gtg tgt	ctc att	gat gaa	ttt gac	aag atg	aat	1836							
Leu Ala Asp	Arg Gly	Val Cys	Leu Ile	Asp Glu	Phe Asp	Lys Met	Asn								
	580		585		590										
gac cag gac	aga acc	agc atc	cat gag	gcc atg	gag caa	cag agc	atc	1884							
Asp Gln Asp	Arg Thr	Ser Ile	His Glu	Ala Met	Glu Gln	Gln Ser	Ile								
	595		600		605										
tcc atc tcg	aag gct	ggc atc	gtc acc	tcc ctg	cag gct	cgc tgc	acg	1932							
Ser Ile Ser	Lys Ala	Gly Ile	Val Thr	Ser Leu	Gln Ala	Arg Cys	Thr								
610		615		620		625									
gtc att gct	gcc gcc	aac ccc	ata gga	ggg cgc	tac gac	ccc tcg	ctg	1980							
Val Ile Ala	Ala Ala	Asn Pro	Ile Gly	Gly Arg	Tyr Asp	Pro Ser	Leu								
	630		635		640										
act ttc tct	gag aac	gtg gac	ctc aca	gag gcc	atc atc	tca cgc	ttt	2028							
Thr Phe Ser	Glu Asn	Val Asp	Leu Thr	Glu Pro	Ile Ile	Ser Arg	Phe								
	645		650		655										
gac atc ctg	tgt gtg	gtg agg	gac acc	gtg gac	cca gtc	cag gac	gag	2076							
Asp Ile Leu	Cys Val	Val Arg	Asp Thr	Val Asp	Pro Val	Gln Asp	Glu								
	660		665		670										
atg ctg gcc	cgc ttc	gtg gtg	ggc agc	cac gtc	aga cac	cac ccc	agc	2124							
Met Leu Ala	Arg Phe	Val Val	Gly Ser	His Val	Arg His	His Pro	Ser								
	675		680		685										
aac aag gag	gag gag	ggg ctg	gcc aat	ggc agc	gct gct	gag ccc	gcc	2172							
Asn Lys Glu	Glu Glu	Gly Leu	Ala Asn	Gly Ser	Ala Ala	Glu Pro	Ala								
690		695		700		705									
atg ccc aac	acg tat	ggc gtg	gag ccc	ctg ccc	cag gag	gtc ctg	aag	2220							
Met Pro Asn	Thr Tyr	Gly Val	Glu Pro	Leu Pro	Gln Glu	Val Leu	Lys								
	710		715		720										
aag tac atc	atc tac	gcc aag	gag agg	gtc cac	ccg aag	ctc aac	cag	2268							
Lys Tyr Ile	Ile Tyr	Ala Lys	Glu Arg	Val His	Pro Lys	Leu Asn	Gln								
	725		730		735										
atg gac cag	gac aag	gtg gcc	aag atg	tac agt	gac ctg	agg aaa	gaa	2316							
Met Asp Gln	Asp Lys	Val Ala	Lys Met	Tyr Ser	Asp Leu	Arg Lys	Glu								
	740		745		750										
tct atg gcg	aca ggc	agc atc	ccc att	acg gtg	cgg cac	atc gag	tcc	2364							
Ser Met Ala	Thr Gly	Ser Ile	Pro Ile	Thr Val	Arg His	Ile Glu	Ser								
	755		760		765										
atg atc cgc	atg gcg	gag gcc	cac gcg	cgc atc	cat ctg	cgg gac	tat	2412							
Met Ile Arg	Met Ala	Glu Ala	His Ala	Arg Ile	His Leu	Arg Asp	Tyr								
770		775		780		785									
gtg atc gaa	gac gac	gtc aac	atg gcc	atc cgc	gtg atg	ctg gag	agc	2460							
Val Ile Glu	Asp Asp	Val Asn	Met Ala	Ile Arg	Val Met	Leu Glu	Ser								
	790		795		800										
ttc ata gac	aca cag	aag ttc	agc gtc	atg cgc	agc atg	cgc aag	act	2508							
Phe Ile Asp	Thr Gln	Lys Phe	Ser Val	Met Arg	Ser Met	Arg Lys	Thr								

ES 2 417 808 T3

	805		810		815		
	ttt gcc cgc tac ctt tca ttc cgg cgt gac aac aat gag ctg ttg ctc						2556
	Phe Ala Arg Tyr Leu Ser Phe Arg Arg Asp Asn Asn Glu Leu Leu Leu						
	820		825		830		
	ttc ata ctg aag cag tta gtg gca gag cag gtg aca tat cag cgc aac						2604
	Phe Ile Leu Lys Gln Leu Val Ala Glu Gln Val Thr Tyr Gln Arg Asn		840		845		
	835						
	cgc ttt ggg gcc cag cag gac act att gag gtc cct gag aag gac ttg						2652
	Arg Phe Gly Ala Gln Gln Asp Thr Ile Glu Val Pro Glu Lys Asp Leu		855		860		865
	850						
	gtg gat aag gct cgt cag atc aac atc cac aac ctc tct gca ttt tat						2700
	Val Asp Lys Ala Arg Gln Ile Asn Ile His Asn Leu Ser Ala Phe Tyr		870		875		880
	gac agt gag ctc ttc agg atg aac aag ttc agc cac gac ctg aaa agg						2748
	Asp Ser Glu Leu Phe Arg Met Asn Lys Phe Ser His Asp Leu Lys Arg		885		890		895
	aaa atg atc ctg cag cag ttc tga ggcctatgc catccataag gattccttgg						2802
	Lys Met Ile Leu Gln Gln Phe *						
	900						
	gattctggtt tggggtggtc agtgcctct gtgctttatg gacacaaaac cagagcactt						2862
	gatgaactcg gggactagg gtcagggctt atagcaggat gtctggctgc acctggcatg						2922
	actgtttggt tctccaagcc tgctttgtgc ttctcacctt tgggtgggat gccttgccag						2982
	tgtgtcttac ttggttgctg aacatcttgc cacctccgag tgctttgtct ccaactcagta						3042
	ccttgatca gagctgctga gttcaggatg cctgcgtgtg gtttaggtgt tagccttctt						3102
	acatggatgt caggagagct gctgccctct tggcgtgagt tgcgtattca ggctgctttt						3162
	gctgcctttg gccagagagc tggttgaaga tgtttgaat cgttttcagt ctccctgcagg						3222
	tttctgtgcc cctgtggtgg aagagggcac gacagtcca gcgcagcgtt ctgggctcct						3282
	cagtcgcagg ggtgggatgt gagtcatgcg gattatccac tgcacacagt tatcagctgc						3342
	cattgctccc tgtctgtttc cccactctct tatttgtgca ttcggtttgg tttctgtagt						3402
	tttaattttt aataaagttg aataaaaatat aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a						3453

<210> 3

<211> 14

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Secuencia de aminoácidos para el epítipo para MCM2 del anticuerpo monoclonal 27C5.6

<400> 3

Ile	Tyr	Gln	Asn	Tyr	Gln	Arg	Ile	Arg	Ile	Gln	Glu	Ser	Pro
1				5					10				

<210> 4

15 <211> 23

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Secuencia de aminoácidos para el epítipo para MCM2 del anticuerpo monoclonal 26H6.19 (preliminar)

<400> 4

Pro	Ser	Asn	Lys	Glu	Glu	Glu	Gly	Leu	Ala	Asn	Gly	Ser	Ala	Ala	Glu
1				5					10					15	
Pro	Ala	Met	Pro	Asn	Thr	Tyr									
			20												

ES 2 417 808 T3

<210> 5
 <211> 2688
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

5

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos para el gen MCM2 truncado

10

<221> CDS
 <222> (1)...(2688)
 <223> Gen MCM2 truncado que carece de 27 pb en el extremo 5'

<400> 5

atg gca tcc agc ccg gcc cag cgt cgg cga ggc aat gat cct ctc acc	48
Met Ala Ser Ser Pro Ala Gln Arg Arg Arg Gly Asn Asp Pro Leu Thr	
1 5 10 15	
tcc agc cct ggc cga agc tcc cgg cgt act gat gcc ctc acc tcc agc	96
Ser Ser Pro Gly Arg Ser Ser Arg Arg Thr Asp Ala Leu Thr Ser Ser	
20 25 30	
cct ggc cgt gac ctt cca cca ttt gag gat gag tcc gag ggg ctc cta	144
Pro Gly Arg Asp Leu Pro Pro Phe Glu Asp Glu Ser Glu Gly Leu Leu	
35 40 45	
ggc aca gag ggg ccc ctg gag gaa gaa gag gat gga gag gag ctc att	192
Gly Thr Glu Gly Pro Leu Glu Glu Glu Glu Asp Gly Glu Glu Leu Ile	
50 55 60	
gga gat ggc atg gaa agg gac tac cgc gcc atc cca gag ctg gac gcc	240
Gly Asp Gly Met Glu Arg Asp Tyr Arg Ala Ile Pro Glu Leu Asp Ala	
65 70 75 80	
tat gag gcc gag gga ctg gct ctg gat gat gag gac gta gag gag ctg	288
Tyr Glu Ala Glu Gly Leu Ala Leu Asp Asp Glu Asp Val Glu Glu Leu	
85 90 95	
acg gcc agt cag agg gag gca gca gag cgg gcc atg cgg cag cgt gac	336
Thr Ala Ser Gln Arg Glu Ala Ala Glu Arg Ala Met Arg Gln Arg Asp	
100 105 110	
cgg gag gct ggc cgg ggc ctg ggc cgc atg cgc cgt ggg ctc ctg tat	384
Arg Glu Ala Gly Arg Gly Leu Gly Arg Met Arg Arg Gly Leu Leu Tyr	
115 120 125	
gac agc gat gag gag gac gag gag cgc cct gcc cgc aag cgc cgc cag	432
Asp Ser Asp Glu Glu Asp Glu Glu Arg Pro Ala Arg Lys Arg Arg Gln	
130 135 140	
gtg gag cgg gcc acg gag gac ggc gag gag gac gag gag atg atc gag	480
Val Glu Arg Ala Thr Glu Asp Gly Glu Glu Asp Glu Glu Met Ile Glu	
145 150 155 160	

15

ES 2 417 808 T3

agc atc gag aac ctg gag gat ctc aaa ggc cac tct gtg cgc gag tgg	528
Ser Ile Glu Asn Leu Glu Asp Leu Lys Gly His Ser Val Arg Glu Trp	
165 170 175	
gtg agc atg gcg ggc ccc cgg ctg gag atc cac cac cgc ttc aag aac	576
Val Ser Met Ala Gly Pro Arg Leu Glu Ile His His Arg Phe Lys Asn	
180 185 190	
ttc ctg cgc act cac gtc gac agc cac ggc cac aac gtc ttc aag gag	624
Phe Leu Arg Thr His Val Asp Ser His Gly His Asn Val Phe Lys Glu	
195 200 205	
cgc atc agc gac atg tgc aaa gag aac cgt gag agc ctg gtg gtg aac	672
Arg Ile Ser Asp Met Cys Lys Glu Asn Arg Glu Ser Leu Val Val Asn	
210 215 220	
tat gag gac ttg gca gcc agg gag cac gtg ctg gcc tac ttc ctg cct	720
Tyr Glu Asp Leu Ala Ala Arg Glu His Val Leu Ala Tyr Phe Leu Pro	
225 230 235 240	
gag gca ccg gcg gag ctg ctg cag atc ttt gat gag gct gcc ctg gag	768
Glu Ala Pro Ala Glu Leu Leu Gln Ile Phe Asp Glu Ala Ala Leu Glu	
245 250 255	
gtg gta ctg gcc atg tac ccc aag tac gac cgc atc acc aac cac atc	816
Val Val Leu Ala Met Tyr Pro Lys Tyr Asp Arg Ile Thr Asn His Ile	
260 265 270	
cat gtc cgc atc tcc cac ctg cct ctg gtg gag gag ctg cgc tcg ctg	864
His Val Arg Ile Ser His Leu Pro Leu Val Glu Glu Leu Arg Ser Leu	
275 280 285	
agg cag ctg cat ctg aac cag ctg atc cgc acc agt ggg gtg gtg acc	912
Arg Gln Leu His Leu Asn Gln Leu Ile Arg Thr Ser Gly Val Val Thr	
290 295 300	
agc tgc act ggc gtc ctg ccc cag ctc agc atg gtc aag tac aac tgc	960
Ser Cys Thr Gly Val Leu Pro Gln Leu Ser Met Val Lys Tyr Asn Cys	
305 310 315 320	
aac aag tgc aat ttc gtc ctg ggt cct ttc tgc cag tcc cag aac cag	1008
Asn Lys Cys Asn Phe Val Leu Gly Pro Phe Cys Gln Ser Gln Asn Gln	
325 330 335	
gag gtg aaa cca ggc tcc tgt cct gag tgc cag tcg gcc ggc ccc ttt	1056
Glu Val Lys Pro Gly Ser Cys Pro Glu Cys Gln Ser Ala Gly Pro Phe	
340 345 350	
gag gtc aac atg gag gag acc atc tat cag aac tac cag cgt atc cga	1104
Glu Val Asn Met Glu Glu Thr Ile Tyr Gln Asn Tyr Gln Arg Ile Arg	
355 360 365	
atc cag gag agt cca ggc aaa gtg gcg gct ggc cgg ctg ccc cgc tcc	1152
Ile Gln Glu Ser Pro Gly Lys Val Ala Ala Gly Arg Leu Pro Arg Ser	
370 375 380	
aag gac gcc att ctc ctc gca gat ctg gtg gac agc tgc aag cca gga	1200
Lys Asp Ala Ile Leu Leu Ala Asp Leu Val Asp Ser Cys Lys Pro Gly	
385 390 395 400	

ES 2 417 808 T3

gac gag ata gag ctg act ggc atc tat cac aac aac tat gat ggc tcc 1248
 Asp Glu Ile Glu Leu Thr Gly Ile Tyr His Asn Asn Tyr Asp Gly Ser
 405 410 415

ctc aac act gcc aat ggc ttc cct gtc ttt gcc act gtc atc cta gcc 1296
 Leu Asn Thr Ala Asn Gly Phe Pro Val Phe Ala Thr Val Ile Leu Ala
 420 425 430

aac cac gtg gcc aag aag gac aac aag gtt gct gta ggg gaa ctg acc 1344
 Asn His Val Ala Lys Lys Asp Asn Lys Val Ala Val Gly Glu Leu Thr
 435 440 445

gat gaa gat gtg aag atg atc act agc ctc tcc aag gat cag cag atc 1392
 Asp Glu Asp Val Lys Met Ile Thr Ser Leu Ser Lys Asp Gln Gln Ile
 450 455 460

gga gag aag atc ttt gcc agc att gct cct tcc atc tat ggt cat gaa 1440
 Gly Glu Lys Ile Phe Ala Ser Ile Ala Pro Ser Ile Tyr Gly His Glu
 465 470 475 480

gac atc aag aga ggc ctg gct ctg gcc ctg ttc gga ggg gag ccc aaa 1488
 Asp Ile Lys Arg Gly Leu Ala Leu Ala Leu Phe Gly Gly Glu Pro Lys
 485 490 495

aac cca ggt ggc aag cac aag gta cgt ggt gat atc aac gtg ctc ttg 1536
 Asn Pro Gly Gly Lys His Lys Val Arg Gly Asp Ile Asn Val Leu Leu
 500 505 510

tgc gga gac cct ggc aca gcg aag tcg cag ttt ctc aag tat att gag 1584
 Cys Gly Asp Pro Gly Thr Ala Lys Ser Gln Phe Leu Lys Tyr Ile Glu
 515 520 525

aaa gtg tcc agc cga gcc atc ttc acc act ggc cag ggg gcg tcg gct 1632
 Lys Val Ser Ser Arg Ala Ile Phe Thr Thr Gly Gln Gly Ala Ser Ala
 530 535 540

gtg ggc ctc acg gcg tat gtc cag cgg cac cct gtc agc agg gag tgg 1680
 Val Gly Leu Thr Ala Tyr Val Gln Arg His Pro Val Ser Arg Glu Trp
 545 550 555 560

acc ttg gag gct ggg gcc ctg gtt ctg gct gac cga gga gtg tgt ctc 1728
 Thr Leu Glu Ala Gly Ala Leu Val Leu Ala Asp Arg Gly Val Cys Leu
 565 570 575

att gat gaa ttt gac aag atg aat gac cag gac aga acc agc atc cat 1776
 Ile Asp Glu Phe Asp Lys Met Asn Asp Gln Asp Arg Thr Ser Ile His
 580 585 590

gag gcc atg gag caa cag agc atc tcc atc tcg aag gct ggc atc gtc 1824
 Glu Ala Met Glu Gln Gln Ser Ile Ser Ile Ser Lys Ala Gly Ile Val
 595 600 605

acc tcc ctg cag gct cgc tgc acg gtc att gct gcc gcc aac ccc ata 1872
 Thr Ser Leu Gln Ala Arg Cys Thr Val Ile Ala Ala Ala Asn Pro Ile
 610 615 620

gga ggg cgc tac gac ccc tcg ctg act ttc tct gag aac gtg gac ctc 1920
 Gly Gly Arg Tyr Asp Pro Ser Leu Thr Phe Ser Glu Asn Val Asp Leu
 625 630 635 640

ES 2 417 808 T3

<220>

<223> secuencia de nucleótidos 5' omitida de la secuencia de nucleótidos de MCM2 truncada

5 <400> 6
atggcggaat catcggaatc cttcacc 27

<210> 7
<211> 28
10 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Fragmento de MCM2 correspondiente a los residuos de aminoácido 355 a 382 del SEQ ID NO: 1

<400> 7
Cys Gln Ser Ala Gly Pro Phe Glu Val Asn Met Glu Glu Thr Ile Tyr
1 5 10 15
Gln Asn Tyr Gln Arg Ile Arg Ile Gln Glu Ser Pro
20 25

<210> 8
20 <211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Fragmento de MCM2 correspondiente a los residuos de aminoácido 355 a 368 del SEQ ID NO: 1

<400> 8
Cys Gln Ser Ala Gly Pro Phe Glu Val Asn Met Glu Glu Thr
1 5 10

30 <210> 9
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> Fragmento de MCM2 correspondiente a los residuos de aminoácido 362 a 375 del SEQ ID NO: 1

<400> 9
40 Glu Val Asn Met Glu Glu Thr Ile Tyr Gln Asn Tyr Gln Arg
1 5 10

<210> 10
<211> 2718
<212> DNA
45 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido inmunogénico MCM2 etiquetado con hexa-histidina

50 <221> rasgos_misc
<222> (2698) ... (2715)
<223> Secuencia de nucleótidos que codifica la etiqueta de hexa-histidina

55 <400> 10

```

atggcatcca gcccgccca gcgtcggcga ggcaatgatc ctctcacctc cagccctggc 60
cgaagctccc ggcgtactga tgccctcacc tccagccctg gccgtgacct tccaccatth 120
gaggatgagt ccgaggggct cctaggcaca gaggggcccc tggaggaaga agaggatgga 180
gaggagctca ttggagatgg catggaaagg gactaccgcg ccatcccaga gctggacgcc 240
tatgaggccg agggactggc tctggatgat gaggacgtag aggagctgac ggccagttag 300
agggaggcag cagagcgggc catgcggcag cgtgaccggg aggctggcgg gggcctgggg 360
cgcatgcgcc gtgggctcct gtatgacagc gatgaggagg acgaggagcg ccttgcccgc 420
aagcgcggcc aggtggagcg ggccacggag gacggcgagg aggacgagga gatgattgag 480
agcatcgaga acctggagga tctcaaaggc cactctgtgc gcgagtgggt gagcatggcg 540
ggccccggc tggagatcca ccaccgcttc aagaacttcc tgcgactca cgtcgacagc 600
cacggccaca acgtcttcaa ggagcgcac agcgacatgt gcaaagagaa cctgtagagc 660
ctggtgggga actatgagga ctggcagcc agggagcagc tgctggccta cttcctgcct 720
gaggcaccgg cggagctgct gcagatcttt gatgaggctg ccctggagggt ggtactggcc 780
atgtacccca agtacgaccg catcaccaac cacatccatg tccgcatctc ccacctgcct 840
ctggtggagg aggtgcgctc gctgaggcag ctgcatctga accagctgat ccgaccagct 900
gggtcggaga ccagctgcac tggcgtcctg ccccagctca gcatgggcaa gtacaactgc 960
aacaagtgca atttcgtcct gggctcctttc tgccagtccc agaaccagga ggtgaaacca 1020
ggctcctgct ctgagtcca gtcggccggc ccctttgagg tcaacatgga ggagaccatc 1080
tatcagaact accagcgtat ccgaatccag gagagtccag gcaaagtggc ggctggccgg 1140
ctgccccgct ccaaggacgc cattctcctc gcagatctgg tggacagctg caagccagga 1200
gacgagatag agctgactgg catctatcac aacaactatg atggctccct caaactgccc 1260
aatggcttcc ctgtctttgc cactgtcatc ctagccaacc acgtggccaa gaaggacaac 1320
aaggttgctg taggggaact gaccgatgaa atgtggaaga tgatcactag cctctccaag 1380
gatcagcaga tcggagagaa gatctttgcc agcattgtct cttccatcta tggatcatgaa 1440
gacatcaaga gaggcctggc tctggccctg ttcggagggg agcccaaaaa cccaggtggc 1500
aagcacaagg tacgtgggta tatcaacgtg ctcttgtgcg gagaccctgg cacagcgaag 1560
tcgcagtttc tcaagtatat tgagaaagtg tccagccgag ccatcttcac cactggccag 1620
ggggcgtcgg ctgtgggctt cacggcgtat gtccagcggc accctgtcag cagggagtgg 1680
accttggagg ctggggccct ggttctggct gaccgaggag tgtgtctcat tgatgaatth 1740
gacaagatga atgaccagga cagaaccagc atccatgagg ccatggagca acagagcatc 1800
tccatctoga aggctggcat cgtcacctcc ctgcaggctc gctgcacggc cattgctgcc 1860
gccaacccca taggagggcg ctacgacccc tcgctgactt tctctgagaa cgtggacctc 1920
acagagccca tcatctcacg ctttgacatc ctgtgtgtgg tgagggacac cgtggacca 1980
gtccaggacg agatgctggc ccgcttcgtg gtggcagcc acgtcagaca ccaccccagc 2040
aacaaggagg aggaggggct ggccaatggc agcgtgctg agcccgccat gcccaacacg 2100
tatggctgag agcccctgcc ccaggaggtc ctgaagaagt acatcatcta cgccaaggag 2160
aggttcacc cgaactcaa ccagatggac caggacaagg tggccaagat gtacagttag 2220
ctgaggaaag aatctatggc gacaggcagc atcccatta cgggtcggca catcgagctc 2280
atgatccgca tggcggaggc ccacgcgcgc atccatctgc gggactatgt gatcgaagac 2340
gacgtcaaca tggccatccg cgtgatgctg gagagcttca tagacacaca gaagttcagc 2400
gtcatgcgca gcatgcgcaa gacttttgcc cgctaccttt cattccggcg tgacaacaat 2460
gagctgthtc tcttcatact gaagcagtha gtggcagagc aggtgacata tcagcgcgcaac 2520
cgctttgggg cccagcagga cactattgag gtccctgaga aggacttggg ggataaggct 2580
cgtcagatca acatccacaa cctctctgca ttttatgaca gtgagctctt caggatgaa 2640
aagttcagcc acgacctgaa aaggaaaatg atcctgcagc agttcctoga ggggtggctat 2700
catcatcacc atcattga

```

2718

- <210> 11
- 5 <211> 905
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 10 <223> Secuencia de aminoácidos para el polipéptido inmunogénico etiquetado con hexa-histidina
- <223> Etiqueta de hexa-histidina
- <400> 11

ES 2 417 808 T3

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

Glu Val Asn Met Glu Glu Thr Ile Tyr Gln Asn Tyr Gln Arg Ile Arg
 355 360 365
 Ile Gln Glu Ser Pro Gly Lys Val Ala Ala Gly Arg Leu Pro Arg Ser
 370 375 380
 Lys Asp Ala Ile Leu Leu Ala Asp Leu Val Asp Ser Cys Lys Pro Gly
 385 390 395 400
 Asp Glu Ile Glu Leu Thr Gly Ile Tyr His Asn Asn Tyr Asp Gly Ser
 405 410 415
 Leu Asn Thr Ala Asn Gly Phe Pro Val Phe Ala Thr Val Ile Leu Ala
 420 425 430
 Asn His Val Ala Lys Lys Asp Asn Lys Val Ala Val Gly Glu Leu Thr
 435 440 445
 Asp Glu Asp Val Lys Met Ile Thr Ser Leu Ser Lys Asp Gln Gln Ile
 450 455 460
 Gly Glu Lys Ile Phe Ala Ser Ile Ala Pro Ser Ile Tyr Gly His Glu
 465 470 475 480
 Asp Ile Lys Arg Gly Leu Ala Leu Ala Leu Phe Gly Gly Glu Pro Lys
 485 490 495
 Asn Pro Gly Gly Lys His Lys Val Arg Gly Asp Ile Asn Val Leu Leu
 500 505 510
 Cys Gly Asp Pro Gly Thr Ala Lys Ser Gln Phe Leu Lys Tyr Ile Glu
 515 520 525
 Lys Val Ser Ser Arg Ala Ile Phe Thr Thr Gly Gln Gly Ala Ser Ala
 530 535 540
 Val Gly Leu Thr Ala Tyr Val Gln Arg His Pro Val Ser Arg Glu Trp
 545 550 555 560
 Thr Leu Glu Ala Gly Ala Leu Val Leu Ala Asp Arg Gly Val Cys Leu
 565 570 575
 Ile Asp Glu Phe Asp Lys Met Asn Asp Gln Asp Arg Thr Ser Ile His
 580 585 590
 Glu Ala Met Glu Gln Gln Ser Ile Ser Ile Ser Lys Ala Gly Ile Val
 595 600 605
 Thr Ser Leu Gln Ala Arg Cys Thr Val Ile Ala Ala Ala Asn Pro Ile
 610 615 620
 Gly Gly Arg Tyr Asp Pro Ser Leu Thr Phe Ser Glu Asn Val Asp Leu
 625 630 635 640
 Thr Glu Pro Ile Ile Ser Arg Phe Asp Ile Leu Cys Val Val Arg Asp
 645 650 655
 Thr Val Asp Pro Val Gln Asp Glu Met Leu Ala Arg Phe Val Val Gly
 660 665 670
 Ser His Val Arg His His Pro Ser Asn Lys Glu Glu Glu Gly Leu Ala
 675 680 685
 Asn Gly Ser Ala Ala Glu Pro Ala Met Pro Asn Thr Tyr Gly Val Glu
 690 695 700
 Pro Leu Pro Gln Glu Val Leu Lys Lys Tyr Ile Ile Tyr Ala Lys Glu
 705 710 715 720
 Arg Val His Pro Lys Leu Asn Gln Met Asp Gln Asp Lys Val Ala Lys
 725 730 735
 Met Tyr Ser Asp Leu Arg Lys Glu Ser Met Ala Thr Gly Ser Ile Pro
 740 745 750
 Ile Thr Val Arg His Ile Glu Ser Met Ile Arg Met Ala Glu Ala His
 755 760 765
 Ala Arg Ile His Leu Arg Asp Tyr Val Ile Glu Asp Asp Val Asn Met
 770 775 780
 Ala Ile Arg Val Met Leu Glu Ser Phe Ile Asp Thr Gln Lys Phe Ser
 785 790 795 800
 Val Met Arg Ser Met Arg Lys Thr Phe Ala Arg Tyr Leu Ser Phe Arg
 805 810 815
 Arg Asp Asn Asn Glu Leu Leu Leu Phe Ile Leu Lys Gln Leu Val Ala
 820 825 830

ES 2 417 808 T3

Glu Gln Val Thr Tyr Gln Arg Asn Arg Phe Gly Ala Gln Gln Asp Thr
 835 840 845
 Ile Glu Val Pro Glu Lys Asp Leu Val Asp Lys Ala Arg Gln Ile Asn
 850 855 860
 Ile His Asn Leu Ser Ala Phe Tyr Asp Ser Glu Leu Phe Arg Met Asn
 865 870 875 880
 Lys Phe Ser His Asp Leu Lys Arg Lys Met Ile Leu Gln Gln Phe Leu
 885 890 895
 Glu Gly Gly His His His His His His
 900 905

<210> 12

<211> 2718

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido MCM2-FLAG

<400> 12

atggcatcca gccggccca ggcgcggcga ggcaatgatc ctctcacctc cagccctggc 60
 cgaagctccc ggctactga tgccctcacc tccagccctg gccgtgacct tccaccattt 120
 gaggatgagt ccgaggggct cctaggcaca gaggggcccc tggaggaaga agaggatgga 180
 gaggagctca ttggagatgg catggaaagg gactaccgcg ccatcccaga gctggacgcc 240
 tatgaggccg agggactggc tctggatgat gaggacgtag aggagctgac ggccagtcag 300
 agggaggcag cagagcgggc catgcggcag cgtgaccggg aggctggccg gggcctgggc 360
 cgcattgcgc gtgggctcct gtatgacagc gatgaggagg acgaggagcg ccctgccccg 420
 aagcgcggcg agtgaggcg ggccacggag gacggcgagg aggacgagga gatgattgag 480
 agcatcgaga acctggagga tctcaaaggc cactctgtgc gcgagtgggt gacatggcg 540
 ggccccggc tggagatcca ccaccgcttc aagaacttcc tgcgcactca cgtcgacagc 600
 cacggccaca acgtcttcaa ggagcgcac agcgcacatgt gcaaagagaa ccgtgagagc 660
 ctgggtggtga actatgagga cttggcagcc agggagcacg tgctggccta cttcctgcct 720
 gaggcaccgg cggagctgct gcagatcttt gatgaggctg ccctggaggt ggtactggcc 780
 atgtacccca agtacgaccg catcaccaac cacatccatg tccgcatctc ccacctgcct 840
 ctgggtggag acgtgcgctc gctgaggcag cctcatctga accagctgat ccgcaccagt 900
 ggggtggtga ccagctgcac tggcgtcctg ccccagctca gcatggtcaa gtacaactgc 960
 aacaagtgca atttcgtcct gggtcctttc tgccagtccc agaaccagga ggtgaaacca 1020
 ggctcctgct ctgagtgcc a gtcggccggc ccctttgagg tcaacatgga ggagaccatc 1080
 tatcagaact accagcgtat ccgaatccag gagagtccag gcaaagtggc ggctggcccg 1140
 ctgccccgct ccaaggacgc cattctcctc gcagatctgg tggacagctg caagccagga 1200
 gacgagatag agctgactgg catctatcac aacaactatg atggctccct caaactgccc 1260
 aatggcttcc ctgtctttgc cactgtcacc ctatgccaacc acgtggccaa gaaggacaac 1320
 aaggttgctg taggggaact gaccgatgaa gatgtgaaga tgatcactag cctctccaag 1380
 gatcagcaga tcggagagaa gatctttgcc agcattgctc cttccatcta tggatcatgaa 1440
 gacatcaaga gaggcctggc tctggccctg ttoggagggg agcccaaaaa cccagggtggc 1500
 aagcacaagg tacgtggtga tatcaacgtg ctcttgtgcg gagaccctgg cacagcgaag 1560
 tcgcagtttc tcaagtatat tgagaaagtg tccagccgag ccatcttcac cactggccag 1620
 ggggcgtcgg ctgtgggcct cacggcgtat gtcagcggc accctgtcag cagggagtgg 1680
 acctggagg ctggggccct ggttctggct gaccgaggag tgtgtctcat tgatgaattt 1740
 gacaagatga atgaccagga cagaaccagc atccatgagg ccatggagca acagagcatc 1800
 tccatctcga aggctggcat cgtcacctcc ctgcaggctc gctgcacggc cattgctgcc 1860
 gccaacccca taggagggcg ctacgacccc tcgctgactt tctctgagaa cgtggacctc 1920
 acagagccca tcatctcacg ctttgacatc ctgtgtgtgg tgagggacac cgtggacca 1980
 gtccaggacg agatgctggc ccgcttcgtg gtgggcagcc acgtcagaca ccaccccagc 2040
 aacaaggagg agggggggct ggccaatggc agcgtgctg agcccggcat gcccaacagc 2100
 tatggcgtgg agcccctgcc ccaggaggtc ctgaagaagt acatcatcta cgccaaggag 2160
 agggctccacc cgaagctcaa ccagatggac caggacaagg tggccaagat gtacagtgc 2220
 ctgaggaaaag aatctatggc gacaggcagc atccccatta cgggtgcggca catcgagtcc 2280

ES 2 417 808 T3

```
atgatccgca tggcggaggc ccacgcgcgc atccatctgc gggactatgt gatcgaagac 2340
gacgtcaaca tggccatccg cgtgatgctg gagagettca tagacacaca gaagttcagc 2400
gtcatgcgca gcatgcgcaa gacttttgcc cgctaccttt cattccggcg tgacaacaat 2460
gagctggtgc tcttcatact gaagcagtta gtggcagagc aggtgacata tcagcgcgaac 2520
cgctttgggg cccagcagga cactattgag gtccctgaga aggacttggg ggataaggct 2580
cgtcagatca acatccacaa cctctctgca ttttatgaca gtgagctctt caggatgaac 2640
aagttcagcc acgacctgaa aaggaaaatg atcctgcagc agttcctcga ggactacaaa 2700
gacgacgacg acaagtag 2718
```

<210> 13

<211> 905

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos para el polipéptido MCM2-FLAG

10

<400> 13

ES 2 417 808 T3

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

Glu Val Lys Pro Gly Ser Cys Pro Glu Cys Gln Ser Ala Gly Pro Phe
 340 345 350
 Glu Val Asn Met Glu Glu Thr Ile Tyr Gln Asn Tyr Gln Arg Ile Arg
 355 360 365
 Ile Gln Glu Ser Pro Gly Lys Val Ala Ala Gly Arg Leu Pro Arg Ser
 370 375 380
 Lys Asp Ala Ile Leu Leu Ala Asp Leu Val Asp Ser Cys Lys Pro Gly
 385 390 395 400
 Asp Glu Ile Glu Leu Thr Gly Ile Tyr His Asn Asn Tyr Asp Gly Ser
 405 410 415
 Leu Asn Thr Ala Asn Gly Phe Pro Val Phe Ala Thr Val Ile Leu Ala
 420 425 430
 Asn His Val Ala Lys Lys Asp Asn Lys Val Ala Val Gly Glu Leu Thr
 435 440 445
 Asp Glu Asp Val Lys Met Ile Thr Ser Leu Ser Lys Asp Gln Gln Ile
 450 455 460
 Gly Glu Lys Ile Phe Ala Ser Ile Ala Pro Ser Ile Tyr Gly His Glu
 465 470 475 480
 Asp Ile Lys Arg Gly Leu Ala Leu Ala Leu Phe Gly Gly Glu Pro Lys
 485 490 495
 Asn Pro Gly Gly Lys His Lys Val Arg Gly Asp Ile Asn Val Leu Leu
 500 505 510
 Cys Gly Asp Pro Gly Thr Ala Lys Ser Gln Phe Leu Lys Tyr Ile Glu
 515 520 525
 Lys Val Ser Ser Arg Ala Ile Phe Thr Thr Gly Gln Gly Ala Ser Ala
 530 535 540
 Val Gly Leu Thr Ala Tyr Val Gln Arg His Pro Val Ser Arg Glu Trp
 545 550 555 560
 Thr Leu Glu Ala Gly Ala Leu Val Leu Ala Asp Arg Gly Val Cys Leu
 565 570 575
 Ile Asp Glu Phe Asp Lys Met Asn Asp Gln Asp Arg Thr Ser Ile His
 580 585 590
 Glu Ala Met Glu Gln Gln Ser Ile Ser Ile Ser Lys Ala Gly Ile Val
 595 600 605
 Thr Ser Leu Gln Ala Arg Cys Thr Val Ile Ala Ala Ala Asn Pro Ile
 610 615 620
 Gly Gly Arg Tyr Asp Pro Ser Leu Thr Phe Ser Glu Asn Val Asp Leu
 625 630 635 640
 Thr Glu Pro Ile Ile Ser Arg Phe Asp Ile Leu Cys Val Val Arg Asp
 645 650 655
 Thr Val Asp Pro Val Gln Asp Glu Met Leu Ala Arg Phe Val Val Gly
 660 665 670
 Ser His Val Arg His His Pro Ser Asn Lys Glu Glu Glu Gly Leu Ala
 675 680 685
 Asn Gly Ser Ala Ala Glu Pro Ala Met Pro Asn Thr Tyr Gly Val Glu
 690 695 700
 Pro Leu Pro Gln Glu Val Leu Lys Lys Tyr Ile Ile Tyr Ala Lys Glu
 705 710 715 720
 Arg Val His Pro Lys Leu Asn Gln Met Asp Gln Asp Lys Val Ala Lys
 725 730 735
 Met Tyr Ser Asp Leu Arg Lys Glu Ser Met Ala Thr Gly Ser Ile Pro
 740 745 750
 Ile Thr Val Arg His Ile Glu Ser Met Ile Arg Met Ala Glu Ala His
 755 760 765
 Ala Arg Ile His Leu Arg Asp Tyr Val Ile Glu Asp Asp Val Asn Met
 770 775 780
 Ala Ile Arg Val Met Leu Glu Ser Phe Ile Asp Thr Gln Lys Phe Ser
 785 790 795 800
 Val Met Arg Ser Met Arg Lys Thr Phe Ala Arg Tyr Leu Ser Phe Arg
 805 810 815

ES 2 417 808 T3

```

Arg Asp Asn Asn Glu Leu Leu Leu Phe Ile Leu Lys Gln Leu Val Ala
      820                               825           830
Glu Gln Val Thr Tyr Gln Arg Asn Arg Phe Gly Ala Gln Gln Asp Thr
      835                               840           845
Ile Glu Val Pro Glu Lys Asp Leu Val Asp Lys Ala Arg Gln Ile Asn
      850                               855           860
Ile His Asn Leu Ser Ala Phe Tyr Asp Ser Glu Leu Phe Arg Met Asn
      865                               870           875           880
Lys Phe Ser His Asp Leu Lys Arg Lys Met Ile Leu Gln Gln Phe Leu
      885                               890           895
Glu Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
      900                               905

```

<210> 14

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Secuencia de aminoácidos para el epítipo para MCM2 del anticuerpo monoclonal 26H6.19 (refinada)

<400> 14

```

His Val Arg His His Pro Ser Asn Lys Glu
  1           5           10

```

15

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal que es capaz de unirse específicamente al mantenimiento de minicromosomas 2, donde el anticuerpo se selecciona entre:
- 5 (a) el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma 26H6.19, depositada en la ATCC con el Núm. de Depósito de Patente PTA-6667;
- (b) un anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo dentro de la secuencia del SEQ ID NO: 14; y
- 10 (c) un anticuerpo monoclonal que compite en un análisis de unión competitiva con el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma 26H6.19; o
- (e) un anticuerpo monoclonal que es un fragmento de unión a antígeno de (a)-(c) donde el fragmento conserva la capacidad de unirse específicamente al mantenimiento de minicromosomas.
2. La línea celular de hibridoma 26H6.19, depositada en la ATCC con el Núm. de Depósito de Patente PTA-6667.
- 15 3. Una línea celular de hibridoma capaz de producir un anticuerpo monoclonal de la reivindicación 1.
4. Un kit para diagnosticar una enfermedad cervical de alto grado que comprende al menos un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1.
- 20 5. El kit de la reivindicación 4, donde el anticuerpo monoclonal es el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma 26H6.19, depositada en la ATCC con el Núm. de Depósito de Patente PTA-6667.
6. El kit de la reivindicación 4, que comprende al menos dos anticuerpos, donde un primer anticuerpo es el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma 27C5.6, depositada en la ATCC con el Núm. de Depósito de Patente PTA-6668, y un segundo anticuerpo es el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma 26H6.19 depositada en la ATCC con el Núm. de Depósito de Patente PTA-6667.
- 25 7. El kit de la reivindicación 6, que comprende adicionalmente un anticuerpo que se une específicamente a la topoisomerasa alfa II.
- 30 8. El kit de la reivindicación 6, donde cada anticuerpo se proporciona en forma de un reactivo de anticuerpo separado, o donde todos los anticuerpos se proporcionan en forma de un cóctel de anticuerpos.
- 35 9. El kit de la reivindicación 4, donde dicho kit comprende adicionalmente un reactivo de bloqueo de peroxidasa, un reactivo de bloqueo de proteína, agentes químicos para la detección de la unión del anticuerpo al mantenimiento de minicromosomas 2, una contratinción, un agente de añil, e instrucciones para su uso.
- 40 10. El kit de la reivindicación 4, que comprende adicionalmente reactivos para la tinción de Papanicolaou, donde los reactivos para la tinción de Papanicolaou comprenden preferiblemente alcohol-eosina 50 y Orange G.
11. Un método para diagnosticar una enfermedad cervical de alto grado en un paciente, comprendiendo el método:
- 45 a) poner en contacto *in vitro* una muestra obtenida del paciente con al menos un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1, que se une específicamente al mantenimiento de minicromosomas 2; y,
- b) detectar la unión del anticuerpo al mantenimiento de minicromosomas 2.
12. El método de la reivindicación 11, donde el anticuerpo monoclonal es el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma 26H6.19, depositada en la ATCC con el Núm. de Depósito de Patente PTA-6667.
- 50 13. El método de la reivindicación 11, que comprende poner en contacto la muestra con al menos dos anticuerpos monoclonales que se unen específicamente al mantenimiento de minicromosomas 2, donde un primer anticuerpo es el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma 27C5.6, depositada en la ATCC con el Núm. de Depósito de Patente PTA-6668, y un segundo anticuerpo es el anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma 26H6.19 depositada en la ATCC con el Núm. de Depósito de Patente PTA-6667.
- 55 14. El método de la reivindicación 13, que comprende adicionalmente poner en contacto la muestra con un anticuerpo que se une específicamente a la topoisomerasa alfa II.
- 60 15. El método de la reivindicación 13, donde los anticuerpos se ponen en contacto con la muestra sucesivamente en forma de reactivos de anticuerpo individuales o simultáneamente en forma de cóctel de anticuerpos.