

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 818 948**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

**C07K 16/30** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.10.2014 PCT/US2014/062649**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.10.2015 WO15147915**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2014 E 14886988 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2020 EP 3123173**

54 Título: **Composiciones para la supresión del cáncer por inhibición de TMCC3**

30 Prioridad:

**24.03.2014 US 201414223800**

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

**14.04.2021**

73 Titular/es:

**DEVELOPMENT CENTER FOR BIOTECHNOLOGY (33.0%)**

**No. 101 Lane 169 Kangning St.**

**New Taipei City 221, TW;**

**CHANG GUNG MEMORIAL HOSPITAL (33.0%) y**

**ACADEMIA SINICA (33.0%)**

72 Inventor/es:

**YU, ALICE, L.;**

**YU, JOHN;**

**WANG, YA-HUI;**

**HSU, CHUAN-LUNG;**

**CHEN, YI-CHANG y**

**LOK, YING-YUNG**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 818 948 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

Composiciones para la supresión del cáncer por inhibición de TMCC3

5 **Campo técnico**

La presente solicitud se refiere al campo del tratamiento contra el cáncer. En particular, la solicitud se refiere a biofirmas de células cancerosas para la detección precoz, el pronóstico y la predicción de respuestas terapéuticas para el cáncer. Más particularmente, la divulgación se refiere a métodos para el diagnóstico y el tratamiento contra el cáncer mediante un biomarcador de células madre cancerosas, la familia de la proteína con dominios de superhélice transmembrana 3 (TMCC3).

**Antecedentes**

15 La mayoría de las muertes por cáncer ocurren como resultado de una enfermedad recurrente o metastásica más que por los efectos del tumor primario. Un tumor puede considerarse como un órgano aberrante iniciado por una célula cancerosa tumorigénica que adquirió la capacidad de proliferación indefinida a través de mutaciones acumuladas. En esta visión de un tumor como un órgano anormal, los principios de la biología de las células madre normales se pueden aplicar para comprender mejor cómo se desarrollan y diseminan los tumores. Muchas observaciones sugieren que son apropiadas las analogías entre las células madre normales y las células tumorigénicas. Tanto las células madre normales como las tumorigénicas tienen un gran potencial proliferativo y la capacidad de dar lugar a tejidos nuevos (normales o anormales). Las células tumorigénicas se pueden considerar como células madre cancerosas (CSC) que se someten a un proceso de organogénesis aberrante y mal regulado análogo al de las células madre normales. Tanto los tumores como los tejidos normales están compuestos por combinaciones heterogéneas de células, con diferentes características fenotípicas y diferentes potenciales proliferativos.

Se cree que las células madre cancerosas son una pequeña fracción de células tumorales con propiedades similares a las de las células madre, que inician y mantienen los clones neoplásicos. Estas células tienen la capacidad de autorrenovarse, pero también dan lugar a progenitores que producen células cancerosas fenotípicamente diversas pero con menor potencial tumorigénico. Esta subpoblación de células parecidas a las células madre debería ser muy eficaz en la formación de tumores en comparación con las células tumorales que no son células madre cancerosas.

Las células madre cancerosas (CSC) ahora se han identificado en una amplia variedad de cánceres que incluyen melanomas, meduloblastomas, tumores de colon, hígado, pulmón, próstata, mama y ovario. Si bien las CSC no surgen necesariamente de células madre normales, con frecuencia se han aislado mediante el uso de marcadores que se encuentran en las células madre normales. Por ejemplo, el marcador CD133 se ha utilizado para identificar células madre hematopoyéticas y neurales adultas normales. El CD133 se ha utilizado ahora con éxito para enriquecer las CSC de melanoma, meduloblastoma, tumores de colon y próstata.

La presencia de células madre cancerosas tiene profundas implicaciones para la terapia del cáncer. En la actualidad, todas las células cancerosas fenotípicamente diversas de un tumor se tratan como si tuvieran un potencial proliferativo ilimitado y pudieran adquirir la capacidad de metastatizar. Durante muchos años, sin embargo, se ha reconocido que se pueden detectar pequeñas cantidades de células cancerosas diseminadas en sitios distantes de los tumores primarios en pacientes que nunca manifiestan enfermedad metastásica. Una posibilidad es que la mayoría de las células cancerosas carezcan de la capacidad de formar un nuevo tumor, de modo que, solo la diseminación de células madre cancerosas raras puede conducir a una enfermedad metastásica. Por tanto, el objetivo de la terapia debe ser identificar y destruir esta población de células madre cancerosas.

Las terapias existentes se han desarrollado en gran medida contra la gran población de células tumorales, porque las terapias se identifican por su capacidad para reducir la masa tumoral. Sin embargo, debido a que la mayoría de las células dentro de un cáncer tienen un potencial proliferativo limitado, la capacidad para reducir un tumor refleja principalmente la capacidad de destruir estas células. Las terapias que se dirigen más específicamente contra las células madre cancerosas pueden dar como resultado respuestas y curas más duraderas de los tumores metastásicos.

Se ha demostrado la existencia de células madre cancerosas (CSC) en varios cánceres humanos. Estas CSC poseen la capacidad de autorrenovación, diferenciación y muestran resistencia a los agentes quimioterapéuticos y la radiación, lo que puede ser la causa de la recaída tumoral años después de la remisión clínica (2, 3). Wang y Yu describen las funciones de TMCC3 en las células de cáncer de mama (DOI:10.1158/1538-7445.AM2012-331).

Datos recientes indican que las células dentro de un tumor son heterogéneas y representan diferentes estadios del desarrollo (Clarke *et al.* 2006. *Cancer Res.* 66:9339-9344). En algunos tipos de cáncer, se ha identificado una población de células que se denominan células madre cancerosas, donde una célula madre cancerosa se define como una célula que tiene la capacidad de autorrenovarse y dar lugar a los linajes heterogéneos de células cancerosas que componen un tumor. Experimentalmente, dichas células son células que tienen la capacidad de generar un tumor en continuo crecimiento (Clarke *et al.* 2006. *Cancer Res.* 66:9339-9344). Las células madre cancerosas pueden surgir de células madre normales pero también de células que adquieren la capacidad de autorrenovarse potencialmente debido

a una serie de eventos mutagénicos dentro de la célula. Existe un interés considerable en el papel que tienen las células madre cancerosas en ciertos tipos de cáncer. Los tipos de cáncer que se han asociado con la presencia de células madre cancerosas incluyen cáncer de mama (Al-Hajj *et al.* 2003. PNAS 100:3983-3988), cáncer pancreático (Hermann *et al.* 2007. Cell Stem Cell 1:313-323), cáncer de cerebro (Singh *et al.* 2004. Nature 432:396-401), y cáncer testicular (Houldsworth *et al.* 2006. J. Clin. Oncol. 24:5512-5518; Clark A. T. 2007. Stem Cell Rev. 3:49-59.

Para diseñar la terapia contra el cáncer, es deseable buscar dianas moleculares de cáncer o células madre cancerosas que están ausentes en las células normales. Aunque muchos fármacos quimioterapéuticos y agentes terapéuticos dirigidos han mejorado la tasa de curación del cáncer, la enfermedad recurrente sigue siendo un desafío debido al desarrollo de resistencia a los fármacos. Por tanto, será importante identificar la biofirma para la detección precoz, el pronóstico y la predicción de respuestas terapéuticas para el cáncer. Hasta la fecha, no existen biomarcadores confiables y validados específicos para la detección precoz del cáncer.

Es muy deseable poder identificar estas células madre cancerosas usando marcadores específicos y a continuación usar estos marcadores para desarrollar terapias específicas de células madre cancerosas. La presente divulgación aborda este problema.

### Sumario

Esta invención se basa en la nueva observación de que se produce una mayor expresión de TMCC3 en líneas celulares de cáncer de mama invasivas y células madre cancerosas de mama (BCSC), en comparación con líneas menos invasivas y no BCSC.

Existen cada vez más datos que demuestran que las células madre cancerosas son propensas a metastatizar y son relativamente resistentes a la quimioterapia y la radiación. Por tanto, será importante comprender las características moleculares de las células madre cancerosas de mama (BCSC) que pueden conducir al desarrollo de nuevas dianas para la terapia dirigida a las CSC.

Mediante el análisis fosfoproteómico de las BCSC y no BCSC, identificamos la expresión diferencial de la familia de la proteína con dominios de superhélice transmembrana 3 (TMCC3). TMCC3 pertenece a la familia TEX28 y se predice que es una proteína integral de membrana. La función de TMCC3 se desconoce.

TMCC3 es esencial para la supervivencia celular, la proliferación, metástasis, así como la autorrenovación y el mantenimiento de las células madre cancerosas de mama, y una mayor expresión de TMCC3 se correlaciona con un resultado clínico desfavorable en varios cánceres.

Encontramos una mayor expresión de TMCC3 en líneas celulares de cáncer de mama invasivas y BCSC que en líneas celulares de cáncer de mama menos invasivas y no BCSC, respectivamente. Además, la expresión de TMCC3 fue mayor en metástasis de ganglios linfáticos distantes que en xenoinjerto de tumores primarios de cáncer de mama humano en ratón. El silenciamiento de TMCC3 condujo a la detención de la fase G1 con un aumento de las células apoptóticas, junto con una disminución de la formación de mamosfera y la actividad ALDH, que son características importantes de las células madre cancerosas. En nuestra investigación previa, se vio que la vía IGF-1R/PI3K/Akt/mTOR era importante para la supervivencia y mantenimiento de las BCSC. Para explorar la posible participación de TMCC3 en esta vía, encontramos que la fosforilación de Akt se había perdido en las BCSC tras la inactivación de TMCC3. Estos hallazgos sugieren que TMCC3 es esencial para la supervivencia del cáncer de mama, la autorrenovación y la metástasis de las células del cáncer de mama. Por tanto, la inhibición de TMCC3 puede proporcionar una nueva estrategia terapéutica dirigida a las células madre.

TMCC3 podría servir como un biomarcador para el enriquecimiento de BCSC mediante clasificación FACS con anticuerpo anti-TMCC3. También puede servir como marcador para las células hES en proceso de diferenciación.

Los anticuerpos monoclonales generados contra TMCC3 pueden facilitar la caracterización fenotípica de las BCSC, el análisis molecular de TMCC3 y como agente dirigido a las CSC. Por tanto, TMCC3 proporciona una nueva estrategia terapéutica para dirigirse a las células madre cancerosas. Estos esfuerzos proporcionan una nueva perspectiva de la biología molecular del cáncer de mama y otros tipos de cáncer y CSC y facilitan el diseño de estrategias terapéuticas dirigidas a las células madre cancerosas.

De acuerdo con la presente divulgación, un anticuerpo contra la proteína con dominios de superhélice transmembrana 3 (TMCC3) o un fragmento de unión del mismo, puede comprender una secuencia CDRH1 seleccionada del SEQ ID NO: 20-143, una secuencia CDRH2 seleccionada del SEQ ID NO: 144-267, una secuencia CDRH3 seleccionada del SEQ ID NO: 268-391, una secuencia CDRL1 seleccionada del SEQ ID NO: 392-515, una secuencia CDRL2 seleccionada del SEQ ID NO: 516-639, y una secuencia CDRL3 seleccionada del SEQ ID NO: 640-763.

De acuerdo con algunas realizaciones, de la invención, un anticuerpo o fragmento de unión del mismo, de acuerdo con la reivindicación 1, es aquel en donde la secuencia CDRH1 es el SEQ ID NO: 102), la secuencia CDRH2 es el SEQ ID NO: 226), la secuencia CDRH3 es el SEQ ID NO: 350), la secuencia CDRL1 es el SEQ ID NO: 474), la

secuencia CDRL2 es el SEQ ID NO: 598), y la secuencia CDRL3 es el SEQ ID NO: 722.

Algunas divulgaciones se relacionan con métodos para tratar el cáncer. De acuerdo con algunas divulgaciones, un método para tratar el cáncer, que comprende: administrar a un sujeto que lo necesite el anticuerpo contra la proteína con dominios de superhélice transmembrana 3 (TMCC3), o un fragmento de unión del mismo, en donde el anticuerpo es cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente.

Algunas realizaciones de la invención se refieren a métodos para diagnosticar o evaluar una afección de cáncer. De acuerdo con realizaciones de la invención, un método para diagnosticar o evaluar una afección de cáncer, que comprende: evaluar un nivel de expresión o actividad de la proteína con dominios de superhélice transmembrana 3 (TMCC3) en una muestra que se ha obtenido de un sujeto, en donde un aumento en el nivel de expresión o actividad de TMCC3 en comparación con un patrón indica la presencia de células madre cancerosas en la muestra.

De acuerdo con los métodos descritos anteriormente, un método para diagnosticar o evaluar un cáncer usa el anticuerpo o el fragmento de unión del mismo, en donde el anticuerpo es cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente.

De acuerdo con cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, y hepatoma. De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el cáncer es cáncer de mama.

Algunas realizaciones de la invención se refieren a métodos para localizar u obtener imágenes de células madre cancerosas. Un método de acuerdo con las realizaciones de la invención usa un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo, en donde el anticuerpo es cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente y en donde el método no es un método de diagnóstico practicado en el cuerpo humano o animal.

### Breve descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente determinados aspectos de la presente divulgación, cuyas invenciones se pueden conocer mejor por referencia a uno o más de los dibujos en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas en el presente documento.

Las Figuras 1A-1D muestran una mayor expresión de TMCC3 en la línea celular de cáncer de mama invasiva, CSC de mama y células metastásicas. Figura 1: Expresión de la proteína TMCC3 en líneas celulares AS-B145, H184B, T47D, MDA-MB-231, SKBR3, MCF-7 y MDA-MB-157. Figura 1B: niveles de proteína TMCC3 en BCSC y no BCSC. Figura 1C: células TMCC3<sup>+</sup> en el tumor que crecieron en la almohadilla de grasa mamaria (Figura 1C-tumor primario) y 6,9 % en los ganglios linfáticos ipsilaterales que contienen células tumorales (Figura 1C-GL ipsilateral). Figura 1D, tinción IHC para TMCC3 en lesión pulmonar, ganglio linfático ipsilateral con tumor y tumor primario desarrollado en la almohadilla de grasa mamaria.

Las Figuras 2A-2C muestran una mayor expresión de TMCC3 en varios tejidos cancerosos y una alta expresión se correlaciona con un resultado clínico desfavorable. Figura 2A: el análisis de Kaplan-Meier revela que los pacientes con cáncer de mama con mayor expresión de TMCC3 tenían tasas de supervivencia más bajas (valor  $p < 0,05$ ). Figura 2B: nivel de ARNm de TMCC3 en parte del cáncer, en comparación con tejido normal en cáncer de cuello uterino, cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, glioblastoma, cáncer de piel, hepatoma y carcinoma papilar de la glándula tiroidea. Figura 2C: una mayor expresión de TMCC3 se correlaciona con un resultado desfavorable del paciente no solo en el cáncer de mama, sino también en el cáncer colorrectal, de pulmón y de ovario.

Las figuras 3A-3D muestran que TMCC3 contribuye a la formación de mamosferas y la población ALDH<sup>+</sup> en BCSC y podría ser un marcador para el enriquecimiento de la población de BCSC. Fig. 3A: niveles de proteína de TMCC3 en células formadoras de mamosferas y cultivo en monocapa (células adherentes) en MDA-MB-231 y AS-B145, respectivamente. Figura 3B: números de esferas en células transfectadas con ARNhc-TMCC3 y células transfectadas con ARNhc de control (valor  $p < 0,001$ ). Fig. 3C: Actividad ALDH en células de control y TMCC3 silenciada. Fig. 3D: número de mamosferas en células CD44<sup>+</sup> TMCC3<sup>+</sup> H2kd<sup>-</sup> y en células CD44<sup>+</sup> TMCC3<sup>-</sup> H2kd<sup>-</sup>.

Las Figuras 4A-4D muestran que TMCC3 es crucial para la señalización de Akt y ERK1/2 para regular la proliferación celular y la autorrenovación en BCSC. Figura 4A: el factor de cambio relativo de Akt<sup>ser473</sup> a Akt después de la transfección con ARNhc-TMCC3 en comparación con células transfectadas con ARNhc no diana. Figura 4B: el factor de cambio relativo de ERK1<sup>thr202</sup> a ERK1 y ERK2<sup>tyr204</sup> a ERK2 de células transfectadas con ARNhc no diana a las 48 y 72 horas después de la transfección con ARNhc-TMCC3. Figura 4C: el factor de cambio relativo de fosfor-Akt a Akt y fosfor-ERK1/2 en células transfectadas con TMCC3-A y TMCC3-C, respectivamente. Figura 4D: las tasas de crecimiento son mayores en las células transfectadas con TMCC3-A y TMCC3-C, en comparación con las células transfectadas con el vector de control. La Figura 4E muestra que las células transfectadas con TMCC3-A y TMCC3-C presentan una densidad celular más alta que la de las células transfectadas con el vector

de control.

Las Figuras 5A-5B muestran los resultados del ensayo de migración en transpocillos realizado en células AS-B634. La Figura 5A muestra que el número de células que han migrado disminuía en las células con TMCC3 silenciada, en comparación con el de la célula de control lentiviral no diana. La Figura 5B muestra los factores de cambio relativos de FAK<sup>tyr397</sup> fosforilada y los factores de cambio relativos de Src<sup>tyr416</sup> fosforilada.

Las Figuras 6A-6B muestran la expresión de TMCC3 en células madre embrionarias humanas (hESC o hES) y cuerpo embrioide (hEB). La Figura 6A muestra una mayor expresión de TMCC3 en un cuerpo embrioide humano (hEB) con crecimiento de 16 días que en células madre embrionarias humanas (hES). La Figura 6B muestra que las células TMCC3 positivo estaban distribuidas en la capa externa del hEB, mientras que las células indiferenciadas marcadas con Tra-1-60 están confinadas principalmente en la parte interior del hEB de crecimiento externo.

La Figura 7 muestra la probable estructura secundaria de TMCC3, que contiene un dominio extracelular que comprende dos regiones de hélice entre las cuales se encuentra una región de interhélice. Los dos dominios transmembrana y un dominio citoplasmático corto se encuentran cerca del extremo C-terminal de la molécula. También se muestran varios fragmentos de los dominios extracelulares de TMCC y el dominio interhélice. Estos fragmentos se construyen para la selección por afinidad (panning) de fagos y para ensayos de unión. Para facilitar la purificación y detección de estos fragmentos, estos fragmentos se etiquetan en su extremo C-terminal con un fragmento constante de inmunoglobulina y/o una etiqueta de histidina (por ejemplo, la etiqueta 10His). Debido a que estos fragmentos representan diferentes delecciones del dominio extracelular, también se pueden usar para cartografiar los epítomos de los anticuerpos de la invención, como se expone a continuación.

La Figura 8 muestra dos construcciones de vector ilustrativas para la producción de dos fragmentos TMCC3. Un vector es para la producción de un dominio extracelular de longitud completa (es decir, TMCC3<sub>ΔTM</sub>-Fc) y el otro es para la producción de un fragmento interhélice (es decir, TMCC3-interhélice-Fc).

La Figura 9 muestra un diagrama de flujo para usar en la presentación de fagos para el cribado de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos variables Fv) que se unen a TMCC3 o fragmentos de los mismos. Como se muestra en la Figura 9, por ejemplo, el proceso puede implicar la construcción de una biblioteca de ADNc a partir de ratones que han sido estimulados con el antígeno deseado (p. ej., TMCC3 o un fragmento del mismo). La biblioteca puede construirse para la producción de fragmentos Fab o fragmentos variables de cadena sencilla (scFv). La biblioteca de fagos que contiene clones potenciales de Fab o scFv se cultiva en bacterias y a continuación se libera con el virus auxiliar. A continuación, se permite que los fagos liberados se unan a los fragmentos de antígeno (por ejemplo, los fragmentos de TMCC que se muestran en la Figura 7). Pueden usarse perlas magnéticas o placas ELISA para aislar fagos que se unen a los fragmentos de antígeno. El proceso de cribado se puede repetir varias veces para enriquecer los clones de fagos positivos. Finalmente, después de la confirmación, la información de la secuencia de los clones de fagos positivos puede usarse para expresar el Fab o scFv.

La Figura 10 muestra los resultados de varios clones de fagos que se unen a un TMCC3 interhélice-fragmento Fc de una segunda ronda de selección por afinidad. También se muestran las uniones de estos clones a un péptido de control de fondo, VEGFR2-Fc (fragmento de receptor de VEGF tipo 2, mostrado como R2-Fc). Como se muestra en esta tabla, varios clones (por ejemplo, 3B-12) muestran una unión significativa al péptido de control de fondo, lo que podría deberse a las uniones a la porción Fc que es común en ambos fragmentos de proteína. Por tanto, estos clones no son candidatos para estudios posteriores.

La Figura 11 muestra los resultados de los ensayos de unión ELISA de varios anticuerpos quiméricos de longitud completa que contienen las regiones variables del cribado de fagos y las regiones constantes de una inmunoglobulina. Los ensayos de unión, que se realizaron utilizando TMCC3 interhélice-Fc-10His como diana de unión, revelaron que la mayoría de los anticuerpos quiméricos tienen buenas afinidades de unión (con constantes de disociación en el intervalo  $10^{-10}$  M), excepto el clon 3B-5. Por ejemplo, el clon 4-84 tiene una constante de disociación de  $1,13 \times 10^{-10}$  M (es decir, 0,113 nM), que sería suficiente para aplicaciones terapéuticas.

Las Figuras 12A y 12B muestran los resultados de la cinética de unión usando BIAcore. Las uniones se realizaron usando TMCC interhélice-Fc-10His para unirse con los clones 38-8 o 38-45. Las curvas cinéticas muestran uniones usando concentraciones de analito de 50 nM, 25 nM, 12,5 nM, 6,25 nM, y 3,125 nM. Los resultados de la Figura 12 A se realizaron con el aparato configurado para una respuesta máxima de 900 unidades de respuesta a pH 5,5, mientras que los que se muestran en la Figura 12B se realizaron con el aparato configurado para una respuesta máxima de 200 RU y pH 5,5. Basándose en las cinéticas de unión y disociación (tasas de aumento y disminución en las curvas después de la adición del analito o después del lavado), se pueden calcular las constantes cinéticas (tasas de asociación ( $k_a$ ) y tasas de disociación ( $k_d$ )) y la constante de equilibrio (es decir, la constante de unión,  $K_D$ ) se puede calcular usando cualquier programa de análisis cinético. Estos parámetros se muestran en las Figuras 12A y 12B.

La Figura 13 muestra un resumen de las constantes cinéticas y la constante de unión para varios clones basados

en los ensayos BIAcore (resonancia de plasmón superficial), similares a los mostrados en las Figuras 12A y 12B.

La Figura 14 muestra los resultados de la cartografía de epítomos de varios clones de anticuerpos de la invención. Tal como se ha indicado anteriormente, se construyeron varios fragmentos TMCC3 interhélice. Estos fragmentos representan delecciones en las diferentes ubicaciones del dominio interhélice. Por tanto, basándose en diferentes uniones a diferentes fragmentos TMCC3 interhélice, se puede deducir el epítipo particular que se une con un anticuerpo. Por ejemplo, en esta tabla, el clon 3B-22 se une bien al dominio interhélice completo (Tic1-128), el fragmento con los primeros 30 aminoácidos en el dominio interhélice (Tic1-30) y el fragmento que contiene los primeros 67 aminoácidos del dominio interhélice (Tic1-67). Basándose en este resultado, se puede concluir que el epítipo de unión para el clon 3B-22 está ubicado dentro de los primeros 30 aminoácidos en el dominio interhélice. Igualmente, los clones 3B-66 y 4-84 se unen bien a la longitud completa (Tic1-128) y Tic1-67, pero no a Tic1-30. Estos resultados indican que sus epítomos de unión están ubicados entre los aminoácidos 30 y 67.

La Figura 15 muestra las capacidades de varios anticuerpos para unirse a células que expresan TMCC3 (es decir, AS-B634 (p15)). Como se muestra, la mayoría de los clones se unen bien a las células, en particular los clones 4-84, 3B-22 y 3B-8.

La Figura 16 muestra las capacidades de varios anticuerpos para unirse a otra célula que expresa TMCC (MDA MB231). De nuevo, la mayoría de los clones se unen muy bien a esta la línea celular. En particular, los clones 4-84, 3B-22, 3B-45, 3B-8, 3B-5, y 3B-66 se unen muy bien a esta línea celular.

La Figura 17 muestra los resultados de la unión de un anticuerpo anti-TMCC3 conector en espiral (clon 3B-45) a células BSCS humanas de un paciente (BC0145), ensayado con clasificación de células activadas por fluorescencia. En los paneles superiores, las células se trataron con un anticuerpo de control negativo, iso-anticuerpo, y los paneles inferiores fueron células tratadas con anticuerpo anti-TMCC3 (3B-45). Como se muestra en el panel superior, las células contienen aproximadamente 57,8 % de células CD44+, mientras que el panel inferior muestra que hay un 41,9 % que son solo CD44+ y un 17,4 % que son tanto CD44+ como TMCC3+. Además, hay aproximadamente 8,4 % de las células que son CD44-, pero TMCC3+.

La Figura 18 muestra un gráfico de barras que resume las uniones de varios anticuerpos a tres líneas celulares de cáncer de mama diferentes (AS-B634, MDA MB231, y T47D). Como se muestra en este gráfico de barras, la unión de 3B-22 a AS-B634 es particularmente fuerte, al igual que la unión de 4-84 a T47D.

La Figura 19 muestra las uniones de varios anticuerpos a una línea celular de cáncer de próstata (PC3). Como se muestra en estos datos de FACS, las uniones de 3B-22 y 4-84 son muy fuertes, mientras que la mayoría de los anticuerpos se unen a esta línea celular de cáncer de próstata.

La Figura 20 muestra las uniones de varios anticuerpos a líneas celulares de cáncer de páncreas (AsPC1, MIA-Paca2 y PL45). Como se muestra, la mayoría de los anticuerpos tienen uniones significativas a estas líneas celulares de cáncer de páncreas, mientras que las uniones de 3B-22 son particularmente fuertes.

La Figura 21 muestra las uniones de varios anticuerpos a líneas celulares de hepatoma (HepG2, Hep3B, H22T/VGH y H59T/VGH). Como se muestra, las uniones de 3B-22 y 4-84 son muy fuertes, mientras que la mayoría de los anticuerpos se unen a la línea celular del hepatoma de ensayo.

La Figura 22 muestra las uniones de varios anticuerpos a líneas celulares de cáncer de pulmón (H460 y A549). Como se muestra, las uniones de 3B-22 y 4-84 son muy fuertes, mientras que la mayoría de los anticuerpos se unen a la línea celular del hepatoma de ensayo.

La Figura 23 muestra las uniones de varios anticuerpos a un xenoinjerto tumoral de cáncer de mama (BC0244). Como se muestra, en comparación con la IgG humana de control, la mayoría de los anticuerpos de la invención se unen fuertemente al xenoinjerto de cáncer de mama.

La Figura 24 muestra las uniones del anticuerpo 3B-45 a un xenoinjerto tumoral de cáncer de mama (BC0145), que muestra la capacidad del anticuerpo para unirse con células cancerosas similares a células madre (p. ej., células presentadoras de antígeno CD44+).

La Figura 25 muestra las uniones de los anticuerpos 3B-22, 3B-45 y 4-84 a un xenoinjerto tumoral de cáncer de páncreas (PC038), que muestra la capacidad de estos anticuerpos para unirse a subpoblaciones (presumiblemente células similares a células madre) de las células cancerosas.

La Figura 26 muestra las capacidades de los anticuerpos de la invención para inducir CDC (citotoxicidad dependiente del complemento) en la línea celular de cáncer de mama, MDA MB231. Como se muestra, el anticuerpo 4-84 es particularmente eficaz para inducir CDC, lo que da como resultado una lisis sustancial de las células diana.

La Figura 27 muestra las capacidades de los anticuerpos de la invención para inducir ADCC (citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos) en la línea celular de cáncer de mama, MDA MB231. Se usaron PBMC (células mononucleares de sangre periférica) humanas recién preparadas como células efectoras y MDA MB231 como células diana. La relación entre el efector y las células diana es 16,5 en este experimento. Los resultados mostrados son representativos de tres experimentos independientes (tres donantes sanos). Los resultados muestran que los anticuerpos 3B-22 y 4-84 son prometedores en la lisis de ADCC de las células cancerosas diana.

La Figura 28 muestra que los anticuerpos anti-TMCC3-dominio interhélice pueden enriquecer células cancerosas similares a células madre. En este experimento, se usó la línea celular de cáncer de mama BC0145. Como se muestra, el Ab anti-TMCC3 enriqueció significativamente la población de células cancerosas similares a células madre.

La Figura 29 muestra las secuencias de CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 y CDRL3 de varios anticuerpos. También se muestran sus sitios de unión en TMCC3, ya sea en la región interhélice o en la primera hélice.

**Descripción detallada**

Esta divulgación se refiere a métodos de diagnóstico y tratamientos del cáncer basados en TMCC3. La proteína con dominios de superhélice transmembrana 3 (TMCC3) pertenece a la familia TEX28 y se predice que es una proteína integral de membrana. La función de TMCC3 se desconoce. Nuestro análisis fosfoproteómico de células madre de cáncer de mama (BCSC) y no BCSC reveló que había más TMCC3 fosforilada en las BCSC que en las no BCSC. El gen TMCC3 humano está ubicado en el cromosoma 12 y la secuencia de aminoácidos de la proteína TMCC3 (SEQ ID NO: 1) se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1: La secuencia de aminoácidos de la proteína TMCC3 humana (SEQ ID NO: 1)**

10	20	30	40	50	60
MPGSDTALTV	DRTYSYPGRH	HRCKSRVERH	DMNTLSLPLN	IRRGSDTNL	NFDVDPGILD
70	80	90	100	110	120
FHKVKLTADS	LKQKILKVTE	QIKIEQTSRD	GNVAEYLKLV	NNADKQQAGR	IKQVFEKKNQ
130	140	150	160	170	180
KSAHSIAQLQ	KKLEQYHRKL	REIEQNGASR	SSKDISKDHL	KDIHRSLKDA	HVKSRTAPHC
190	200	210	220	230	240
MESSKSGMPG	VSLTPPVVVF	NKSREFANLI	RNKFGSADNI	AHLKNSLEEF	RPEASARAYG
250	260	270	280	290	300
GSATIVNPKP	YGSDDCCSSG	TSGSADSNNG	QSFAGGAST	LDSQGKLAVI	LEELREIKDT
310	320	330	340	350	360
QAQLAEDIEA	LKVQFKREYG	FISQTLQEER	YRYERLEDQL	HDLTDLHQHE	TANLKQELAS
370	380	390	400	410	420
IEEKVAYQAY	ERSRDIQEAL	ESCQTRISKL	ELHQEQQAL	QTDTVNAKVL	LGRCINVILA

430	440	450	460	470	
FMTVILVCVS	TIAKFVSPMM	KSRCHILGTF	FAVTLAIFC	KNWDHILCAI	ERMIIPR
(SEQ ID NO: 1)					

Ejemplos de secuencias inmunogénicas útiles dentro de TMCC3 incluyen pero sin limitación: VNKPKYGSDDCCSSGTSGSADSNNGQSFAGGASTLDSQGKLAVI (SEQ ID NO: 2).

La secuencia de nucleótidos del ADN c del gen TMCC3 (SEQ ID NO: 3) se muestra en la Tabla 2 a continuación:

**Tabla 2: La secuencia de ADNc de la proteína TMCC3 humana (SEQ ID NO: 3)**

gi|188497713|ref|NM\_020698.2|Homo sapiens familia de la proteína con dominio de superhélice transmembrana 3 (TMCC3), ADNc

AGCTGCAGCAGCCGCGCCGCCCCCTCGCCCGCGGCTCCCAGGGTGATCCCGAGCACAGCCGGTGGCTC  
GC  
GGCGCGGCAGCCCCAGAAGACGGGAAAGTTCGCGGCCGGAGCGCGGAGATGCCGGGCAGCGACACGGC  
GC  
TCACCGTGGACCGGACCTACTCGGACCCCGGCCGGCACCACCGCTGCAAGAGCCGGGTAGAACGTCAT  
GA  
CATGAATACCTTAAGCCTGCCCTGAACATACGCCGAGGGGGGTGAGACACCAACCTCAACTTTGATG  
TC  
CCGGATGGCATCCTGGACTTCCACAAGGTCAAACCTCACTGCAGACAGCCTGAAGCAAAAAATTCTAAA  
GG  
TAACAGAGCAGATAAAAAATTGAGCAAACATCGCGCGATGGGAATGTTGCGGAGTATCTGAAACTAGTG  
AA  
CAACGCAGACAAGCAGCAGGCCGGGACGTATCAAGCAAGTCTTTGAGAAGAAGAATCAGAAATCAGCTC  
AC  
TCCATCGCCAGCTGCAGAAGAAGTTAGAGCAGTATCATCGAAAGCTCAGAGAGATCGAGCAGAATGG  
AG  
CCTCTAGGAGCTCAAAGGACATTTCCAAAGACCACCTGAAGGATATACATCGCTCTTTGAAAGATGCC  
CA  
CGTGAAATCTCGAACTGCCCCCATTCATGGAGAGCAGCAAATCGGGCATGCCAGGGGTCTCACTTA  
CT  
CCACCTGTGTTCGTTTTCAATAAGTCCAGAGAGTTTGCCAACCTGATCCGGAATAAGTTTGGCAGCGC  
CG  
ACAACATTGCTCACTTGAAAAATTCCTTAGAGGAGTTTAGGCCAGAGGCGAGTGCCAGGGCCTACGGG  
GG  
CAGCGCTACCATCGTGAACAAACCCAAGTATGGCAGTGATGATGAATGTTTCGAGTGGCACGTGAGGCT  
CG  
GCCGACAGTAACGGAAACCAGTCGTTTGGGGCTGGTGGAGCCAGCACACTGGACAGCCAGGGCAAGCT  
CG  
CCGTGATCCTGGAGGAACTGAGGGAGATCAAGGATACCCAAGCTCAGCTGGCTGAGGACATCGAGGCA  
CT  
GAAGGTGCAGTTTAAGAGAGAATATGGTTTTATTTCTCAGACCCTGCAAGAGGAAAAGATACAGGTATG  
AG  
CGACTGGAGGACCAGCTGCATGACCTGACGGACCTGCATCAGCATGAGACAGCCAACCTGAAGCAGGA  
GC  
TGGCCAGCATTGAGGAGAAGGTGGCCTACCAGGCCTACGAGCGCTCGCGGGACATCCAGGAAGCCTTG  
GA  
ATCCTGCCAGACTCGCATTTCTAAGCTGGAGCTCCACCAGCAAGAGCAGCAAGCTCTGCAGACAGACA  
CC  
GTGAATGCTAAAGTTCTCCTGGGGAGGTGCATCAACGTGATCCTGGCCTTCATGACTGTCATCTTAGT  
GT  
GTGTGTCCACCATCGCGAAGTTCGTCTCACCCATGATGAAGAGTCGCTGCCACATTCTTGGCACCTTC  
TT  
TGCCGTGACTCTTCTTGCTATATTTTGTAAAACTGGGACCATATCCTGTGTGCCATAGAAAGGATGA  
TA  
ATACCAAGATGAAGCCACTGGTTCCTGCCTTCAAGTTCTTTCAAGTTTTTATTTTAAAGAAAACCTCTG  
TG

ES 2 818 948 T3

CATACTACCAAATTTTACAGTGAATGATTGTGCGGACTCGTGTGTAAGAAAACTAGGACTGTGTGGT  
GT  
AAATAACTACAATTCTCTTAACTCCGTAGCAGTTGCCAACTCAGTCCTTGTACTTCGTTAACACGAAT  
CT  
GTTTCAGAGCTCTCCTACCTTGCTCACTGCCTTAATCAGACCGATTTCCTGCCCACCTGACCAGCCCA  
GC  
GTGGTAAACCTCTGTATATTGAGACCTTGGCATAATTGGTGATCCTGAAGAAAGAGGTCTCTCTCCTA  
AG  
TCTCTGTCAGAATTGAGCTTCACAATTGCTAATGGTTGTTTTCTGTGAGTCCTATAAAAAGCAAGGAT  
AT  
GCATGATTCAGGGAATGAAGAATCACAGGCTTGGGCAGTGTTAAACACTGTGGCCTATGGTCCCCGTG  
TG  
ATCCACCCTGCTTCTCTCCAGGGGACCATAGGTCCCGTCATGTACTCAGTGTCCACAGCAGTCAGTCG  
TG  
TATGACCCTGTAACGTGGAAATCTTATCACACACCTGTTATCCAACAAGTCTACCTGAGGGGTTTTGT  
TA  
CACTTTAAATGGGAAGGCATAGGGATTTATGAATGGGGCTTTACCTTCTCATAACCAGGCAACCAAC  
AC  
CTGATTTTGTCTCAACTGGCTAGCAAATGCCAGCCTTCAGAGTGTGCAGGAATGTTTTCAAATCCCT  
CA  
TCAGACTGTGACTTTAACATTAATTTGGAATCCTGTGAGCACTACTCTGAAGGTTTGTGTTTTGGCAA  
AT  
CTTTTTCTTTTTTGAGACAGGGCTCTGCTAAATATTGCTCAGGCTGGTTGCAAACCTTGCTTCAA  
GG  
GATCCTCCACCTCAGCCTCCCAAGCAGCCGGGACTGCAGGCACAAGCCACCATGCCTGGCTGTTTTT  
TG  
GCAAATCTTGATTGTGATAAGCCCCCTGGAGGATATGATTCACTTTATGTGATTCATCTTATTCACA  
GG  
TCTGTGAGGGACTGCAAAGCTTACTCAGGAAATGAAAACAAATGATGGTCATGTTGCAGTTTTTCT  
TG  
AAGGACAACCGAACCATAGCCTCTAAAGTTCAAGTGCCTGAGGTGTCGGAACGCTGAAAGCATGAGG  
AA  
ACGAGGACGTAGGGTGTGACTGAATGGTGGCTAGATTAGTGGGAGCAGTTCACCTGGATGAAGATTGA  
GA  
GCATCGTCTTTGAGAAGTGAAAGACTAGCAAGAATAAAATAAATTAAGTCCAGTGTGTTGAGCCAAGGT  
TG  
CCACCTGTCTCTTAACATCTCACTGAACATAAGTCCTGAGGTATTAGGACGACCATACTGCCTCTGAG  
CT  
GAAAACATTCAAAGTTACATCCCTGTTTGGGGGATACCATTACCGCCTTCAGCCCAGATGATACT  
TT  
CCTTTAAATCTGTGTCTCTGTGTGTATAACAAAGAGGAAGATGGAAACAATGTTTCATGGAAACTGCTG  
TT  
GAGCCCCTTGTCACCACCTCCCGCCATCTGCTGCAGGCAGGAAGGCATGTGAGTGTACGTTTTCTTC  
CA  
GGAGACATCAGGTCCCCCTGGATTCAAATTAAGTGCAATATTTTGCAAACAGCTCTTCTTAGGGAAAT  
CT  
CCTGAAGGAAAAAATGTGACAGAATGTTCCATAGTCTGAGAGAATGGAATCGTTGAGCATTTAGTAC  
AA  
GTCCAGTGTGTGTGAGCGGGACTTAGGCAGCTCAAGCTTGCTTTTTTTTTTAAGCGTACAATTGAGTG  
GT  
TTTAGTAAATTCACAACTTGTTCACCATCACCCTATCTAATTCAGACTCACGCTTTTTTAAACA  
AT  
AAATGTCATTTTCATGAAATCTTTGGTGATAAAGTATTTTGGATTTCAGAGAAGAGCTCCCTTACCAGTC

ES 2 818 948 T3

CC  
ACCCTGATCTCATGGCTGTCTCTCCTTTTCATTGTCAGACTCCCCCTGGTCTACCGCGTTGATGTGTAT  
AC  
ACTGATCTTTCAAGTCTGGGAGACAGATAAGGAGGCCAGGTGCAAGGCAGGGAGGCAGAGAGAATGTT  
GT  
GCTTCCTTTAGCTTTTGTATTTTCGATGGCCAGCATTACCCTTTACCTGTGGGCATCAGACTCAGCGTG  
GG  
CTGAGTGCTGAGTGTAACCTTACACTCCTAAATCAAGCTGGGGCCTGGGTGGGCCCTCTTGGTATCTG  
TG  
AATCTTTCCAAGCACCCTTCGGACACACCAGGGATTGAGTGCTGCTGTTAGTTT TAGAGAAGGAGAGA  
TG  
TCTAACCTTGAGGTGAAGGGCTCTGGGAGGGTCCAAGAAGACGTAGGCTTCATTTTACACCAGCCC  
AC  
ACCATTCCAGTGCTCAGCCTAGCAAATGTGCTTTAATGCACACTTCTCAGACCTGTGATCCGTGTATC  
TT  
CTCCCCAGTGACAGAAGTAGAGAAGAGAATGGAAAGCAGCACACTCCGTCCCCTCTAGTCTGGAGCTG  
TT  
AACAGAATCTGCTAGAACTAGCTTTATTCTAACATACCGTAGGATCTAAATCCTCCTACCTGGATCA  
TG  
AATTCCTTTGAAATAATTCATATTTTTCATTGACTCTCACTAAATGTCAAATAACCTTGTTTTCACTTG  
GA  
TAGGCTCAACCTACCTGGCATATTTATTTTGCAGTCTTGTGAAAGTTCATGAAACTTTGTACTTTTT  
AA  
TAAGATGATACACTCGAAGGAACTTTTAATCTCTGCAGTTTATTCTCTCTTAAGGAATAAACACTCC  
CA  
CTGTTTGTCTCTTCAATGTGTAAGGAGATTAATGACATTTTAGAAATATTACAATTA AAAATAGTG  
AT  
GTAGCTGTAACATATGCTGGAATTGGATATTTAATTTATGTTTGTGTCAACTATAATCCTTTCCCAC  
CC  
CTTTTCAATTTATGGTAAACATCTTGGGCAAACCCAAAGATGGAAAGTGCTTGTGGGTGGGTAAGCACC  
AC  
CTGGTCTCTCAGCAAACACTCCTGAGTGGTTGAAGATGCTGGACATTGGATTCTAGCACTGGGTTTAT  
CT  
GGTGACATAGTCTCCTGTGGGTCTTGTAGTTGGTTATTTCAAGCTCAAACCTCTGAATATGATTAAACCA  
GA  
ACACCCACCCCAACTGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATGGAAATCCATAATGAAACAGCAAAAAAGT  
AC  
TCCGTTGCTGGGTTTGGACAATGAACATGGGATTAGTCCCAAGTTTGTAGCTTGGAACGGTAGCATT  
TT  
GCCTGCGTGATCCTTGTGCTAGCTATTCACAGAAGGAAATCTTCCGAAACTCCGTCTTTTCATTTAGCCG  
GT  
GAGGCTGTTATCCTTCTCTGTCAATTAGCATTGATGTTTTCGCTCTTCCAGCTCTGTCACTCTT  
GT  
TTTCATTTAAATATTGCCCACTCTGTGTTTATTGCCTTGCCATTTCTCTAGCATATCAGGTTTAATT  
AT  
GGGCTCAGTAATAATGAGGAACTAGCTTCCCTCAGGCAACTAATTACTTTTGTCTTTTTTGGTCCGAT  
TG  
TACCAAATTATTTTGCATTGAATGGGAATGTTTTTGCAGTGAATCCAGATATAGTTGTATTGGTTTGG  
AA

```

AAACATTTAAATATATTTATTTCATATGAACATGTGTGATTAAACAACCTATTTTACATATTTCTGTAA
TT
CTGAGGAGTGGGCTGGGGGTAGGAAGAAATGGCACCACTTAAAATTCAGGGCTTATATGAAGAGGTGT
TT
TAAGGTTAGCACATGCACAAAGGAACGAGTTGGTTTTAAAAAGATAAATCACTGCAAAGAATGAAATTG
GC
TTATTACATCAAACTAGATAAGATGCTAAAAAAAAAAGATATGAAACAGAACTAACCTATAGTTTC
CT
GAAATCAGTACAGTTTAAATTTATAAGAAGCTAGAAAAGTAATGCACCTTGATTGTTTTAGGAATGATTT
AT
GTGTTGCAATTTTAAATTTATTTAAAGCATGTCTACTGTGTTTGTCTAAGAGAAATATTTCAACAAAA
CG
TGCTCTGTGTTTAAAGATATGTTTAGGCAGTAGTTAGCAACTCTGAAAGTAGAACTGGAAATGTTTAT
TG
TGAGGCTTGTTCAGAAATTTCCATTTTGTGAGTTACTACTTAGTTTCATGTCAGCCTAAAATTGTAAA
TT
CCCTGTAGATCTTCACCCCATTTGTGGTGTCAATGAATCCAAAGCAGGTGCCATTATTTTTTTTAAA
TA
AACACTTGATGTTAGCTTTGGTGTAAATAAAGAGGTAGATTTCTTAAATTTTAAAA

```

(SEQ ID NO: 3)

- En la siguiente descripción, se hace referencia a los dibujos adjuntos que forman parte de la misma. En estos dibujos, se muestran realizaciones específicas como ilustración. Estas realizaciones se describen en detalle para permitir a los expertos en la materia poner en práctica la invención, y debe entenderse que se pueden utilizar otras realizaciones y que se pueden realizar cambios sin apartarse del alcance de la presente invención.
- Debe observarse que, como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una" y "el/la" incluyen las referencias en plural, salvo que el contexto indique claramente otra cosa.
- Por una cantidad "eficaz" o una cantidad "terapéuticamente eficaz" de un agente activo se entiende una cantidad no tóxica pero suficiente del agente para proporcionar un efecto beneficioso. La cantidad de agente activo que es "eficaz" variará de un sujeto a otro, dependiendo de la edad y el estado general del individuo, el agente o agentes activos particulares y similares.
- Como se usa en el presente documento, el término "antígeno" se define como cualquier sustancia capaz de provocar una respuesta inmunitaria. Como se usa en el presente documento, el término "inmunógeno" se refiere a un antígeno o una sustancia capaz de inducir la producción de un anticuerpo, tal como una vacuna de ADN. Como se usa en el presente documento, el término "inmunogenicidad" se refiere a la capacidad de un inmunógeno, antígeno o vacuna para estimular una respuesta inmunitaria.
- Como se usa en el presente documento, "región V" se refiere a un dominio de región variable de anticuerpo que comprende los segmentos de Marco 1, CDR1, Marco 2, CDR2, y Marco 3, incluyendo CDR3, y Marco 4, segmentos que se agregan al segmento V como una consecuencia del reordenamiento de los genes de la región V de la cadena pesada y la cadena ligera durante la diferenciación de los linfocitos B.
- Como se usa en el presente documento, "región determinante de complementariedad (CDR)" se refiere a las tres regiones hipervariables en cada cadena que interrumpen las cuatro regiones "marco" establecidas por las regiones variables de la cadena ligera y pesada. Las CDR son responsables principalmente de la unión a un epítipo de un antígeno. Las CDR de cada cadena se denominan normalmente CDR1, CDR2 y CDR3, numeradas secuencialmente a partir del extremo N, y también se identifican normalmente por la cadena en la que está ubicada la CDR particular. Por tanto, una  $V_H$  CDR3 (o CDRH3) es la CDR3 en el dominio variable de la cadena pesada, mientras que una  $V_L$  CDR1 (o CDRL1) es la CDR1 en el dominio variable de la cadena ligera.
- Las secuencias de aminoácidos de las CDR y las regiones marco pueden determinarse usando varias definiciones bien conocidas en la técnica, por ejemplo, Kabat, Chothia, base de datos internacional ImMunoGeneTics (IMGT), y AbM (véase, por ejemplo, Johnson *et al.*, supra; Chothia & Lesk, (1987) J. Mol. Biol. 196, 901-917; Chothia *et al.* (1989) Nature 342, 877-883; Chothia *et al.* (1992) J. Mol. Biol. 227, 799-817; Al-Lazikani *et al.*, J. Mol. Biol. 1997, 273(4)).
- Un "anticuerpo quimérico" es una molécula de anticuerpo en la que (a) la región constante, o una parte de la misma, se altera, reemplaza o intercambia de modo que el sitio de unión al antígeno (región variable, CDR, o una parte de la

misma) se une a una región constante de una clase diferente o alterada, función efectora y/o especie, o una molécula completamente diferente que confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico (p. ej., una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, fármaco, etc.); o (b) la región variable, o una parte de la misma, se altera, reemplaza o intercambia con una región variable que tiene una especificidad antigénica diferente o alterada (p. ej., CDR y/o regiones marco de diferentes especies).

El anticuerpo se une a un "epítopo" del antígeno. El epítopo es el sitio de interacción de unión del anticuerpo específico en el antígeno y puede incluir algunos aminoácidos o partes de algunos aminoácidos, por ejemplo, 5 o 6, o más, por ejemplo, 20 o más aminoácidos, o partes de esos aminoácidos. En algunos casos, el epítopo incluye componentes que no son proteínas, por ejemplo, de un hidrato de carbono, ácido nucleico o lípido. En algunos casos, el epítopo es un resto tridimensional.

Las composiciones farmacéuticas comprenden preferiblemente al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. En tales composiciones farmacéuticas, las composiciones divulgadas en el presente documento forman el "compuesto activo", también denominado el "agente activo". Como se usa en este documento, el término "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. También pueden incorporarse compuestos activos complementarios en las composiciones. Una composición farmacéutica se formula para que sea compatible con su vía de administración prevista. Los ejemplos de vías de administración incluyen la administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (p. ej., inhalación), transdérmica (tópica), transmucosa y rectal.

Sujeto como se usa en el presente documento se refiere a primates humanos y no humanos (p. ej., gorila, macaco, títí), animales domésticos (p. ej., oveja, vaca, caballo, burro, y cerdo), animales de compañía (p. ej., perro, gato), animales de laboratorio (p. ej., ratón, conejo, rata, cobaya, hámster), animales salvajes cautivos (p. ej., zorro, ciervo) y cualquier otro organismo que pueda beneficiarse de los agentes de la presente divulgación. Un "paciente con cáncer" puede referirse a un individuo que ha sido diagnosticado con cáncer, que actualmente está siguiendo un régimen terapéutico o tiene riesgo de recurrencia, por ejemplo, después de una cirugía para extirpar un tumor.

En el contexto del tratamiento contra el cáncer, un sujeto que necesita tratamiento puede referirse a un individuo que tiene cáncer o una afección precancerosa, ha tenido cáncer y está en riesgo de recurrencia, se sospecha que tiene cáncer, está en tratamiento convencional para el cáncer, tal como radioterapia o quimioterapia, etc.

El término "cáncer" se puede referir a carcinomas, sarcomas, adenocarcinomas, linfomas, leucemias, cánceres sólidos y linfoides, etc. Los ejemplos de diferentes tipos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, cáncer de pulmón (p. ej., cáncer de pulmón no microcítico o NSCLC), cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de hígado (es decir, hepatocarcinoma), cáncer renal (es decir, carcinoma de células renales), cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de tiroides, cáncer pleural, cáncer pancreático, cáncer de útero, cáncer de cuello uterino, cáncer testicular, cáncer de ano, cáncer pancreático, cáncer del conducto biliar, tumores carcinoides gastrointestinales, cáncer de esófago, cáncer de vesícula biliar, cáncer del apéndice, cáncer del intestino delgado, cáncer de estómago (gástrico), cáncer del sistema nervioso central, cáncer de piel, coriocarcinoma; cáncer de cabeza y cuello, cáncer de sangre, sarcoma osteogénico, fibrosarcoma, neuroblastoma, glioma, melanoma, linfoma de linfocitos B, linfoma no Hodgkin, linfoma de Burkitt, linfoma de células pequeñas, linfoma de células grandes, leucemia monocítica, leucemia mielógena, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda (AML), leucemia mielóide crónica (CML), y mieloma múltiple. En algunas realizaciones, las composiciones y métodos de la presente invención son útiles para tratar el cáncer.

Una célula madre cancerosa (CSC) es una célula que se encuentra en un tumor o en un cáncer de la sangre y que puede dar lugar a las células que constituyen la mayor parte del cáncer. Las CSC también pueden autorrenovarse, de forma similar a una célula madre normal (no cancerosa). Por tanto, las CSC pueden mediar en la metástasis al migrar a un tejido no tumoral en un individuo y comenzar un tumor "nuevo". Las CSC constituyen un porcentaje muy pequeño de cualquier cáncer dado, dependiendo de la etapa en la que se detecta el cáncer. Por ejemplo, se cree que la frecuencia promedio de CSC en una muestra de células de AML es de aproximadamente 1:10.000. Las CSC hematopoyéticas se pueden identificar como CD34+, de forma similar a las células madre hematopoyéticas normales (HSC). Otros marcadores asociados a CSC incluyen ALDH (mama), CD44 (mama), CD133 (cánceres gliales) y la vía Notch (p.ej., mielomas y neuroblastoma).

Como se define en el presente documento, una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto activo (es decir, una dosis eficaz) puede oscilar de aproximadamente 0,001 a 100 g/kg de peso corporal, u otros intervalos que serían evidentes y entendidos por los expertos sin excesiva experimentación. El experto en la materia apreciará que ciertos factores pueden influir en la dosis y el tiempo requeridos para tratar eficazmente a un sujeto, incluyendo, pero sin limitación, la gravedad de la enfermedad o trastorno, los tratamientos anteriores, la salud general o la edad del sujeto y otras enfermedades presentes.

Como se usa en el presente documento, la expresión "se une específicamente", se refiere a la interacción entre pares de unión (p. ej., un anticuerpo y un antígeno). En varios casos, se une específicamente puede expresarse mediante una constante de afinidad de aproximadamente  $10^{-6}$  moles/litro, aproximadamente  $10^{-7}$  moles/litro, o aproximadamente

10<sup>-8</sup> moles/litro, o menos.

### **Expresión diferencial de TMCC3 entre varias líneas celulares de cáncer de mama**

- 5 Para estudiar el papel de TMCC3 en el cáncer de mama, se determinaron los niveles de proteína de TMCC3 en varias líneas celulares de cáncer de mama humano, células MCF-7, SKBR3, T47D, MDA-MB-157, MDA-MB-231 y AS-B145. La cantidad de proteína se normalizó a H184B, una línea celular epitelial mamaria humana y se expresó como el factor de cambio relativo.
- 10 Como se muestra en la Figura 1A, la expresión más alta de la proteína TMCC3 fue en la línea celular AS-B145 con un factor de 3,9 respecto a H184B. Esta fue seguida de las células T47D y MDA-MB-231, con un factor de cambio relativo de 1,5 y 1,8, respectivamente. Los niveles más bajos de TMCC3 se observaron en las líneas celulares de cáncer de mama menos agresivas, SKBR3, MCF-7 y MDA-MB-157 con factores de cambio relativos de 1,1, 1,1 y 1.0, respectivamente. Por tanto, líneas celulares más invasivas tales como MDA-MB-231 y AS-B145, albergan una mayor expresión de TMCC3 a nivel de proteínas que las líneas celulares de cáncer de mama menos invasivas.
- 15

### **Las BCSC expresan niveles más altos de proteína TMCC3 que las no BCSC**

- 20 A continuación, determinamos los niveles de proteína TMCC3 en BCSC. Se seleccionaron las células CD24<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>H2k<sup>d-</sup> (BCSC) y CD24<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>H2k<sup>d-</sup> (no BCSC) de un xenoinjerto de tumor BC0145 en ratón y las células con actividad aldehído deshidrogenasa (ALDH) alta (BCSC) y actividad ALDH baja (no BCSC) de tumores BC0244 y BC0634. Como se muestra en la Figura 1B, el nivel de proteína de TMCC3 era mayor en BCSC que en no BCSC en un factor de 26,4, 21,0 y 8,9, para tumores BC0145, BC0244 y BC0634, respectivamente. Esto coincide con niveles más altos de ARNm de TMCC3 en BCSC que en no BCSC en nuestro análisis de micromatrices de xenoinjerto de tumor BC0145. Estos hallazgos sugieren que TMCC3 puede contribuir no solo a la invasión tumoral, sino también al mantenimiento de las células madre del cáncer de mama.
- 25

### **La mayor expresión de TMCC3 en cáncer de mama y otros cánceres se correlaciona con un pronóstico desfavorable**

- 30 Nuestros datos preliminares mostraron una mayor expresión de TMCC3 en líneas celulares de cáncer de mama invasivo y BCSC. Para abordar la relevancia clínica de nuestro hallazgo, utilizamos una base de datos de micromatrices para evaluar la correlación de la expresión de TMCC3 y el resultado clínico del paciente con cáncer de mama. En esta base de datos de micromatrices, los autores clasificaron una serie de 295 pacientes con carcinomas de mama primarios con una firma de expresión génica asociada con un pronóstico desfavorable o un buen pronóstico (van de Vijver, *et al.*, "A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer". *N Engl J Med*, 347: 1999-2009, 2002). Como se muestra en la Figura 2A, el análisis de Kaplan-Meier reveló que los pacientes con cáncer de mama con mayor expresión de TMCC3 tenían una tasa de supervivencia más baja (valor p = 0,045).
- 35
- 40 Además, utilizamos una base de datos de micromatrices de ADN en línea, que está disponible en el sitio web de ONCOMINE, para predecir el papel oncogénico de TMCC3 en varios cánceres. Como se muestra en la Figura 2B, se encontraron niveles más altos de ARNm de TMCC3 en la parte del cáncer que en el tejido normal en cáncer de cuello uterino, cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, glioblastoma, cáncer de piel, hepatoma y carcinoma papilar de la glándula tiroidea. También utilizamos el sitio web PrognoScan para predecir la participación de TMCC3 en la progresión del cáncer, y el resultado previsto muestra que la mayor expresión de TMCC3 se correlaciona con un resultado del paciente desfavorable no solo en el cáncer de mama, sino también en el cáncer colorrectal, cáncer de pulmón y de ovario (Figura 2C). Estos hallazgos sugieren que TMCC3 puede jugar un papel crucial en la progresión del cáncer.
- 45

### **Las células de cáncer metastásicas expresan niveles más altos de TMCC3 que el tumor primario**

- 50 Para delinear el papel de TMCC3 en la metástasis del cáncer de mama, examinamos adicionalmente la expresión de TMCC3 en lesiones metastásicas de cáncer de mama en xenoinjerto de cáncer de mama primario humano en ratón. Dos meses después de la inyección del tumor BC0145 o BC0179 en la almohadilla de grasa mamaria de ratones NSG, se observaron lesiones metastásicas en los ganglios linfáticos ipsilaterales. Los ganglios linfáticos y el tejido de la parte del tumor primario en ratones portadores de BC0145 se recolectaron para tinción con anticuerpos anti-CD44 y anti-TMCC3. Como se muestra en la Figura 1C, existe 20,0 % de células CD44<sup>+</sup>, TMCC3<sup>+</sup> en el tumor que se desarrollaron en la almohadilla de grasa mamaria (Figura 1C-tumor primario) y 28,1 % en los ganglios linfáticos ipsilaterales que contienen células tumorales (Figura 1C-GN ipsilateral). En ratones portadores del xenoinjerto BC0179, se observaron metástasis en el pulmón y en los ganglios linfáticos. Como se muestra en la Figura 1D, la tinción IHC para TMCC3 fue la más fuerte en la lesión pulmonar, seguido de los ganglios linfáticos ipsilaterales, y a continuación, el desarrollo del tumor primario en la almohadilla de grasa mamaria. Estos hallazgos sugieren que TMCC3 puede contribuir a la invasividad y metástasis de las células.
- 55
- 60

### **TMCC3 contribuye a la formación de mamosferas y a la actividad ALDH en BCSC.**

65

La formación de mamosferas y una alta actividad de ALDH son características de las BCSC. Encontramos que el nivel de proteína de TMCC3 en las células formadoras de mamosfera era más alto que el de los cultivos de monocapa (células adherentes) en 1,6 y 4,4 veces en MDA-MB-231 y AS-B145, respectivamente (Figura 3A). Además, examinamos el número de formación de esferas en cada 1000 líneas celulares BCSC transfectadas con TMCC3 silenciada (hc-T3) o ARNhc de control (hc-Con), AS-B145 y AS-B634. Como se muestra en la Figura 3B, el número de esferas fue menor en las células transfectadas con ARNhc-TMCC3 que en las células de control transfectadas con ARNhc (*valor p* < 0,001). También determinamos la actividad ALDH en células con TMCC3 silenciada y de control y encontramos que la proporción de células ALDH<sup>+</sup> disminuyó del 21,2 % en las células de control al 16,6 % en las células con TMCC3 inactivada (Figura 3C). Estas observaciones indican que TMCC3 juega un papel importante en el mantenimiento de las propiedades de las BCSC.

#### Enriquecimiento de la población BCSC por selección de células TMCC3<sup>+</sup>

Para probar la posibilidad de usar TMCC3 como un marcador para el enriquecimiento de la población BCSC, se seleccionaron poblaciones de células CD44<sup>+</sup> TMCC3<sup>+</sup> H2kd<sup>-</sup> y CD44<sup>+</sup>TMCC3<sup>-</sup> H2kd<sup>-</sup> de un xenoinjerto de tumor BC0145 usando la selección por FACS con anticuerpo anti-TMCC3, y después se examinó su capacidad de autorrenovación mediante un ensayo de formación de mamosferas. El resultado muestra que las células CD44<sup>+</sup>TMCC3<sup>+</sup>H2kd<sup>-</sup> tienen una capacidad significativamente mayor de formación de mamosferas, que las células CD44<sup>+</sup>TMCC3<sup>-</sup>H2kd<sup>-</sup>. No solo el tamaño, sino los números de mamosferas son mayores en células CD44<sup>+</sup> TMCC3<sup>+</sup> H2kd<sup>-</sup> que en las células CD44<sup>+</sup> TMCC3<sup>-</sup> H2kd<sup>-</sup> (Figura 3D). Este resultado indica que TMCC3 puede servir como un nuevo biomarcador para el enriquecimiento de BCSC y una diana terapéutica para el diseño de fármacos en el futuro.

#### TMCC3 es crucial para la señalización de Akt y ERK1/2 para regular la proliferación celular y la autorrenovación en BCSC

Existe una creciente evidencia que muestra que la activación de las vías de señalización PI3K/Akt/mTOR y MEK/ERK son importantes para la supervivencia y la autorrenovación de las células madre cancerosas. Recientemente, hemos demostrado que la vía IGF-1R/PI3K/Akt/mTOR es importante para el mantenimiento de BCSC. Anteriormente, descubrimos que TMCC3 fosforilada (serina 216) era mayor en las BCSC. Para determinar el posible vínculo de TMCC3 con la señalización de Akt/mTOR, examinamos la fosforilación de Akt y mTOR en AS-B145 con TMCC3 silenciada. Como se muestra en la Figura 4A, el factor de cambio relativo de Akt<sup>ser473</sup> a Akt se redujo hasta 0,2 y 0,1 veces a las 48 y 72 h después de la transfección de ARNhc-TMCC3 en comparación con las células transfectadas con ARNhc no diana. La fosforilación de mTOR también se redujo en las células con TMCC3 inactivada. Los factores de cambio relativos de mTOR fosforilada fueron 0,8 y 0,7 a las 48 y 72 horas después de la transfección, respectivamente. Estos resultados muestran que TMCC3 es importante para la activación de Akt y también contribuye a la activación de mTOR. Además, examinamos la fosforilación de ERK1/2 en AS-B145 con TMCC3 silenciada. Como se muestra en la Figura 4B, el factor de cambio relativo de ERK1<sup>thr202</sup> a ERK1 se redujo hasta 0,3 y 0,25 y ERK2<sup>tyr204</sup> a ERK2 se redujo 0,5 y 0,9 veces respecto a las células transfectadas con ARNhc no diana a las 48 y 72 horas después de la transfección con ARNhc-TMCC3. Estos resultados muestran que TMCC3 podría ser el regulador aguas arriba de la vía Akt/mTOR y ERK1/2 y desempeñar un papel fundamental en la proliferación y el mantenimiento de las BCSC.

Además, se establecieron clones de células 293T que sobreexpresan TMCC3 (TMCC3-A y TMCC3-C) y se usó un vector vacío CD511B-1, portador de GFP) como control. La Figura 4E muestra que las células transfectadas con TMCC3-A y TMCC3-C presentan una densidad celular más alta que las células transfectadas con vector de control. Para cuantificar el efecto de la sobreexpresión de TMCC3, determinamos la proliferación celular con azul alamar, que es un indicador redox que produce un cambio colorimétrico y una señal fluorescente en respuesta a una actividad metabólica. Como se muestra en la Figura 4D, la tasa de crecimiento es mayor en las células transfectadas con TMCC3-A y TMCC3-C, en comparación con las células transfectadas con vector de control. Además, las células transfectadas se recolectaron para análisis de transferencia Western a las 48 h después de la transfección. Como se muestra en la Figura 4C, el factor de cambio relativo de fosfor-Akt a Akt aumentó hasta 4,7 y 1,8 en células transfectadas con TMCC3-A y TMCC3-C, respectivamente, y fosfor-ERK1/2 aumentó hasta 1,8/1,8 y 3,5/2,2, respectivamente. Estos hallazgos apoyan aún más el papel crucial de TMCC3 en la proliferación celular a través de la activación de la señalización de Akt y ERK1/2.

#### TMCC3 contribuye a la migración celular y la metástasis a través de la vía FAK/Src

En nuestro estudio, encontramos una mayor expresión de TMCC3 en las células cancerosas metastásicas a los ganglios linfáticos y los pulmones que el tumor primario desarrollado en la almohadilla de grasa mamaria (Figura 1C-1D). Para descifrar las funciones de TMCC3 en la migración e invasión celular, se realizó un ensayo de migración en transpocillos en células AS-B634. Como se muestra en la Figura 5A, el número de células que han migrado disminuía en las células con TMCC3 silenciada, en comparación con las células de control lentivirales no diana.

Se ha descrito que la transición epitelio-mesénquima (EMT) es importante para la metástasis de la célula iniciadora del tumor. Sin embargo, no encontramos diferencias en la expresión de marcadores EMT, incluyendo E-cadherina, N-cadherina y vimentina tras el silenciamiento de TMCC3 (datos no mostrados). FAK es una tirosina quinasa citoplasmática identificada como un mediador clave de la señalización intracelular desencadenada por integrinas para

regular la supervivencia, migración e invasión celular. Estudios previos han demostrado que la integrina beta5 contribuye a la tumorigenicidad a través de la vía de señalización Src-FAK en el cáncer de mama, y la ablación de FAK redujo el conjunto de células madre/progenitoras del cáncer en los tumores primarios de ratones dirigidos a FAK y afectó a su autorrenovación y migración. Por tanto, examinamos si la migración celular dependiente de TMCC3 se correlaciona con la fosforilación de FAK/Src. De hecho, encontramos que la fosforilación de FAK disminuyó en las BCSC con TMCC3 silenciada. Los factores de cambio relativos de FAK<sup>Tyr397</sup> fosforilada fueron 0,5, 0,6 y 0,2 en tres clones de ARNhc-TMCC3 diferentes (Figura 5B). La fosforilación de Src también disminuyó en células con TMCC3 inactivada. Los factores de cambio relativos de Src<sup>Tyr416</sup> fueron 0,7, 0,6 y 0,7, respectivamente (Figura 5B). Estos resultados indican que la migración celular dependiente de TMCC3 está estrechamente asociada con la vía de señalización FAK/Src en BCSC.

Las secuencias de los tres clones ARNhc-TMCC3 son las siguientes:

**Tabla 3: Secuencias de TMCC3-ARNhc**

Id. del clon	Secuencia diana	Gen diana
TRCN0000179802	CCGGCGACAACATTGCTCACTTGAAGCTCGAGTTCAA GTGAGCAATGTTGTCGTTTTTTG (SEQ ID NO: 4)	TMCC3
TRCN0000183750	CCGGCGTCATGACATGAATACCTTACTCGAGTAAGG TATTCATGTCATGACGTTTTTTG (SEQ ID NO: 5)	TMCC3
TRCN0000180412	CCGGGATGGGAATGTTGCGGAGTATCTCGAGATACT CCGCAACATTCCCATCTTTTTTG (SEQ ID NO: 6)	TMCC3

### El hEB expresa niveles más altos de proteína TMCC3 que las hESC

También se determinó la expresión de TMCC3 en células madre embrionarias humanas (hESC) y cuerpo embrioide (hEB). Encontramos una mayor expresión de TMCC3 en el crecimiento de 16 días del hEB respecto a las hESC (Figura 6A). Este fenómeno se observó en cuerpos embrionarios derivados de Hes5 y H9. Adicionalmente, las células TMCC3 positivo estaban distribuidas en la capa externa del hEB, pero las células indiferenciadas marcadas con Tra-1-60 se limitan principalmente a la parte interna del crecimiento externo del hEB, como se muestra en la Figura 6B, y no hubo colocalización. entre TMCC3 y Tra-1-60 en el hEB. Esto sugiere que TMCC3 puede marcar células más diferenciadas dentro del hEB.

### Trastornos asociados a TMCC3

Los trastornos asociados a TMCC3 incluyen cánceres asociados con una expresión elevada de TMCC3, como se describe a continuación. Los anticuerpos de la invención se pueden usar para el diagnóstico y seguimiento de estos trastornos, así como para la terapia dirigida, por ejemplo, en el caso de administrar un agente quimioterapéutico (o citotóxico) específicamente a una célula cancerosa que expresa TMCC3. En algunos casos, la terapia dirigida puede comprender poner en contacto una célula que expresa TMCC3 con un anticuerpo, como se describe en el presente documento.

TMCC3 está asociada con células cancerosas y células madre cancerosas, y la unión de TMCC3 (p. ej., con un anticuerpo específico de TMCC3 o un anticuerpo específico de TMCC3 unido a un agente citotóxico) puede inhibir eficazmente el crecimiento de células cancerosas. Los presentes anticuerpos específicos de TMCC3 también se pueden usar para el diagnóstico o localización de un cáncer que expresa TMCC3, seguido opcionalmente de terapia dirigida usando un anticuerpo específico de TMCC3 (p. ej., el mismo anticuerpo o un anticuerpo específico de TMCC3 diferente con diferentes características de unión).

Los resultados descritos en el presente documento proporcionan la primera demostración de que TMCC3 se expresa en líneas celulares de cáncer de mama invasivas y BCSC y en otras líneas celulares de cáncer. Los anticuerpos específicos de TMCC3 pueden usarse para dirigirse a células de cáncer de mama (p. ej., para aplicaciones de diagnóstico y/o terapéuticas) así como a los otros cánceres asociados con la expresión de TMCC3. Se observó una expresión de TMCC3 superior a la normal en cáncer de cuello uterino, cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, glioblastoma, cáncer de piel, hepatoma y carcinoma papilar de la glándula tiroidea. Una mayor expresión de TMCC3 también se correlaciona con un resultado del paciente desfavorable no solo en el cáncer de mama, sino también en el cáncer colorrectal, de pulmón y de ovario.

**Anticuerpos anti-TMCC3**

Para la preparación de los anticuerpos adecuados de la invención, y para el uso de acuerdo con la invención, por ejemplo, anticuerpos recombinantes, monoclonales o policlonales, se pueden usar muchas técnicas conocidas en la materia (véase, por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975); Kozbor *et al.*, *Immunology Today* 4: 72 (1983); Cole *et al.*, pp. 77-96 en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc. (1985); Coligan, *Current Protocols in Immunology* (1991); Harlow y Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (1988); y Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2ª ed. 1986)).

Los genes que codifican las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo de interés se pueden clonar a partir de una célula, por ejemplo, los genes que codifican un anticuerpo monoclonal se pueden clonar a partir de un hibridoma y utilizarse para producir un anticuerpo monoclonal recombinante. Las bibliotecas de genes que codifican las cadenas ligera y pesada de anticuerpos monoclonales también se pueden fabricar a partir de hibridomas o células plasmáticas. Las combinaciones aleatorias de productos génicos de cadena pesada y ligera generan una gran combinación de anticuerpos con diferentes especificidades antigénicas (véase, por ejemplo, Kuby, *Immunology* (3.sup.rd ed. 1997)).

Las técnicas para la producción de anticuerpos monocatenarios o anticuerpos recombinantes (patente de EE. UU. N.º 4.946.778, patente de EE. UU. N.º 4.816.567) se pueden adaptar para producir anticuerpos dirigidos contra los polipéptidos de la presente invención. Asimismo, ratones transgénicos, u otros organismos como otros mamíferos, se pueden usar para expresar anticuerpos humanizados o humanos (véanse, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. N.º 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016, Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10:779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature* 368:856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368:812-13 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnology* 14:845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14:826 (1996); y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995)).

Alternativamente, se puede usar tecnología de expresión en fago para identificar anticuerpos y fragmentos Fab heteroméricos que se unen específicamente a antígenos seleccionados (véase, por ejemplo, McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-554 (1990); Marks *et al.*, *Biotechnology* 10:779-783 (1992)). Los anticuerpos también se pueden convertir en biespecíficos, es decir, capaces de reconocer dos antígenos diferentes (véase, por ejemplo, el documento WO 93/08829, Traunecker *et al.*, *EMBO J.* 10:3655-3659 (1991); y Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology* 121:210 (1986)). Los anticuerpos también pueden ser heteroconjugados, por ejemplo, dos anticuerpos unidos covalentemente, o inmunotoxinas (véanse, por ejemplo, la patente de EE. UU. N.º 4.676.980, el documento WO 91/00360; el documento WO 92/200373; y el documento EP 03089).

Los anticuerpos se pueden producir usando cualquier número de sistemas de expresión, incluyendo sistemas de expresión procariotas y eucariotas. En algunas realizaciones, el sistema de expresión es una expresión en células de mamífero, tal como un hibridoma, o un sistema de expresión en células CHO. Muchos de estos sistemas están comercializados. En realizaciones en las cuales un anticuerpo comprende una región V<sub>H</sub> y una región V<sub>L</sub>, las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> se pueden expresar usando un único vector, por ejemplo, en una unidad de expresión dicistrónica, o bajo el control de diferentes promotores. En otras realizaciones, las regiones V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> se pueden expresar usando vectores independientes. Una región V<sub>H</sub> o V<sub>L</sub> como se describe en el presente documento puede comprender opcionalmente una metionina en el extremo N-terminal.

Un anticuerpo de la invención también se puede producir en varios formatos, incluyendo un Fab, un Fab', un F(ab')<sub>2</sub>, un scFv, o un dAb. Los fragmentos de anticuerpos se pueden obtener mediante varios métodos, incluyendo, la digestión de un anticuerpo intacto con una enzima, tal como pepsina (para generar fragmentos (Fab')<sub>2</sub>) o papaína (para generar fragmentos Fab); o síntesis de novo. Los fragmentos de anticuerpos también se pueden sintetizar usando la metodología de ADN recombinante. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-TMCC3 comprende fragmentos F(ab')<sub>2</sub> que se unen específicamente a TMCC3. Un anticuerpo de la invención también puede incluir una región constante humana, por ejemplo, anticuerpos humanizados o humanos. Véanse, por ejemplo, *Fundamental Immunology* (Paul ed., 4d ed. 1999); Bird, *et al.*, *Science* 242:423 (1988); y Huston, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879 (1988).

Los métodos para humanizar o primatizar anticuerpos no humanos son también bien conocidos en la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en este a partir de una fuente que no es humana. Estos restos de aminoácidos no humanos se citan a menudo como restos importados, que se toman normalmente de un dominio variable donante. La humanización puede llevarse a cabo esencialmente siguiendo los métodos de Winter y colaboradores (véanse, por ejemplo, Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science* 239:1534-1536 (1988) y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992)), sustituyendo las CDR o las secuencias de CDR de roedores por las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. Dichos anticuerpos humanizados son anticuerpos quiméricos (Patente de EE. UU. N.º 4.816.567) en donde sustancialmente menos que un dominio variable humano intacto ha sido sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son normalmente anticuerpos humanos en los que algunos restos de la CDR y posiblemente algunos restos de la FR están sustituidos por restos procedentes de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

En algunos casos, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede conjugarse con otra molécula, por ejemplo, polietilenglicol (PEGilación) o albúmina sérica, para proporcionar una semivida prolongada *in vivo*. Ejemplos de PEGilación de fragmentos de anticuerpo se proporcionan en Knight *et al.* Platelets 15:409, 2004 (para abciximab); Pedley *et al.*, Br. J. Cancer 70:1126, 1994 (para un anticuerpo anti-CEA); Chapman *et al.*, Nature Biotech. 17:780, 1999; y Humphreys, *et al.*, Protein Eng. Des. 20: 227, 2007). El anticuerpo o fragmento de anticuerpo también se puede marcar o conjugar con un agente terapéutico como se describe a continuación.

### Aplicaciones diagnósticas

Los anticuerpos específicos de TMCC3 se pueden usar por lo tanto para los ensayos de diagnóstico *in vitro* e *in vivo* para detectar las células que expresan TMCC3 (p. ej., BCSC, ciertas células tumorales sólidas y células cancerosas hematopoyéticas como se indica en el presente documento). Por ejemplo, puede obtenerse una muestra (p. ej., muestra de sangre o biopsia de tejido) de un paciente y ponerse en contacto con un anticuerpo contra TMCC3, y la presencia de una célula que expresa TMCC3 en la muestra del paciente puede determinarse detectando la unión del anticuerpo. La unión del anticuerpo se puede detectar directamente (p. ej., cuando el propio anticuerpo está marcado) o mediante el uso de un segundo agente de detección, tal como un anticuerpo secundario. El marcador detectable se puede asociar con un anticuerpo de la invención, ya sea directa o indirectamente, por ejemplo, mediante un quelante o enlazador.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-TMCC3 se pone en contacto con una muestra biológica de un individuo que tiene o se sospecha que tiene un trastorno asociado a TMCC3, y se determina la unión del anticuerpo a una célula en la muestra, en donde la unión del anticuerpo mayor o menor de lo normal indica que el individuo tiene un trastorno asociado a TMCC3. En algunas realizaciones, la muestra biológica es una muestra de sangre o fracción de sangre (p. ej., suero, plasma, plaquetas, glóbulos rojos, glóbulos blancos). En algunas realizaciones, la muestra biológica es una muestra de tejido (biopsia), por ejemplo, de un sitio sospechoso de tumor, o de un tejido que se sabe que está afectado, por ejemplo, para determinar los límites de un tumor conocido. En algunas realizaciones, la muestra biológica se obtiene de un sitio de inflamación.

Las biopsias se realizan normalmente para obtener muestras de tejidos, es decir, tipos de células que no están en un fluido. La técnica de biopsia aplicada dependerá del tipo de tejido a evaluar (p. ej., mama, piel, colon, próstata, riñón, pulmón, vejiga, ganglio linfático, hígado, médula ósea, vías respiratorias o pulmón). En el caso de un cáncer, la técnica también dependerá del tamaño y tipo de tumor (p. ej., sólido, suspendido, o sangre), entre otros factores. Se discuten las técnicas de biopsia, por ejemplo, en Harrison's Principles of Internal Medicine, Kasper, *et al.*, eds., 16a ed., 2005, Capítulo 70, y a lo largo de la Parte V.

Cualquier método de detección de la unión de un anticuerpo a una célula en una muestra puede usarse para los presentes ensayos de diagnóstico. Los métodos para detectar la unión de un anticuerpo son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, citometría de flujo, microscopía de fluorescencia, ELISA, etc. En algunas realizaciones, el método comprende preparar la muestra biológica para la detección antes de la etapa de determinación. Por ejemplo, una subpoblación de células (p. ej., glóbulos blancos) se puede separar del resto de la muestra del individuo (p. ej., otros componentes sanguíneos) o se pueden suspender las células de un tejido para una detección más fácil.

En algunas realizaciones, el porcentaje de células que expresan TMCC3 en la muestra se determina y se compara con un control, por ejemplo, una muestra de un individuo o grupo de individuos que se sabe que tienen un trastorno asociado a TMCC3 (control positivo) o de un individuo o grupo de individuos que se sabe que no tienen un trastorno asociado a TMCC3 (normal, sin enfermedad o control negativo). En algunas realizaciones, el control es un intervalo estándar de expresión de TMCC3 establecido para un tejido dado. Un porcentaje mayor o menor de lo normal de células que expresan TMCC3, o un nivel de expresión mayor o menor, indica que el individuo tiene un trastorno asociado a TMCC3.

En algunas realizaciones, los anticuerpos específicos de TMCC3 marcados como se describen en el presente documento pueden asociarse adicionalmente con un compuesto terapéutico, por ejemplo, para formar una composición "teranóstica". Por ejemplo, un anticuerpo anti-TMCC3 descrito en el presente documento puede unirse (directa o indirectamente) tanto a un marcador detectable como a un agente terapéutico, por ejemplo, un agente citotóxico para destruir células cancerosas o CSC que expresan TMCC3. En algunas realizaciones, se usa un anticuerpo específico de TMCC3 marcado para el diagnóstico y/o localización de una célula cancerosa que expresa TMCC3, y a continuación se dirige a la célula cancerosa que expresa TMCC3 con un anticuerpo específico de TMCC3 terapéutico separado.

### Aplicaciones terapéuticas

TMCC3 se expresa de manera aberrante en células cancerosas y células madre cancerosas, y las células que expresan TMCC3 en tales condiciones se pueden dirigir utilizando anticuerpos específicos de TMCC3.

Alternativamente, la unión de TMCC3 se puede utilizar para seleccionar productos farmacéuticos o biológicos que

inhiban la función o expresión de TMCC3. Tanto los productos biológicos como los farmacéuticos pueden comprender agentes quimioterapéuticos para el pronóstico, detección y terapia del cáncer de mama o afecciones relacionadas.

5 Un agente quimioterapéutico (anticanceroso) puede ser cualquier agente capaz de reducir el crecimiento del cáncer, interferir con la replicación de las células cancerosas, destruir directa o indirectamente las células cancerosas, reducir las metástasis, reducir el suministro de sangre al tumor, etc. Los agentes quimioterapéuticos incluyen agentes citotóxicos. Los agentes citotóxicos incluyen, pero sin limitación, saporina, taxanos, alcaloides de la vinca, antraciclina y agentes a base de platino. Las clases de agentes quimioterapéuticos incluyen, pero sin limitación, agentes alquilantes, antimetabolitos, p. ej., metotrexato, alcaloides de plantas, por ejemplo, vincristina y antibióticos, por ejemplo, doxorubicina, así como fármacos diversos que no pertenecen a una clase particular como la hidroxiurea. Los fármacos a base de platino, ilustrados por cisplatino y oxaliplatino, representan una clase importante de quimioterapéuticos. Estos fármacos se unen al ADN e interfieren con la replicación. Los taxanos, ilustrados por taxol, representan otra clase importante de quimioterapéuticos. Estos compuestos actúan interfiriendo con la formación del citoesqueleto y del huso para inhibir la división celular y así prevenir el crecimiento de células cancerosas que se dividen rápidamente. Otros fármacos quimioterapéuticos incluyen la terapia hormonal.

Se puede combinar más de un agente terapéutico, ya sea en la misma composición o en composiciones separadas. El agente o agentes terapéuticos también se pueden combinar con agentes terapéuticos adicionales según sea apropiado para el individuo en particular. Los agentes terapéuticos comunes que se proporcionan a los pacientes con cáncer incluyen medicamentos para tratar el dolor, las náuseas, la anemia, la infección, la inflamación y otros síntomas que suelen experimentar los pacientes con cáncer.

En algunas realizaciones, los métodos divulgados en el presente documento son útiles para el tratamiento o la prevención de un cáncer, por ejemplo cuando un cáncer se caracteriza por una mayor expresión de TMCC3. En algunas realizaciones el cáncer comprende una célula madre cancerosa. En algunas realizaciones, el cáncer es un precáncer y/o un cáncer maligno y/o un cáncer resistente a la terapia. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer de mama.

En una realización, la expresión de TMCC3 se suprime o silencia mediante una molécula de ARN inductora de interferencia (ARNi) que incluye, pero sin limitación, un ARNip, ARNbc, ARNtp, ARNhc y sus variantes silenciadoras de genes.

También se proporciona un kit para el diagnóstico, estadiaje y/o pronóstico del cáncer, el comportamiento metastásico del cáncer, la obtención de imágenes *in vivo* y/o el control de la eficacia de un tratamiento terapéutico del cáncer, que comprende un agente de unión que se une específicamente a un antígeno TMCC3 e instrucciones de uso.

Se debe entender que los ejemplos y realizaciones descritos en este documento son con fines ilustrativos únicamente y que son posibles diversas modificaciones o cambios sin apartarse del alcance de la invención.

## 40 Ejemplos

### Ejemplo 1: Análisis de transferencia Western

45 Las células se lisaron en tampón RIPA suplementado con inhibidores de fosfatasa y proteasa y se hirvieron después de mezclarlas con tampón de carga de proteínas. Se sometieron alícuotas de lisados celulares a SDS-PAGE y las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF. Los lotes de membrana se bloquearon con tampón TBST que contenía BSA al 3 % durante 1 hora a temperatura ambiente y a continuación se incubaron con los respectivos anticuerpos primarios diluidos en TBST (que contenía Tween20 al 0,05 % y BSA al 3 %) durante la noche a 4 °C. Posteriormente, las transferencias se lavaron e incubaron con anticuerpos secundarios apropiados en TBST. Los anticuerpos anti-fosfo-mTOR (Ser 2448), mTOR, fosfo-Akt (Ser 473), Akt, p-FAK (Tyr 397), FAK, p-ERK1/2 (p44/42) y ERK1/2 se obtuvieron de Cell signaling Technology. El anticuerpo anti-GAPDH era de GeneTex Inc.

### Ejemplo 2: Ensayo de formación de mamíferas

55 Se cultivaron en placas células individuales a una densidad de 1.000 células por pocillo en placas de fijación ultrabaja (35 mm; Corning). Las células se cultivaron en DMEM/F12 sin suero, suplementado con B27 (1:50, Invitrogen), 20 ng/ml de EGF y 20 ng/ml de bFGF (BD Biosciences), y 10 ng/ml de insulina (Sigma). Las mamíferas se cultivaron durante 7-10 d. A continuación se contaron las mamíferas con un diámetro > 100 µm.

### 60 Ejemplo 3: Ensayo de ALDEFLUOR™ y citometría de flujo

Para medir la actividad ALDH de células inactivadas lentivirales, se realizó el ensayo ALDEFLUOR™ de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Stemcell Technologies, Vancouver, Canadá). Las células transfectadas con hc-TMCC3 y hc-control se suspendieron en el tampón de ensayo ALDEFLUOR™ que contiene sustrato de ALDH, 65 BODIPY aminoacetaldehído (BAAA) y se incubaron durante 30 minutos a 37 °C. Para distinguir entre células ALDH positivas y negativas, se incubó una fracción de células en condiciones idénticas en presencia del inhibidor de ALDH,

dietilamino benzaldehído (DEAB). Esto da como resultado una disminución significativa en la intensidad de la fluorescencia en las células ALDH positivas y se usó para compensar el análisis de citometría de flujo.

#### Ejemplo 4: Ensayo de migración en transpocillos

5 Se suspendieron  $1 \times 10^5$  células en medio MEM sin suero bovino fetal y se sembraron en la cámara superior del transpocillo mientras que la cámara inferior se cargó con medio completo MEM para formar un gradiente de nutrientes para atraer a las células a migrar y penetrar en el transpocillo. Después de una incubación de una noche a 37 °C, los transpocillos se lavaron, fijaron y tiñeron con violeta cristal. Después de secar la membrana del inserto y el número de  
10 células en el lado inferior del filtro se contaron al microscopio.

#### Ejemplo 5: Ensayo de inmunohistoquímica

15 Se recogieron los órganos del tumor y del ratón y se fijaron con formalina al 4 % y se incluyeron en parafina. Se hicieron cortes de 5  $\mu$ m y se montaron en portaobjetos de microscopio. Después de la recuperación del antígeno, los portaobjetos se tiñeron con anticuerpo anti-TMCC3 o anticuerpo IgG de conejo como control, seguido de un 2° anticuerpo conjugado con biotina y a continuación estreptavidina-HRP. Después de lavar con PBS, los portaobjetos se incubaron con solución de cromógeno DAB y se contratiñeron con hematoxilina. El cubreobjetos se montó con malinol y los portaobjetos se visualizaron en un microscopio óptico.

#### Ejemplo 6: Clasificación celular

20 Los tumores del xenoinjerto de ratón se sometieron a digestión enzimática mediante incubación en medio RPMI1640 que contenía colagenasa (1.000 U/ml), hialuronidasa (300 U/ml) y ADNasa I (100  $\mu$ g/ml) a 37 °C durante 1 h. Las células de cáncer de mama se recogieron después de la filtración a través de un filtro celular de 100  $\mu$ m (BD Biosciences) y se resuspendieron en medio RPMI1640 suplementado con FBS al 5 %. Las células se prepararon en RPMI1640 que contenía FBS al 5 % y antibióticos (penicilina/estreptomina) y a continuación se marcaron con mezclas de anticuerpos anti-CD44-APC y anti-H2kd de ratón conjugado con biotina (BD Pharmingen). La expresión de TMCC3 se detectó mediante tinción con anticuerpo anti-TMCC3 de conejo (HPA014272, Sigma) seguido de anti-IgG de conejo de cabra conjugado con Alexa488. Se seleccionaron las poblaciones de células CD44<sup>+</sup>, TMCC3<sup>+</sup>, H2kd<sup>+</sup> y CD44<sup>+</sup>, TMCC3<sup>-</sup>, H2kd<sup>-</sup> y se clasificaron respectivamente mediante el clasificador de células FACS Aria II (Becton Dickinson).

#### Ejemplo 7: Producción y transducción del vector lentiviral

35 TRCN0000179802 (CCGGCGACAACATTGCTCACTTGAAGTTCGAGTTCAGTCAAGTGAGCAATGTTGTCGTTT TTTG; SEQ ID NO:4) clon, TRCN0000183750 (CCGGCGTCATGACATGAATACCTTACTCGAGTAAGGTATTCA TGTCATGACGTTTTTTG; SEQ ID NO:5) clon, TRCN0000180412 (CCGGGATGGGAATGTTGCGGAGTATCTC GAGATACTCCGCAACATTCCCATCTTTTTTTG; SEQ ID NO:6), TRCN0000072205 (control no dirigido), El plásmido pMD.G y el plásmido pCMV $\Delta$ R8.91 se obtuvieron en el National RNAi Core Facility, Institute of Molecular Biology, (Academia Sinica, Taipei, Taiwán). Un experto en la materia apreciaría que en su lugar se pueden usar plásmidos similares de otras fuentes comerciales. Para la transducción lentiviral, las células se infectaron con partículas lentivirales en multiplicidades de infección de 1 a 5. Después de 24 horas de infección, los medios de cultivo se reemplazaron con medio completo MEM que contenía 2  $\mu$ g/ml de puromicina durante otras 48 horas. A continuación, se recogieron las células transfectadas con lentivirales para experimentos adicionales, y se realizaron ensayos de Q-PCR o transferencia Western para confirmar la eficacia de la inactivación.

#### Ejemplo 8: Generación de anticuerpos contra polipéptidos

50 Los polipéptidos que comprenden TMCC3 o un fragmento antigénico de la misma se sintetizan o aíslan de sistemas de expresión bacteriana u otros (p. ej., levaduras, baculovirus) y se conjugan con seroalbúmina de conejo (RSA) con éster de N-hidroxisuccinimida de ácido m-maleimido benzoico (MBS) (Pierce, Rockford, 111.). Los protocolos de inmunización con estos péptidos se realizan según métodos estándar. Inicialmente, se realiza un sangrado previo de los conejos antes de la inmunización. La primera inmunización incluye adyuvante completo de Freund y 500  $\mu$ g de péptido conjugado o 100  $\mu$ g de péptido purificado. Todas las inmunizaciones posteriores, realizadas cuatro semanas después de la inyección anterior, incluyen adyuvante incompleto de Freund con la misma cantidad de proteína. Los sangrados se llevan a cabo de siete a diez días después de las inmunizaciones.

60 Para la purificación por afinidad de los anticuerpos, el polipéptido TMCC3 correspondiente se conjuga a RSA con MBS y se acopla a Sepharose activada con CNBr (Farmacia, Upsala, Suecia). El antisuero se diluye 10 veces en Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, y se incuba durante la noche con la matriz de afinidad. Después del lavado, los anticuerpos unidos se eluyen de la resina con glicina 100 mM, pH 2,5.

#### Ejemplo 9: Generación de anticuerpos monoclonales contra TMCC3 o un fragmento antigénico de la misma

65 Se rehidrata un adyuvante no desnaturalizante (Ribi, R730, Corixa, Hamilton Mont.) hasta 4 ml en solución salina

tamponada con fosfato. A continuación, se diluyen 100 µl de este adyuvante rehidratado con 400 µl de solución salina equilibrada de Hank y a continuación se mezcla suavemente con el sedimento celular utilizado para la inmunización. Aproximadamente 500 µg de péptido conjugado o 100 µg de péptido purificado y adyuvante completo de Freund se inyectan en ratones Balb/c en la almohadilla de la pata, una vez a la semana. Después de 6 semanas de inyección

5 semanal, se extrae una gota de sangre de la cola de cada animal inmunizado para determinar el título de anticuerpos contra polipéptidos de TMCC3 o células que expresan TMCC3 usando análisis FACS. Cuando el título alcanza al menos 1:2000, los ratones se sacrifican en una cámara de CO<sub>2</sub> seguido de dislocación cervical. Los ganglios linfáticos se recolectan para la preparación de hibridomas. Los linfocitos de ratones con el título más alto se fusionan con la línea de mieloma de ratón X63-Ag8.653 usando polietilenglicol 4000 al 35 %. El día 10 después de la fusión, los

10 sobrenadantes de hibridomas se seleccionan para detectar la presencia de anticuerpos monoclonales específicos de TMCC3 mediante clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). El medio acondicionado de cada hibridoma se incuba durante 30 minutos con una alícuota combinada de células PC3, Colo-205, LnCap, o Panc-1. Después de la incubación, las muestras de células se lavan, se resuspenden en 0,1 ml de diluyente y se incuban con 1 µg/ml de fragmento F(ab')<sub>2</sub> conjugado con FITC de anti-IgG de ratón de cabra durante 30 min a 4 °C. Las células se lavan, se resuspenden en 0,5 ml de diluyente FACS y se analizan usando un analizador de células FACScan (Becton Dickinson; San José, Calif.). Los clones de hibridoma se seleccionan para expansión, clonación y caracterización adicionales basándose en su unión a la superficie de una o más de las líneas celulares que expresan el polipéptido de TMCC3 según lo evaluado por FACS.

## 20 **Generación de anticuerpos monoclonales (mAb) contra TMCC3 mediante presentación en fagos**

Además de usar la proteína TMCC3 o fragmentos de la misma como antígeno para producir anticuerpos contra TMCC, también hemos generado mAb contra TMCC3 usando métodos de presentación en fagos.

25 Como se muestra en la Figura 7, las estructuras secundarias predichas del dominio extracelular de TMCC3 incluyen dos dominios de superhélice unidos por un dominio interhélice. El primer dominio de superhélice abarca los aminoácidos 112-153, y el segundo dominio de superhélice abarca los aminoácidos 282-398. El dominio interhélice (es decir, el enlazador) está localizado entre los aminoácidos 153 y 282. Los anticuerpos que serían más útiles se unirían a estos dominios extracelulares. Para facilitar la selección por afinidad, se construyeron varios fragmentos de TMCC3

30 que incluyen los dominios extracelulares de TMCC3 o fragmentos de los dominios extracelulares. Estos fragmentos de proteínas se construyen con un Fc (fragmento constante de anticuerpo) o una etiqueta His para facilitar la purificación y manipulación de estos péptidos.

Estos fragmentos se pueden construir en cualquier vector adecuado para la expresión de proteínas. La Figura 8 muestra dos ejemplos de dos vectores de expresión basados en el vector pNC. Estos fragmentos producidos pueden usarse para cribar fagos que pueden unirse a los dominios TMCC3 como se describe a continuación. La clonación de una secuencia deseada en un vector comercializado es una práctica rutinaria para un experto en la materia. Por tanto, un experto en la materia apreciaría que los dos vectores mostrados son solo para ilustración y no pretenden limitar el alcance de la invención.

40

### **Enfoque de presentación en fagos**

La siguiente descripción proporciona un procedimiento ilustrativo para el enfoque de presentación en fagos. Un experto en la materia apreciaría que los diversos parámetros y condiciones proporcionados en este ejemplo son solo para ilustración y estos parámetros pueden modificarse u optimizarse sin apartarse del alcance de la invención.

45

### **Construcción de la biblioteca de anticuerpos anti-scFv/Fab**

De acuerdo con realizaciones de la invención, los anticuerpos se pueden generar usando selección por afinidad de fagos. Como se muestra en la FIG. 9, se puede construir una biblioteca de ADNc a partir de ratones inmunizados. Los ratones pueden inmunizarse, por ejemplo, con una TMCC3 recombinante o un fragmento de la misma. Los ratones se sacrificaron y se extrajeron los bazo para extraer el ARN total. Se usó RT-PCR a continuación para obtener los fragmentos de anticuerpo (p. ej., V<sub>H</sub>, V<sub>L</sub>, cadena pesada (Fd) o cadena ligera). Estos fragmentos se pueden usar para construir una biblioteca de Fab. Además, estos fragmentos se ensamblaron usando PCR para generar fragmentos de

50 ADNc de anticuerpos para scFv, que a continuación se usaron para construir la biblioteca de scFv. En un ejemplo, la biblioteca de Fab tiene 6,6×10<sup>8</sup> diversidades y la biblioteca de scFv tiene 1,4×10<sup>9</sup> diversidades.

55

### **Preparación de fagos para cribado**

60 Las reservas de la biblioteca (scFv o Fab) anterior se inocularon cada una en medio 2×YT que contenía 100 µg/ml de ampicilina y glucosa al 2 % (2YTAG) y se cultivaron con agitación a 37 °C hasta que la DO (600 nm) alcanzó 0,5. A continuación, este cultivo se infectó con el fago auxiliar M13KO7 añadiendo el fago auxiliar en una proporción de 1:20. El cultivo resultante se incubó en un baño de agua a 37 °C sin agitar durante 30 minutos.

65 A continuación, las células infectadas se recogieron por centrifugación a 4.000 rpm durante 15 minutos. Las células se resuspendieron suavemente en medio 2×YT que contenía 100 µg/ml de ampicilina y 25 µg/ml de kanamicina

(2YTAK) y se incubaron con agitación a 30 °C durante la noche.

La incubación durante una noche se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 min para recoger las células. Se añadió PEG/NaCl (20 % PEG 8000, NaCl 2,5M; 1/5 de volumen) al sobrenadante. La solución se mezcló y se dejó durante 1 hora o más a 4 °C. Luego se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 min. A continuación, se aspiró el sobrenadante.

El sedimento se resuspendió en 40 ml de agua estéril y se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 min para eliminar la mayor parte de los residuos bacterianos restantes. Se añadió de nuevo un 1/5 de volumen de PEG/NaCl al sobrenadante. Se mezcló bien y se dejó durante 1 h o más a 4 °C.

Se centrifugó de nuevo a 10.000 rpm durante 20 min y se aspiró el sobrenadante. El sedimento se resuspendió a continuación en PBS y se centrifugó a 12.000 rpm durante 10 min para eliminar la mayor parte de los residuos bacterianos restantes.

Lo anteriormente descrito es un ejemplo para la preparación de fagos. Este ejemplo es solo para ilustración y no pretende limitar el alcance de la protección. Un experto en la materia apreciará que son posibles diversas modificaciones y variaciones. Los fagos se pueden cribar usando placas ELISA o Dynabeads®.

### Selección usando placas ELISA

La placa ELISA (Nunc) se revistió con 1 µg/100 µl de antígeno (p. ej., los fragmentos TMCC3 recombinantes) por pocillo. El recubrimiento del antígeno se realizó durante la noche a 4 °C en PBS, pH 7,4 o hidrogenocarbonato de sodio 50 mM, pH 9,6. A continuación, los pocillos se enjuagaron 3 veces con PBS y se bloquearon con 300 µl de PBS-leche desnatada al 5 % (MPBS) por pocillo durante 1,5 horas a 37 °C. A continuación, se enjuagó con PBS 3 veces.

A continuación, 100 µl de  $10^{11}$  a  $10^{12}$  fagos en MPBS al 5 %. La solución se incubó durante 90 min a 37 °C, y la solución de prueba se desechó y se lavó 3 veces con PBS-Tween20 al 0,05 % (PBST).

A cada pocillo se añadieron 100 µl de PBS. Se incubó durante 60 min a 37 °C y se lavó 3 veces con PBST, 1 vez con PBS. Se sacudió el exceso de PBS de la placa y se eluyeron los fagos añadiendo 100 µl de trietilamina (TEA) 100 mM con rotación continua a 37 °C durante 30 min. Se añadió tampón Tris (50 µl, 1M, pH 7,4) al fago eluido de 100 µl, para una rápida neutralización.

Se extrajeron 10 ml de un cultivo en crecimiento exponencial de *Escherichia coli* TG1 y se añadió a 150 µl del fago eluido. También se añadieron 100 µl del cultivo TG1 a la inmunoplaaca. Ambos cultivos se incubaron durante 30 min a 37 °C sin agitar para permitir la infección. Se reunieron los 10 ml y los 100 µl de las bacterias TG1 infectadas y se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 min. Las bacterias sedimentadas se resuspendieron en medio 2× TY y se colocaron en una placa grande 2YTAG. Se permitió que las bacterias crecieran a 30 °C durante la noche.

### Selección usando Dynabeads®

Se lavaron previamente las Dynabeads® con 1 ml de PBS tres veces y se resuspendieron en MPBS al 2 %. El fago (0,3 ml) se mezcló con 0,5 ml de PBSM al 2 % y las Dynabeads® anteriormente lavadas. La suspensión resultante se incubó previamente en un rotador durante 30 min.

Se retiraron las Dynabeads® y se añadió el fragmento TMCC3 (marcado con biotina). La mezcla resultante se mezcló en un rotador durante 90 min. Se lavaron previamente las Dynabeads® con 1 ml de PBS tres veces y se resuspendieron en PBSM al 2 %. A continuación, se incubó en un rotador durante 90 min.

La mezcla de fragmentos de fago-TMCC3 se añadió a las Dynabeads® equilibradas en un rotador durante otros 30 min. A continuación, las Dynabeads® se lavaron con 1 ml de PBST al 0,05 %, PBSM al 2 %, y PBS. A continuación, los fagos unidos se eluyeron con 1 ml de TEA 100 mM. Durante la incubación, se prepararon tubos con 0,5 ml de Tris 1M, pH 7,4 para preparar la adición de los fagos eluidos para una rápida neutralización.

Se tomaron 6 ml de un cultivo de TG1 en crecimiento exponencial y se añadió el fago eluido con TEA. También se añadieron a las perlas 4 ml del cultivo TG1 de *E. coli*. Ambos cultivos se incubaron durante 30 min a 37 °C (baño de agua) sin agitar.

Las bacterias TG1 infectadas se reunieron y se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 min. El sedimento bacteriano se resuspendió en 1 ml de 2×YT y se colocó en una placa grande 2TYAG. Las bacterias se cultivaron a 30 °C durante la noche.

### Preparación de los fagos de la siguiente ronda

Se añadieron 5-6 ml de medio 2×YT que contenía glicerol al 15 % a la placa bacteriana que había crecido durante la noche como se describe anteriormente y las colonias se separaron con un esparcidor de vidrio. Se añadieron 50-

100 µl de las bacterias raspadas a 100 ml de 2×YTAG. Las bacterias crecieron con agitación a 37 °C hasta que la DO a 600 nm fue de 0,5. Se infectaron 10 ml de este cultivo con fago auxiliar M13KO7 añadiendo fago auxiliar en una proporción de 1:20. El cultivo infectado se incubó sin agitar a 37 °C.

- 5 Las células infectadas a 4000 rpm durante 15 min se centrifugaron para recoger las bacterias. El sedimento se resuspendió suavemente en 50 ml de medio 2×YTAK y el cultivo se incubó con agitación a 30 °C durante la noche.

Se tomaron 40 ml de la incubación de una noche y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 20 min para recoger el sobrenadante. Se añadió un 1/5 de volumen (8 ml) de PEG/NaCl al sobrenadante, se mezcló bien y se dejó durante 1 hora o más a 4 °C. El sobrenadante se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 min y a continuación se aspiró. El sedimento se resuspendió en 2 ml de PBS y se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min para eliminar la mayor parte de los residuos bacterianos restantes.

### 15 Cribado de los fagos TMCC3 positivo mediante ELISA

Las colonias individuales de la placa se incubaron en placas de 96 pocillos con 200 µl de 2×YTAG y se cultivaron con agitación durante la noche a 37 °C. Se utilizó un dispositivo de 96 pocillos como dispositivo de transferencia para transferir 50 µl de inóculo de la placa a una segunda placa de 96 pocillos que contenía 200 µl de 2×YTAG por pocillo y creció con agitación a 37 °C durante 2 h. Se añadió 50 µl de 2×YTAG con 10<sup>9</sup> ufp de fago auxiliar M13KO7 a cada pocillo de la segunda placa, se dejó reposar durante 30 min a 37 °C y a continuación se agitó durante 1 h a 37 °C.

La placa se centrifugó de nuevo a 4000 rpm durante 30 min y se aspiró el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 300 µl de 2×YTAK y se incubó con agitación durante la noche a 30 °C. La mezcla se agitó a 4000 rpm durante 30 min y se usaron 100 µl del sobrenadante del cultivo en el ELISA de los fagos.

25 Las placas de ELISA se recubrieron con 1 µg/100 µl por pocillo de antígeno proteico. Los pocillos se enjuagaron 3 veces con PBS y se bloquearon con 300 µl de MPBS al 2 % por pocillo durante 2 h a 37 °C. Los pocillos se enjuagaron durante 3 veces con PBS. Se añadieron 100 µl de sobrenadante de cultivo de fagos como se detalla anteriormente y se incubaron durante 90 min a 37 °C. La solución de ensayo se descartó y se lavó tres veces con PBST. Se añadió una dilución apropiada de HRP-anticuerpo anti-M13 en MPBS al 2 %, se incubó durante 90 min a 37 °C y se lavó tres veces con PBST.

30 La mezcla de reacción se desarrolló con solución de sustrato (TMB). La reacción se detuvo añadiendo 50 µl de ácido sulfúrico 1 M. El color debe volverse amarillo. Se leyó la DO a 650 nm y a 450 nm. La lectura de la DO 650 se restó de la DO 450.

La Figura 10 muestra un resultado ilustrativo de la selección por afinidad usando los métodos de placa ELISA. En este experimento, se usó como control de fondo un fragmento VEGFR2-Fc. Los clones que también se unen al control de fondo (como el clon 3B-12) probablemente se unen a la porción Fc de las proteínas recombinantes. Estos clones pueden descartarse. Como se muestra en la Figura 10, se identificaron varios clones específicos de la región interhélice de TMCC3.

45 Para su uso como agentes terapéuticos, los anticuerpos deberían tener preferiblemente buenas afinidades por la molécula diana. Las afinidades y la cinética de varios anticuerpos que se unen a TMCC3 pueden evaluarse usando cualquier instrumento adecuado, tal como ELISA o un ensayo basado en resonancia de plasmón superficial (SPR) en BIAcore T100.

La Figura 11 muestra las interacciones de unión entre TMCC3 interhélice-Fc-10His y los anticuerpos quiméricos derivados de los clones de fagos positivos. A partir de las curvas de unión, se pueden calcular las constantes de disociación de estos clones de fagos (se muestran en la Tabla de la Figura 11). Como se muestra, la unión entre TMCC3 interhélice-Fc-10His y la mayoría de los anticuerpos quiméricos es bastante estrecha, con constantes de disociación en el intervalo sub-nano molar (alrededor de 10<sup>-10</sup> M). Por ejemplo, el anticuerpo 4-84 tiene una constante de disociación de 1,13×10<sup>-10</sup> M.

55 Las secuencias de CDR del anticuerpo 4-84 son las siguientes: CDRH1 (GFNIKDYMH; SEQ ID NO: 13), CDRH2 (WIDPENGDTHEYAPKFDG; SEQ ID NO: 14), CDRH3 (NFDY; SEQ ID NO: 15), CDRL1 (SASSSVSYMY; SEQ ID NO: 16), CDRL2 (DTSNLAS; SEQ ID NO: 17), y CDRL3 (QQYSGYPLT; SEQ ID NO: 18).

Además, las secuencias CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2, y CDRL3 (SEQ ID NOS: 20-763) de otros anticuerpos diferentes se muestran en la Fig. 29. Se indican sus sitios de unión en TMCC3, ya sea en la región interhélice de TMCC3 o la primera hélice de TMCC3. La mayoría de las secuencias de CDR muestran altos grados de homología. Por ejemplo, CDRH1 contiene la secuencia de GFNIKDYMH o una secuencia altamente homóloga a esta secuencia, y CDRH2 contiene la secuencia de GFNIKDYMH o una secuencia altamente homóloga a esta secuencia.

### 65 Mediciones de afinidad y análisis cinético con BIAcore

La cinética de unión entre TMCC3 interhélice-Fc-10His y los anticuerpos quiméricos pueden medirse usando BIAcore y analizarse, por ejemplo, mediante un método de cinética de ciclo único o ciclo múltiple (MCK) usando el software asociado. A continuación se describen parámetros y condiciones de ejemplo para un ensayo BIAcore. Estos parámetros y condiciones son solo para referencia y un experto en la materia apreciaría que son posibles variaciones sin apartarse del alcance de la presente invención.

A modo de ejemplo, un anticuerpo quimérico TMCC3 se puede inmovilizar en chips CM5 a una densidad que permitiera alcanzar  $R_{max}$  en el intervalo de 50 - 150 Unidades de Respuesta (RU).

En este ejemplo, los parámetros del ensayo cinético fueron los siguientes: tasa de recogida de datos 1 Hz; modo de detección doble; temperatura: 25 °C; unidad de concentración: nM; y tampón A HBS-EP. Las medidas se realizaron con 5 repeticiones. Los distintos ajustes del instrumento son los siguientes.

Seleccione Captura, ruta de flujo 2-1, chip CM5, regeneración 1.

Seleccione la captura de ligando y configure los parámetros como se indica a continuación, Tiempo de contacto: 12s, Caudal: 10  $\mu$ l/min, Período de estabilización: 90s. (En el intervalo de 50-150 Unidades de Respuesta (RU)) (Anticuerpos anti-TMCC3 de BD2 y mutantes como ligandos).

Seleccione la muestra y configure los parámetros como se indica a continuación, Tiempo de contacto: 300s, Caudal: 40  $\mu$ l/min, Tiempo de disociación: 500s.

Seleccione la Regeneración y configure los parámetros como se indica a continuación, Solución de regeneración: Glicina 25 mM pH1,5, Tiempo de contacto: 60s, Caudal: 30  $\mu$ l /min, Período de estabilización: 120s.

Diluciones en serie de fragmentos de TMCC3 con el tampón de análisis (HBS-EP+). Las concentraciones en serie obtenidas son 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,3125, 0,15625, 0 y 1,25 nM (repetición). Prepare y coloque las muestras de acuerdo con las posiciones de la gradilla.

Los resultados se evaluaron con el software de evaluación BIAcoreT100. Las respuestas de unión se corrigieron para los efectos del tampón restando las respuestas de una celda de flujo en blanco. Se usó un modelo de ajuste de Langmuir 1:1 para estimar la  $k_a$  o  $k_{on}$  (tasa de asociación u on-rate) y  $k_d$  o  $k_{off}$  (tasa de disociación u off-rate). Los valores  $K_D$  (o  $K_d$ ) se pueden determinar a partir de las relaciones de  $k_{off}$  y  $k_{on}$  (es decir,  $K_d = k_{off}/k_{on}$ ).

La Figura 12A muestra ensayos de cinética de ciclo único de dos ejemplos que utilizan clones 3B-8 y 3B-45 para la unión a TMCC3 interhélice-Fc-10His (condiciones de ensayo: 900 RU, pH 5,5), y la Figura 12B muestra los mismos ensayos en condiciones ligeramente diferentes (200 RU, pH 5,5). Los parámetros cinéticos correspondientes se muestran en las tablas debajo de los gráficos. Otros anticuerpos también tienen actividades similares. Los resultados para estos clones del análisis cinético de SPR (BIAcore) se muestran en la Tabla de la Figura 13.

### Cartografía de epítomos de mAb quiméricos específicos de TMCC3

También hemos investigado los epítomos que interactúan con los mAb quiméricos específicos de TMCC3, usando diversos fragmentos de TMCC3. Como se muestra en la Figura 13, dos anticuerpos quiméricos, 3B-22 y 4-84 muestran buenas uniones a los fragmentos interhélice de TMCC3. El clon 3B-22 se une a fragmentos que contienen las regiones interhélice 1-30 del péptido, lo que sugiere que este mAb se une a un epítomo localizado dentro del tramo de aminoácidos 1-30 en la región interhélice. Por otro lado, los clones 3B-66 y 4-84 se unen bien a fragmentos más largos (fragmentos interhélice 1-67 y 1-128), pero solo débilmente al fragmento más corto (p. ej., el fragmento interhélice 1-30), lo que sugiere que es probable que sus epítomos se encuentren localizados en los aminoácidos 30-67 de la interhélice.

### Uniones de los mAb a las células cancerosas

Algunas realizaciones de la invención se refieren a métodos para tratar cánceres usando anticuerpos contra TMCC3. Se investiga la capacidad de estos anticuerpos para unirse a las células cancerosas. La unión de los anticuerpos a las células cancerosas se evalúa usando inmunohistoquímica en reposo, seguido de ensayos de imágenes de citometría de flujo. Los resultados de la unión de varios anticuerpos a diferentes líneas de células cancerosas se muestran en las Figuras 15-18.

La Figura 15 muestra los resultados de la unión a células AS-B634 (p15) por varios anticuerpos. La Figura 16 muestra los resultados de la unión a células MDA-MB231, que son células triple negativas, altamente invasivas y metastásicas. La Figura 17 muestra los resultados de la unión a BCSC humanas, que se obtuvieron de un paciente. Los resultados de varios anticuerpos que se unen a diferentes células de cáncer de mama (AS-B634, MDA-MB231, y T47D) se resumen como gráficas de barras en la Figura 18.

Además de las células de cáncer de mama que se muestran en las Figuras 15-18, los anticuerpos también se unen

bien a otras células cancerosas. La Figura 19 muestra los resultados de la unión a una línea celular de cáncer de próstata (PC3). La Figura 20 muestra los resultados de la unión a las células de cáncer de páncreas (p. ej., As PC1, MIA-paca1, y PL45). Las capacidades de varios anticuerpos para unirse a las células de hepatoma (HepG2, Hep3B, H22T/VGH, y H59T/VGH) se muestran en la Figura 21. Como se puede ver los clones 3B-22 y 4-84 son enlazantes muy fuertes para estas células de hepatoma. La Figura 22 muestra los resultados de la unión de diversos anticuerpos a las células de cáncer de pulmón (H460 y A549). Estos resultados muestran que los anticuerpos de la invención pueden unirse estrechamente a varias células cancerosas. Por tanto, estos anticuerpos tienen amplias aplicaciones.

### **Unión de anticuerpos a xenoinjertos de cáncer**

Además de a líneas celulares, estos anticuerpos también se unen bien a las células cancerosas en los xenoinjertos. La Figura 23 muestra la unión de varios anticuerpos del xenoinjerto tumoral de cáncer de mama y de invención (BC0244), y la Figura 24 muestra resultados similares con otro xenoinjerto tumoral de cáncer de mama (BC0145). Además de los xenoinjertos de cáncer de mama, estos anticuerpos también son eficaces para unirse al xenoinjerto de cáncer de páncreas (Figura 25; PC038). De nuevo, estos resultados muestran que los anticuerpos de la invención pueden tener amplias aplicaciones en diferentes tipos de cáncer.

### **Actividades CDC (citotoxicidad dependiente del complemento) de los anticuerpos anti-TMCC3**

La unión del anticuerpo a una célula diana puede inducir la muerte celular. De hecho, esto se observa con los anticuerpos de la invención. Como se muestra en la Figura 26, la unión de varios anticuerpos anti-TMCC3 a la línea celular de cáncer de mama MDA-MB231 dio como resultado una citotoxicidad dependiente del complemento. Como resultado, se lisaron las células de cáncer de mama. Estos resultados indican que los anticuerpos de la presente invención pueden ser eficaces para unirse a las células cancerosas e inducir la lisis de las células cancerosas a través de mecanismos dependientes del complemento. En consecuencia, estos anticuerpos serían agentes eficaces para el tratamiento contra el cáncer.

### **Actividades de citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) de los anticuerpos anti-TMCC3**

La ADCC es un mecanismo de defensa inmunitaria mediada por células, mediante el cual una célula efectora del sistema inmunitario puede lisar una célula diana una vez que los antígenos de la superficie de la membrana de la célula diana se unen mediante anticuerpos específicos. La Figura 27 muestra que los anticuerpos de la invención también son eficaces para inducir la ADCC para lisar las células cancerosas diana (p. ej., MDA MB231). Estos resultados indican que los anticuerpos de la invención pueden inducir la lisis de las células diana mediante los mecanismos CDC y ADCC.

### **Enriquecimiento de células cancerosas similares a células madre (también denominadas "células madre cancerosas")**

Tal como se ha indicado anteriormente, la subpoblación de células cancerosas que son similares a células madre expresan más TMCC3. Estas células cancerosas similares a células madre, son más invasivas y deberían ser el foco principal de los tratamientos de la terapia del cáncer. Para manejar y tratar eficazmente estas células cancerosas más agresivas, se necesita un medio para identificar y aislar estas células cancerosas similares a células madre.

Los resultados de unión de los anticuerpos anteriores indican que los anticuerpos de la invención serían herramientas útiles para la identificación y separación de tales células cancerosas similares a células madre.

La Figura 28 muestra un ejemplo de este tipo: enriquecimiento de células cancerosas similares a células madre del xenoinjerto BC0145.

El hecho de que estos anticuerpos sean eficaces para enriquecer las células cancerosas similares a las células madre indica que son útiles tanto para el diagnóstico como para la terapia. Para el diagnóstico, se pueden utilizar para evaluar la existencia y la cantidad de células cancerosas similares a células madre. La existencia de tales células indicaría tipos de cáncer más invasivos. Para aplicaciones terapéuticas, estos anticuerpos pueden usarse para dirigirse a esta población más invasiva en los cánceres, por ejemplo, conjugándolos con un agente terapéutico, un radioisótopo o un agente citotóxico, o simplemente uniéndose a estas células para inducir la lisis CDC o ADCC. Alternativamente, estos anticuerpos pueden usarse para eliminar células cancerosas similares a células madre circulantes. Estos son ejemplos limitados de cómo se pueden usar estos anticuerpos para diagnosticar y tratar la subpoblación más agresiva de células cancerosas. Un experto en la materia apreciaría que las aplicaciones de estos anticuerpos no están tan limitadas.

Aunque la invención se ha descrito con respecto a un número limitado de realizaciones, Los expertos en la materia, que se beneficien de esta divulgación, apreciarán que se pueden idear otras realizaciones que no se aparten del alcance de la invención según se reivindica. En consecuencia, el alcance de la invención debería estar limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo contra la proteína con dominios de superhélice transmembrana 3 (TMCC3), o un fragmento de unión de la misma, en donde el anticuerpo comprende las siguientes secuencias de CDR:
- 5            la secuencia de CDRH1 es el SEQ ID NO: 102, la secuencia de CDRH2 es el SEQ ID NO: 226, la secuencia de CDRH3 es el SEQ ID NO: 350, la secuencia de CDRL1 es el SEQ ID NO: 474, la secuencia de CDRL2 es el SEQ ID NO: 598, y la secuencia de CDRL3 es el SEQ ID NO: 722, o
- 10          la CDRH1 es el SEQ ID NO: 101, la CDRH2 es el SEQ ID NO: 225, la CDRH3 es el SEQ ID NO: 349, la CDRL1 es el SEQ ID NO: 473, la CDRL2 es el SEQ ID NO: 597, y la CDRL3 es el SEQ ID NO: 721.
2. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o el fragmento de unión de acuerdo con la reivindicación 1.
- 15 3. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 2, para su uso en un método para tratar el cáncer, comprendiendo el método: administrar a un sujeto que lo necesite la composición farmacéutica.
4. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, y hepatoma.
- 20 5. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el cáncer es cáncer de mama.
6. Un método para diagnosticar o evaluar una afección de cáncer usando el anticuerpo o el fragmento de unión del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende:
- 25            evaluar un nivel de expresión o actividad de la proteína con dominios de superhélice transmembrana 3 (TMCC3) en una muestra que se ha obtenido de un sujeto,
- 30            en donde un aumento en el nivel de expresión o de actividad de TMCC3 en comparación con un patrón indica la presencia de células madre cancerosas en la muestra.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde las células madre cancerosas son células madre cancerosas hematopoyéticas, epidérmicas, de mama, ovario, pulmón, páncreas, próstata, cerebro, colon, médula ósea, y/o ganglios linfáticos.
- 35 8. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde las células madre cancerosas son células madre cancerosas de mama.
9. El anticuerpo o el fragmento de unión del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en un método *in vivo* de localización u obtención de imágenes de células madre cancerosas.
- 40 10. Un método para localizar u obtener imágenes de células madre cancerosas usando el anticuerpo o el fragmento de unión del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el método no es un método de diagnóstico practicado en el cuerpo humano o animal.
- 45

Figura 1

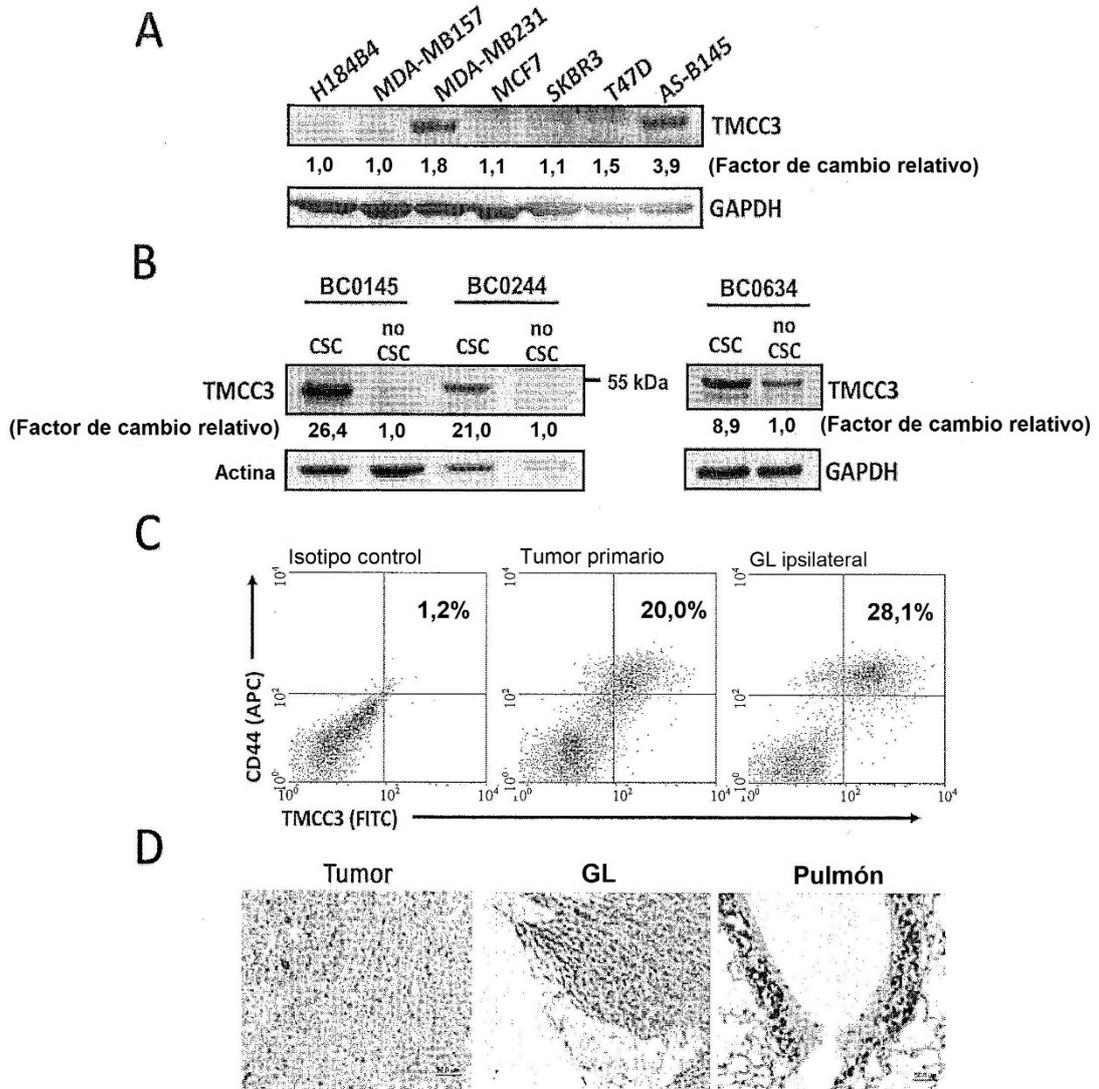


Figura 2

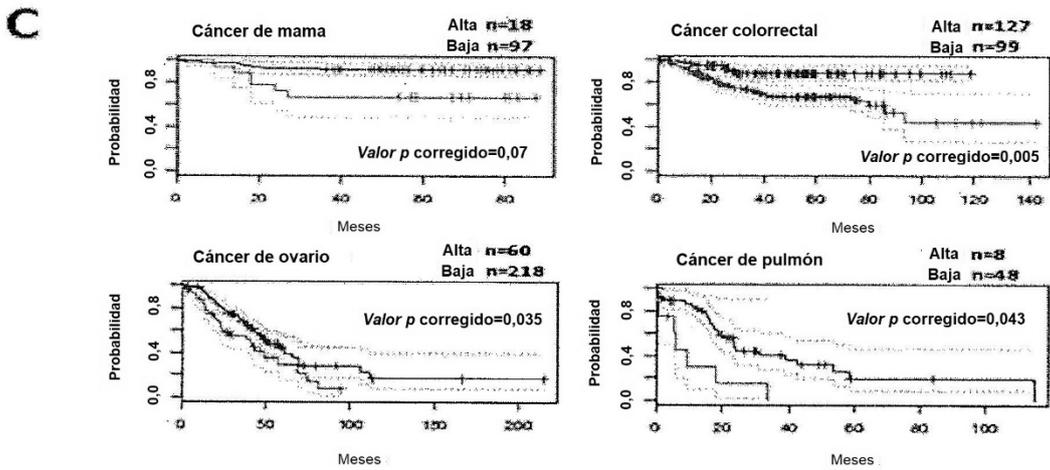
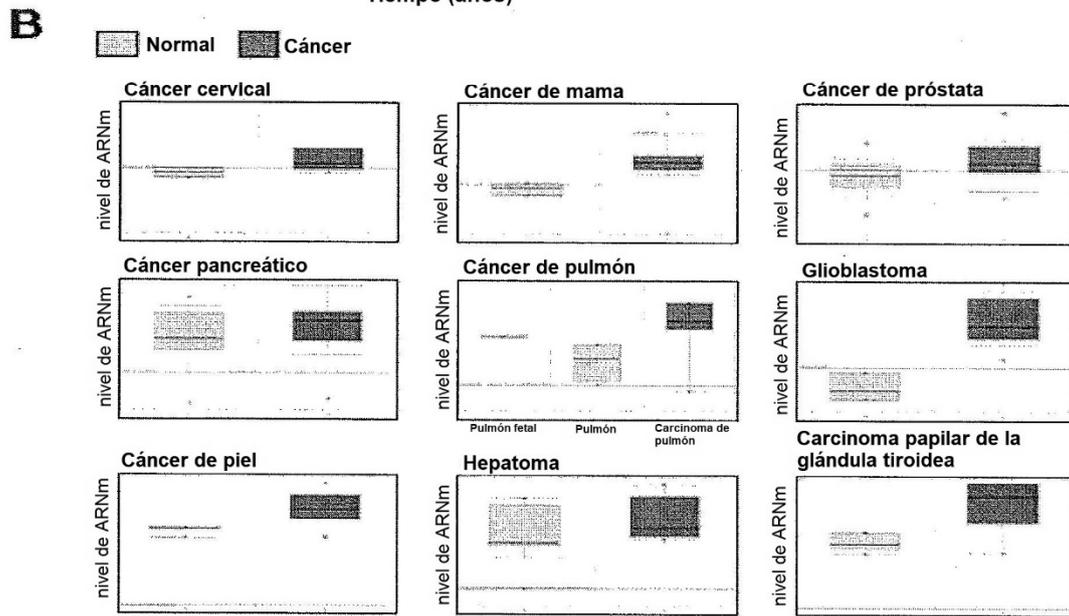
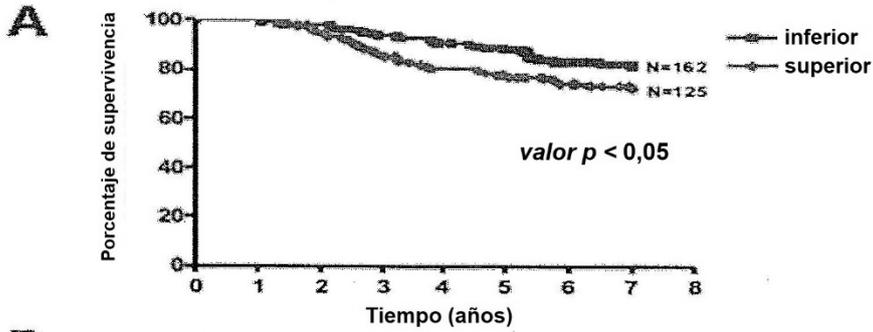


Figura 3

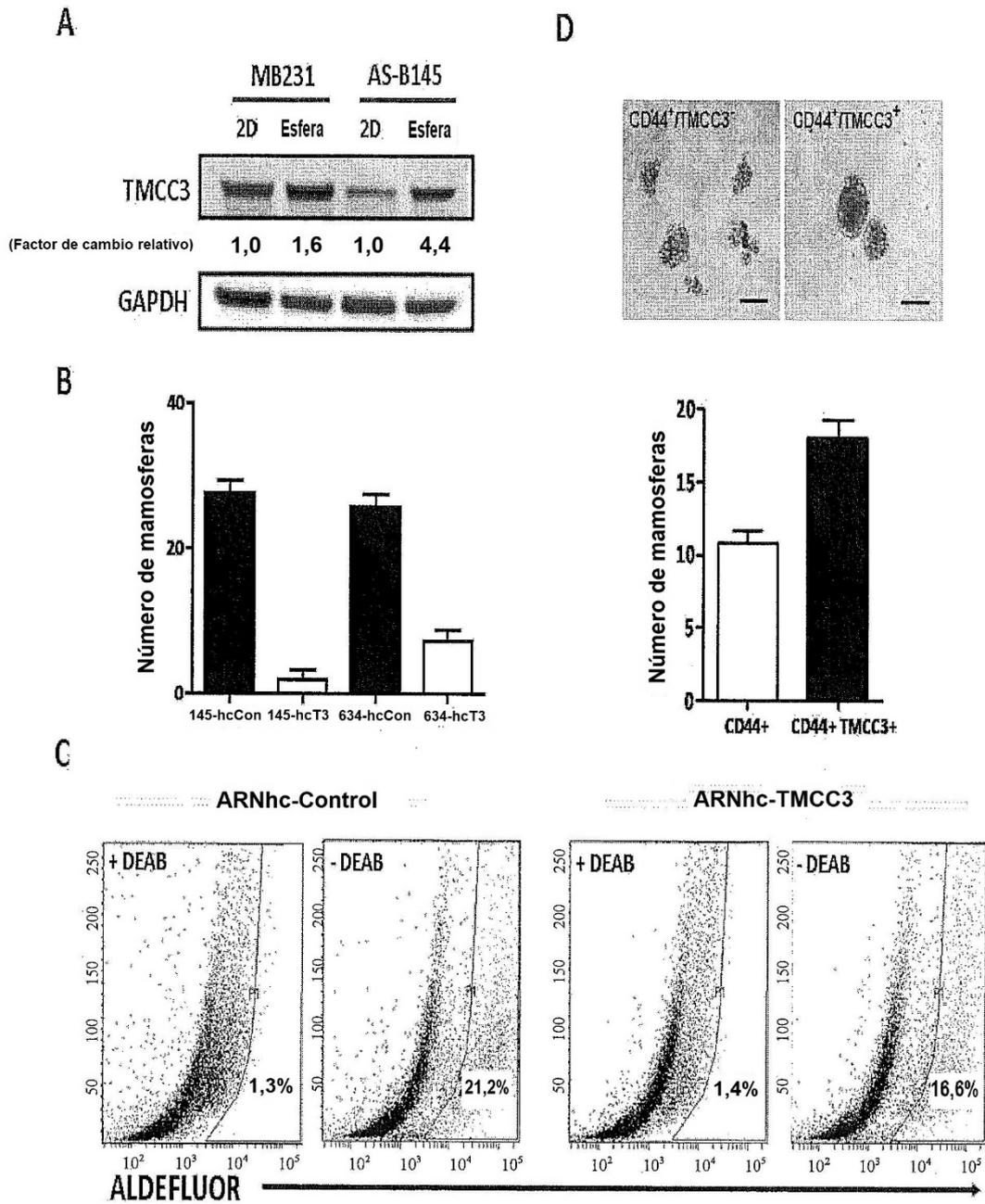


Figura 4

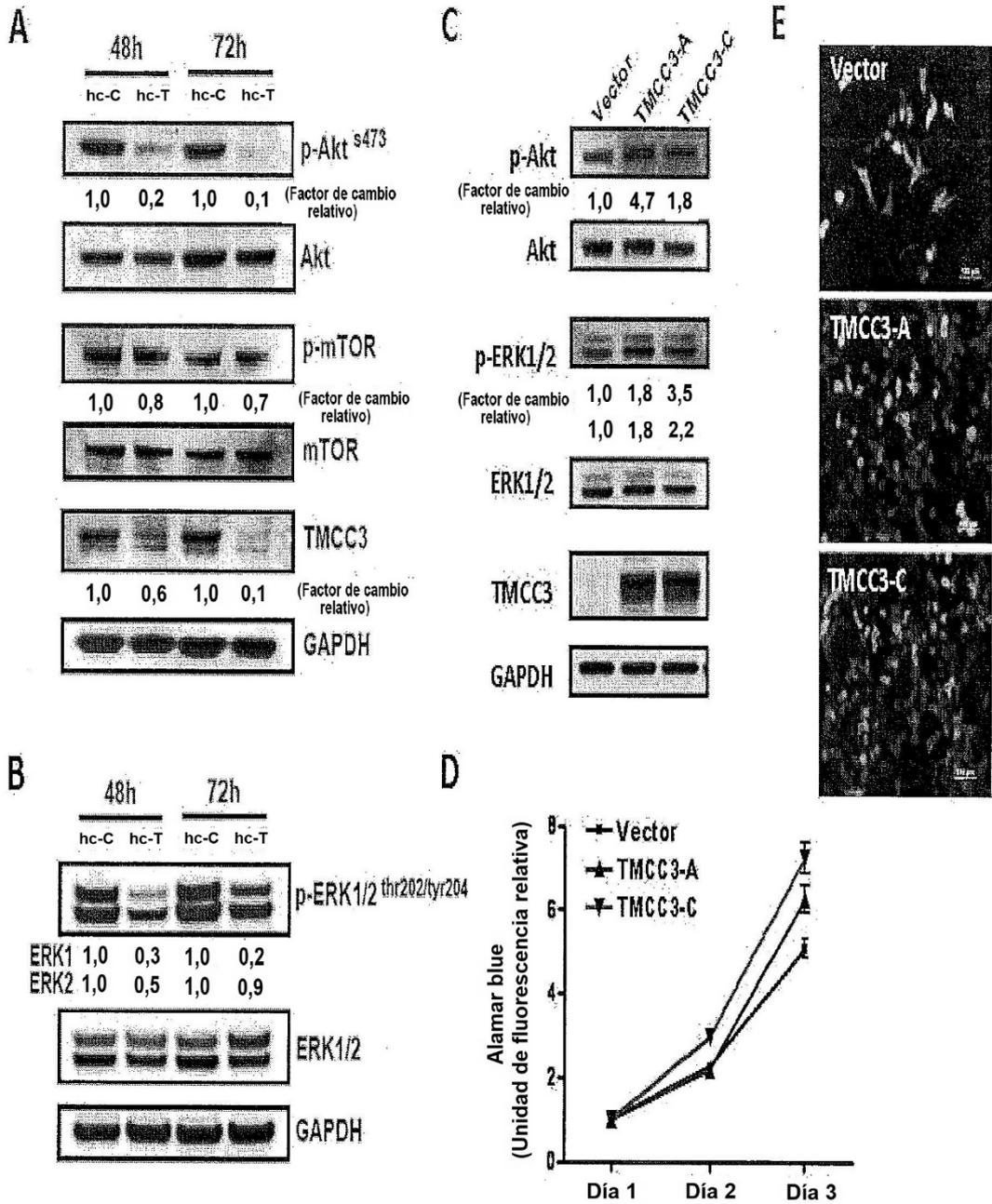
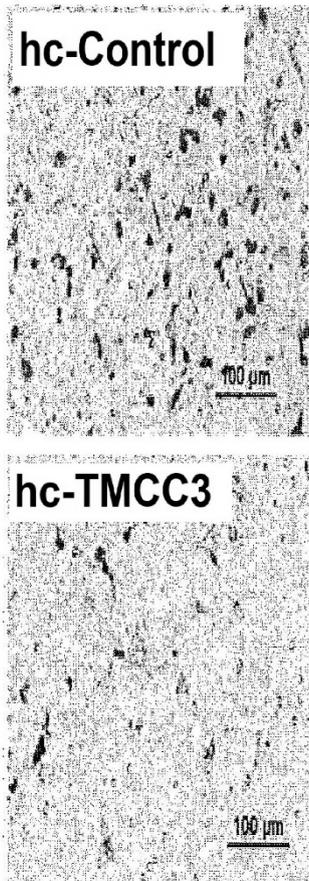


Figura 5

A



B

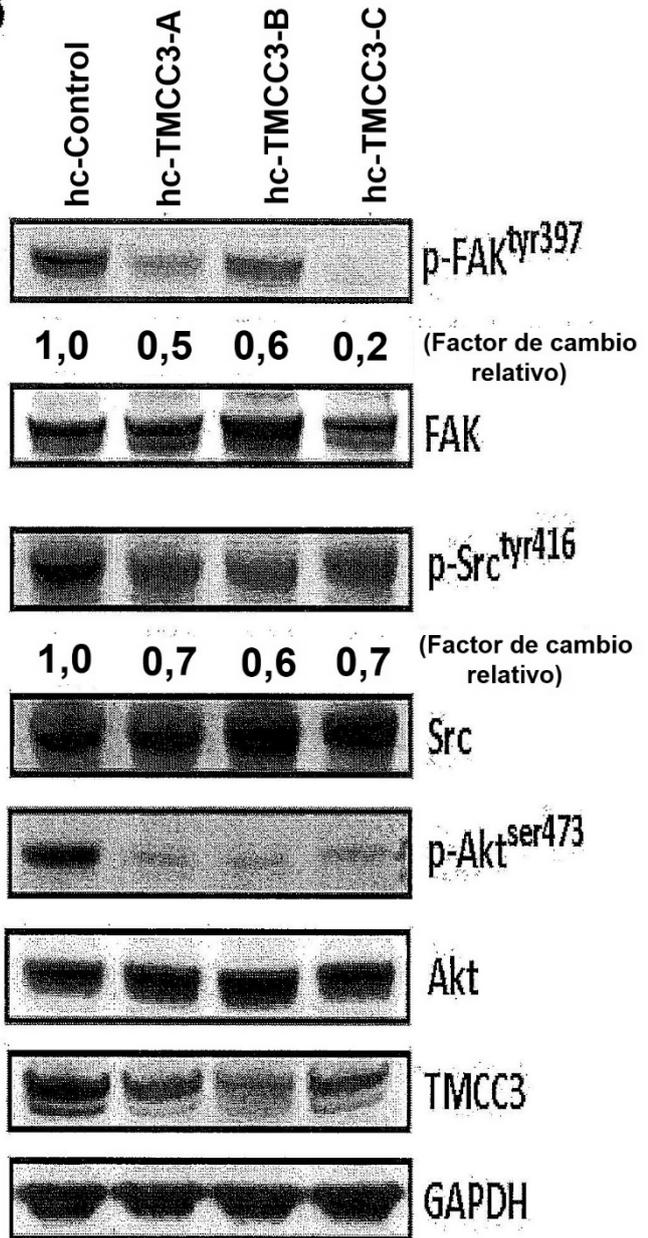
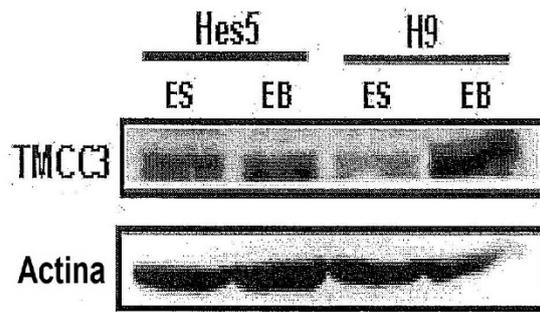


Figura 6

**A**



**B**

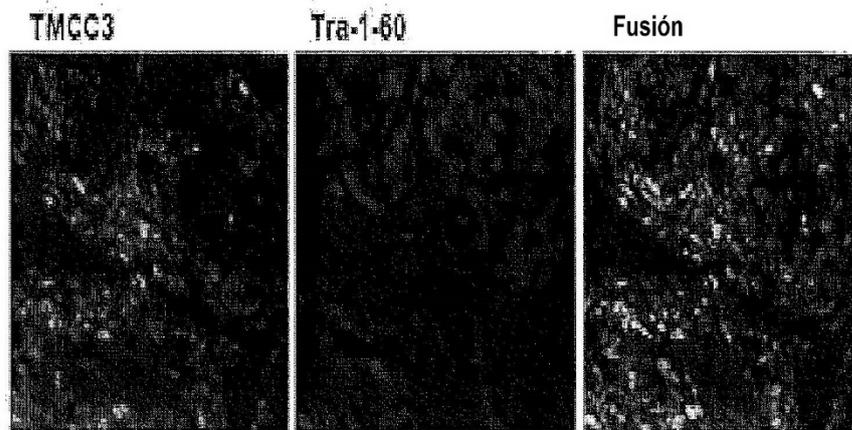


Figura 7

Probable estructura secundaria de TMCC3 y construcciones de TMCC3

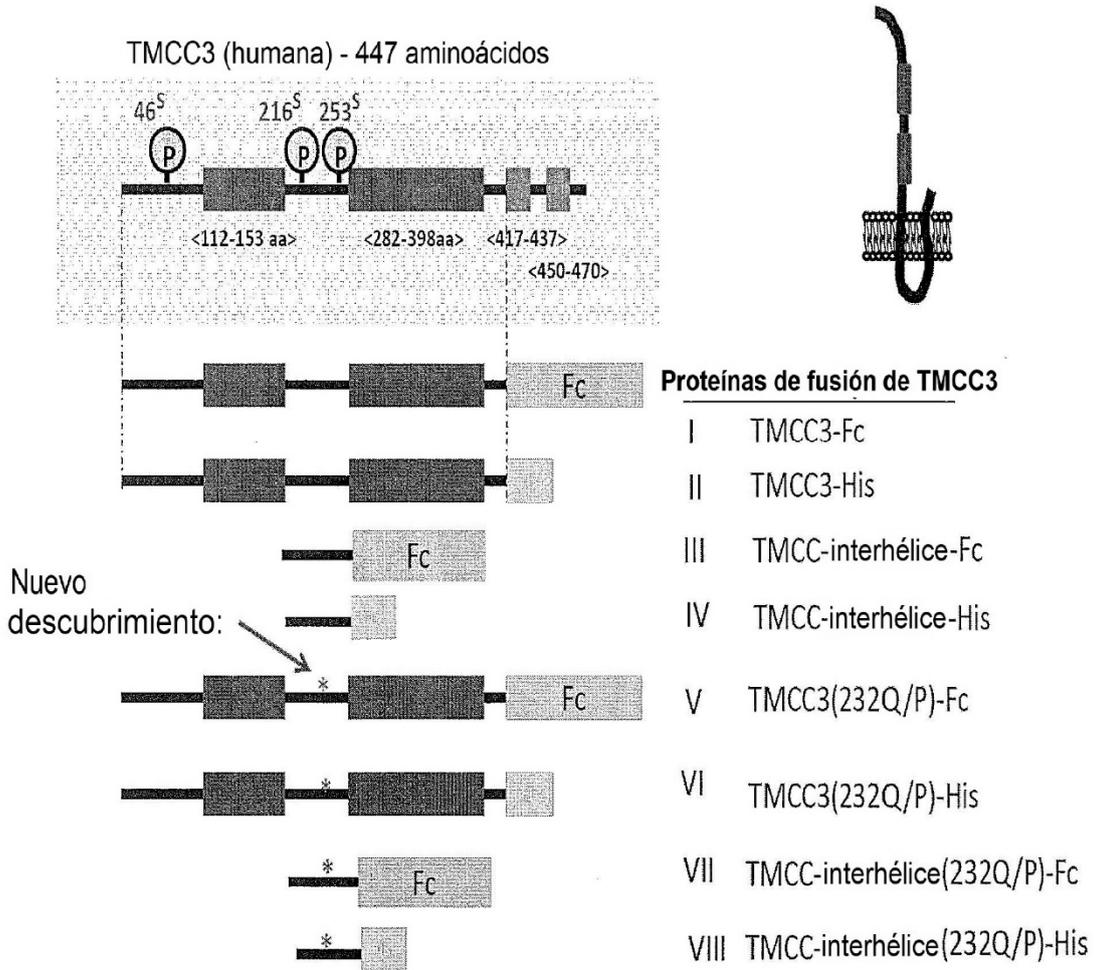
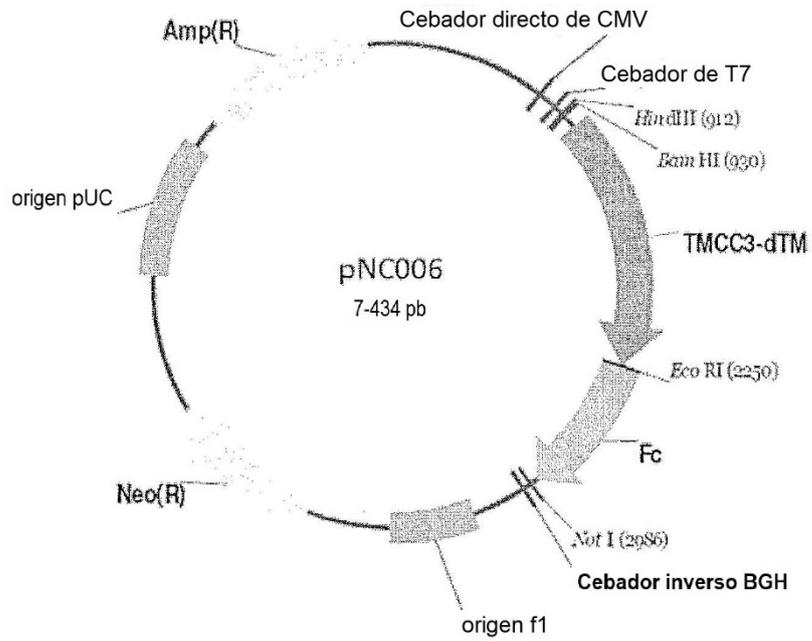


Figura 8

### Mapa de TMCC3 $\Delta$ TM-Fc



### Mapa de TMCC3-interhélice-Fc

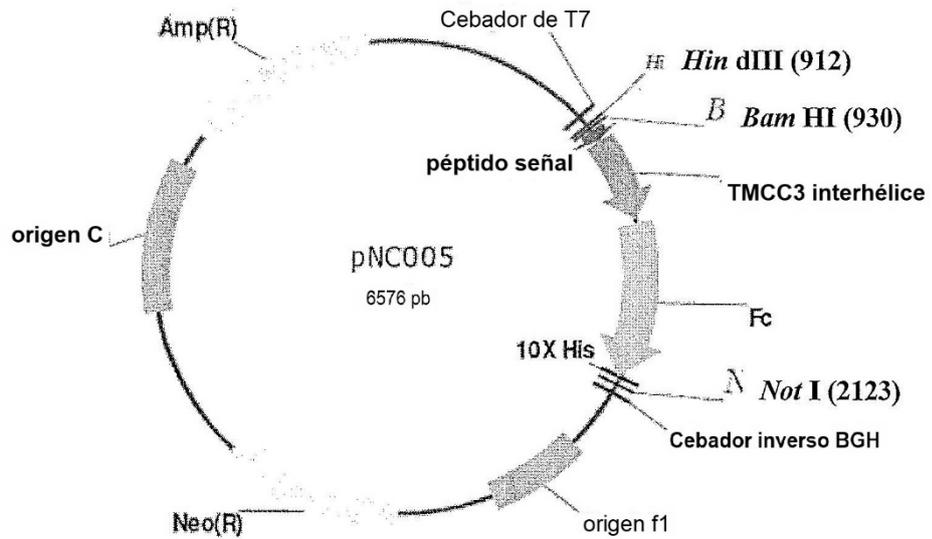


Figura 9

Fuentes:

Inmunización con ratones con  
TMCC3 o un fragmento de la misma

Formatos  
de biblioteca:

Fab Lib

(1,02X10<sup>9</sup>)

ADNc

scFv Lib

(3,12X10<sup>9</sup>)

Métodos de cribado:

KO7

DynaBeads

placa ELISA

Clonación y expresión

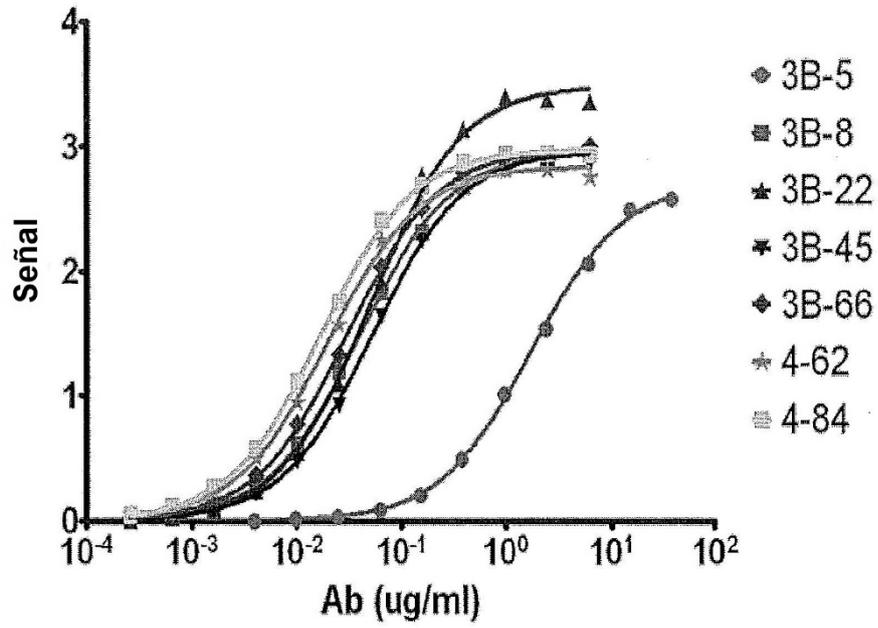
Figura 10

Resultado de la 2ª ELISA del fago (título del fago calibrado)

	TMCC3-Interhélíce-FC					R2-FC					UFP/ml
	1,5E+12	3,0E+11	6,0E+10	1,2E+10	2,4E+09	1,5E+12	3,0E+11	6,0E+10	1,2E+10	2,4E+09	
3B-5	2,875	2,957	2,289	0,822	0,273	0,017	0,016	0,006	0,027	0	
3B-8	2,889	3,12	2,75	1,617	0,495	0,008	0,001	-0,006	-0,015	-0,027	
X 3B-12	3,122	3,127	2,731	1,264	0,352	2,412	1,773	0,903	0,273	0,041	
3B-22	3,016	2,958	2,853	1,982	0,667	0,054	0,025	0,018	0,016	0,017	
3B-45	3,026	2,942	2,347	0,942	0,287	0,013	0,01	0,004	0,002	0,002	
3B-65	2,519	1,51	0,425	0,139	0,064	0,145	0,037	0,023	0,02	0,02	
3B-66	3,046	3,049	2,594	1,59	0,467	0,015	0,015	0,01	0,01	0,005	
4-62	2,956	3,066	2,787	1,691	0,565	0,017	0,002	-0,008	-0,012	-0,009	
X 4-65	2,98	3,036	2,779	1,853	0,63	1	0,129	0,038	0,026	0,026	
4-84	3,096	3,091	2,91	2,266	0,898	0,036	0,016	0,007	0,008	0,003	
X 4-87	2,964	3,11	2,826	2,252	0,92	2,82	2,265	0,996	0,311	0,084	
X 3B-94D	2,73	2,505	1,714	0,687	0,223	1,933	1,354	0,547	0,145	0,018	
X 4A-85	2,628	2,623	2,524	1,664	0,668	2,318	2,163	1,574	0,762	0,175	

Figura 11

Curva de unión de TMCC3 interhélice-Fc-10His de anticuerpos quiméricos purificados de longitud total



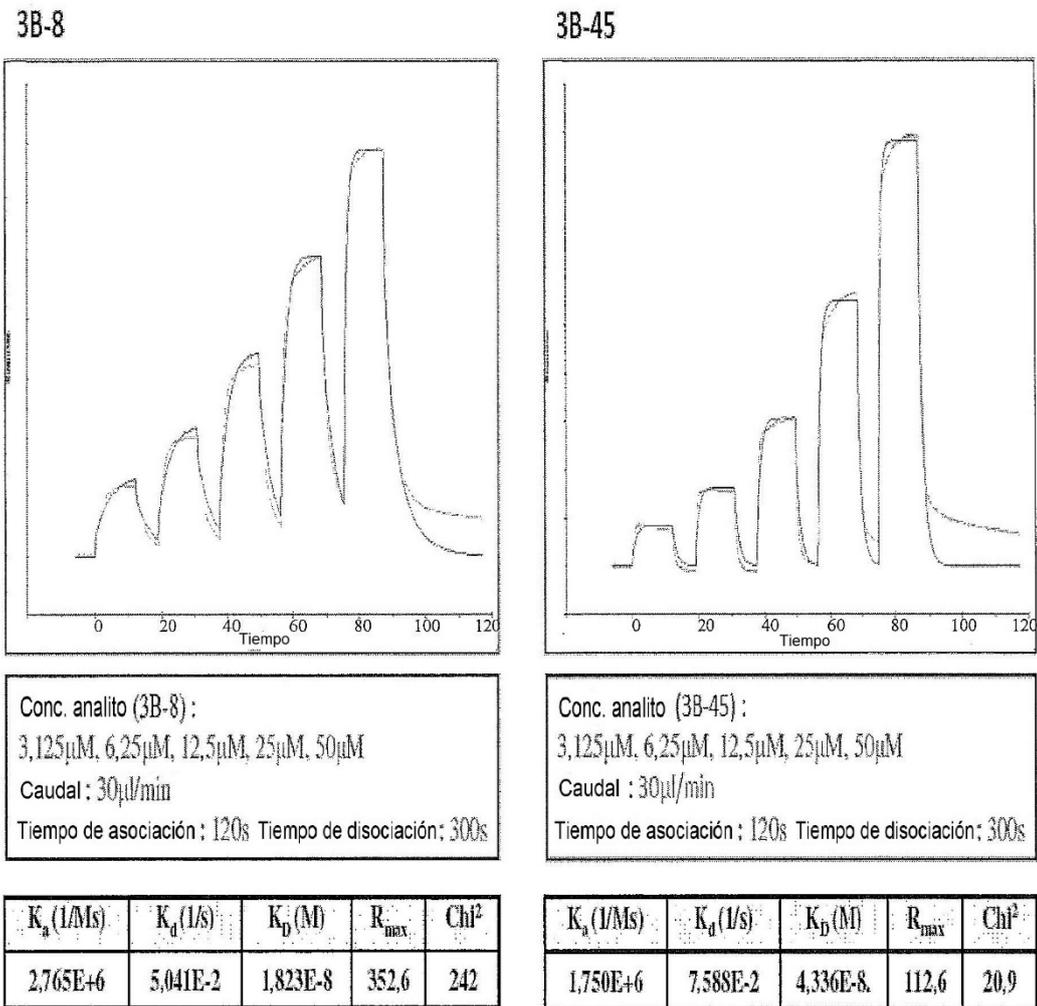
	3B-5	3B-8	3B-22	3B-45	3B-66	4-62	4-84
$K_D$ (M)	1,17E-08	2,65E-10	3,42E-10	3,51E-10	2,03E-10	1,31E-10	1,13E-10

Figura 12A

Ensayo cinético de ciclo único de los anticuerpos anti-TMCC3

TMCC3 interhélice-Fc-10His inmov. 900RU ,PH5,5

Concentración de analito: 50nM, 25nM, 12,5nM, 6,25nM, 3,125nM



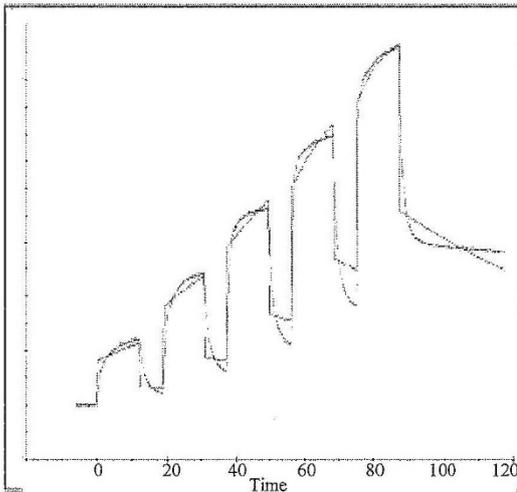
**Figura 12B**

**Ensayo cinético de ciclo único de los anticuerpos anti-TMCC3**

TMCC3 interhélice-Fc-10His inmov. 200RU, PH5,5

Concentración de analito; 100nM, 50nM, 25nM, 12,5nM, 6,25nM

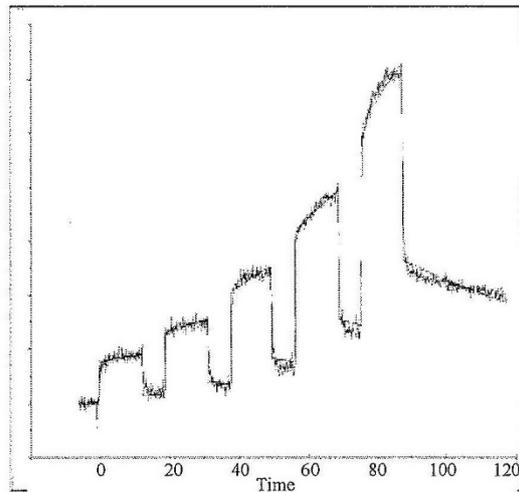
**3B-8**



Conc. analito (3B-8):  
6,25µM, 12,5µM, 25µM, 50µM, 100µM  
Caudal : 30µl/min  
Tiempo de asociación : 120s Tiempo de disociación: 300s

$K_a$ (1/Ms)	$K_d$ (1/s)	$K_D$ (M)	$R_{max}$	$\chi^2$
1,172E+5	1,235E-3	1,053E-8	43,05	12,9

**3B-45**



Conc. analito (3B-45):  
6,25µM, 12,5µM, 25µM, 50µM, 100µM  
Caudal : 30µl/min  
Tiempo de asociación : 120s Tiempo de disociación: 300s

$K_a$ (1/Ms)	$K_d$ (1/s)	$K_D$ (M)	$R_{max}$	$\chi^2$
3,800E+4	1,166E-3	3,068E-8	10,76	0,193

Figura 13

## Análisis cinético SPR (Biacore) de los anticuerpos quiméricos anti-TMCC3 de longitud completa

TMCC3 interhélice-Fc-10His inmov. 200RU

Concentración de analito: 100nM, 50nM, 25nM, 12,5nM, 6,25nM

	$K_a$ (1/Ms)	$K_d$ (1/s)	$K_D$ (M)	$R_{max}$	Chi <sup>2</sup>
3B-5	9,747E+3	8,550E-4	8,772E-7	287,4	0,728
3B-8	1,172E+5	1,235E-3	1,053E-8	43,05	12,9
3B-22	5,713E+4	1,333E-3	2,334E-8	19,35	0,81
3B-45	3,800E+4	1,166E-3	3,068E-8	10,76	0,193
3B-66	1,046E+5	2,404E-3	2,299E-8	9,844	0,396
4-62	6,782E+5	1,079E-3	1,591E-9	117,4	18,5
4-84	-	-	-	-	-

**Figura 14**

**Cartografía de epítomos de mAb quiméricos específicos de TMCC3**

	3B-5	3B-8	3B-22	3B-45	3B-66	4-62	4-84
Reconocimiento de Tic1-128	+	+	+++	+	+++	+++	++
Reconocimiento de Tic1-30	-	-	+++	-	+	-	+
Reconocimiento de Tic25-55	-	-	-	-	-	+	-
Reconocimiento de Tic50-80	-	-	-	-	-	-	-
Reconocimiento de Tic75-105	-	-	-	-	-	-	-
Reconocimiento de Tic100-128	-	-	-	-	-	-	-
Reconocimiento de Tic1-67	-	-	+++	++	+++	+	+++
Reconocimiento de Tic62-128	-	-	-	-	-	-	-

<b>Tic1-30</b>	DISKDHLKDIHRSLKDAHVKSRRTAPHCMES (SEQ ID NO: 19)
<b>Tic25-55</b>	PHCMESKSGMPGVSLTPPVFVFNKSREFAN (SEQ ID NO: 7)
<b>Tic50-80</b>	SREFANLIRNKFGSADNIAHLKNSLEEFRPE (SEQ ID NO: 8)
<b>Tic75-105</b>	EEFRPEASARAYGGSATIVNPKYGSDDCECS (SEQ ID NO: 9)
<b>Tic100-128</b>	SDDECSSGTSGSADSNQSFAGGASTL (SEQ ID NO: 10)
<b>Tic1-67</b>	DISKDHLKDIHRSLKDAHVKSRRTAPHCMESSKSGMPGVSLTPPVFVFNKSREFANLIRNKFGSADNI (SEQ ID NO: 11)
<b>Tic62-128</b>	GSADNIAHLKNSLEEFRPEASARAYGGSATIVNPKYGSDDDECSSGTSGSADSNQSFAGGASTL (SEQ ID NO: 12)

Figura 15

Ensayo de unión de líneas celulares que expresan TMCC3

AS-B634 (p15)

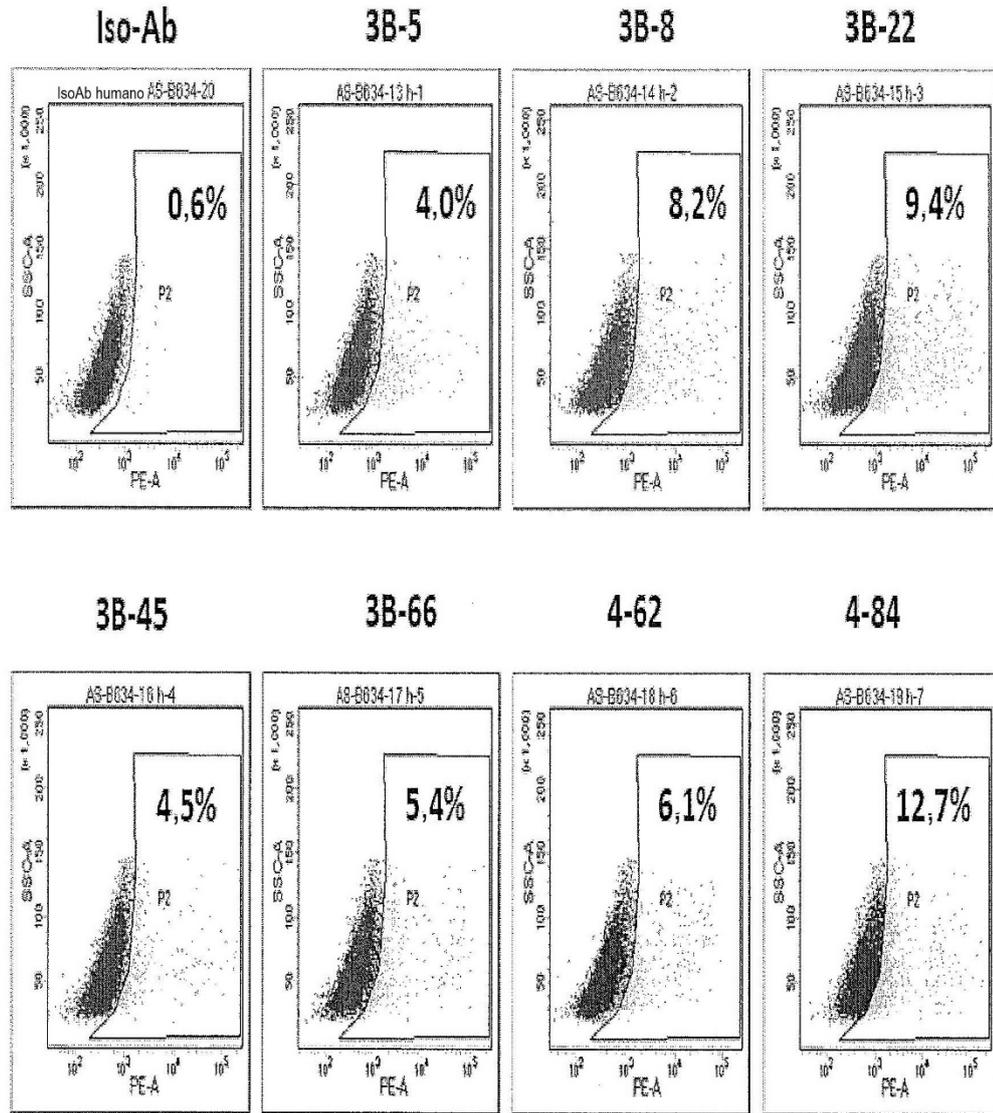


Figura 16

Ensayo de unión de líneas celulares que expresan TMCC3  
**MDA-MB231** (triple negativo, muy invasivas y metastásicas)

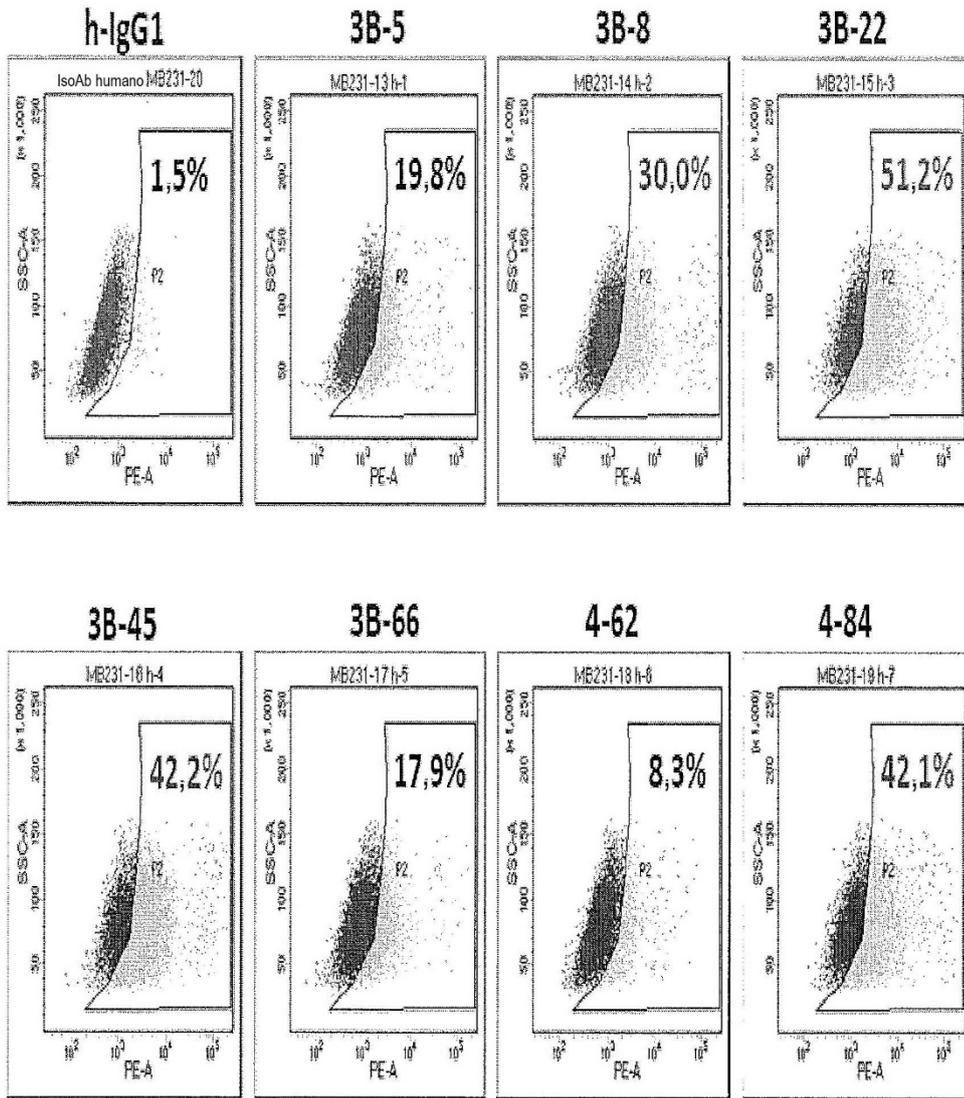
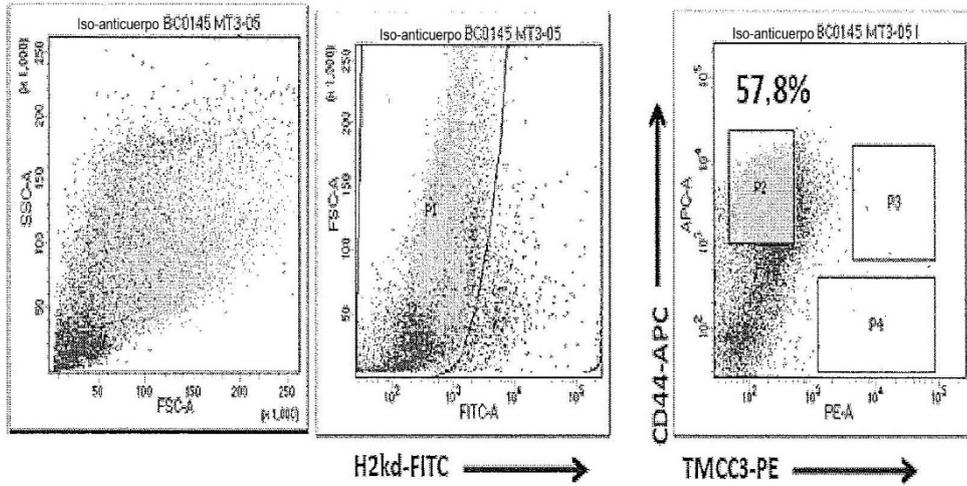


Figura 17

Reconocimiento de mAb anti-enlazador de hélice de TMCC3 en BCSC humanas (del paciente N.º BC0145).

Isotipo control



(3B-45)

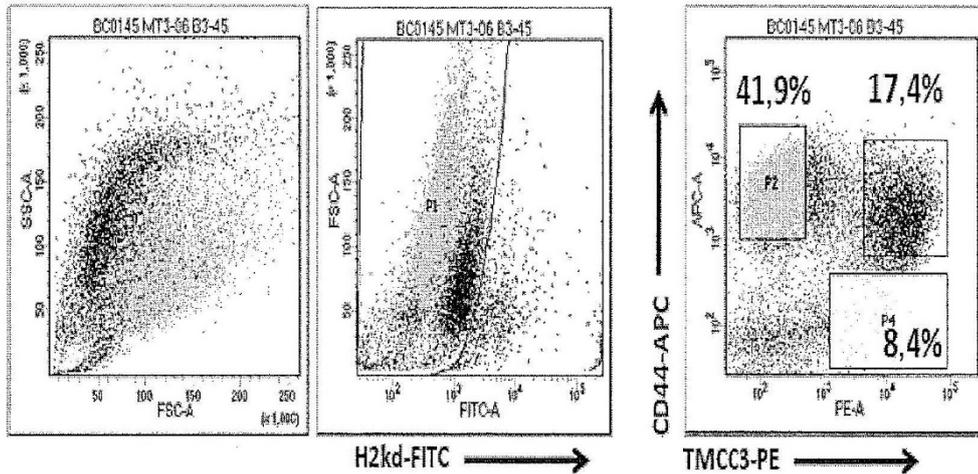


Figura 18

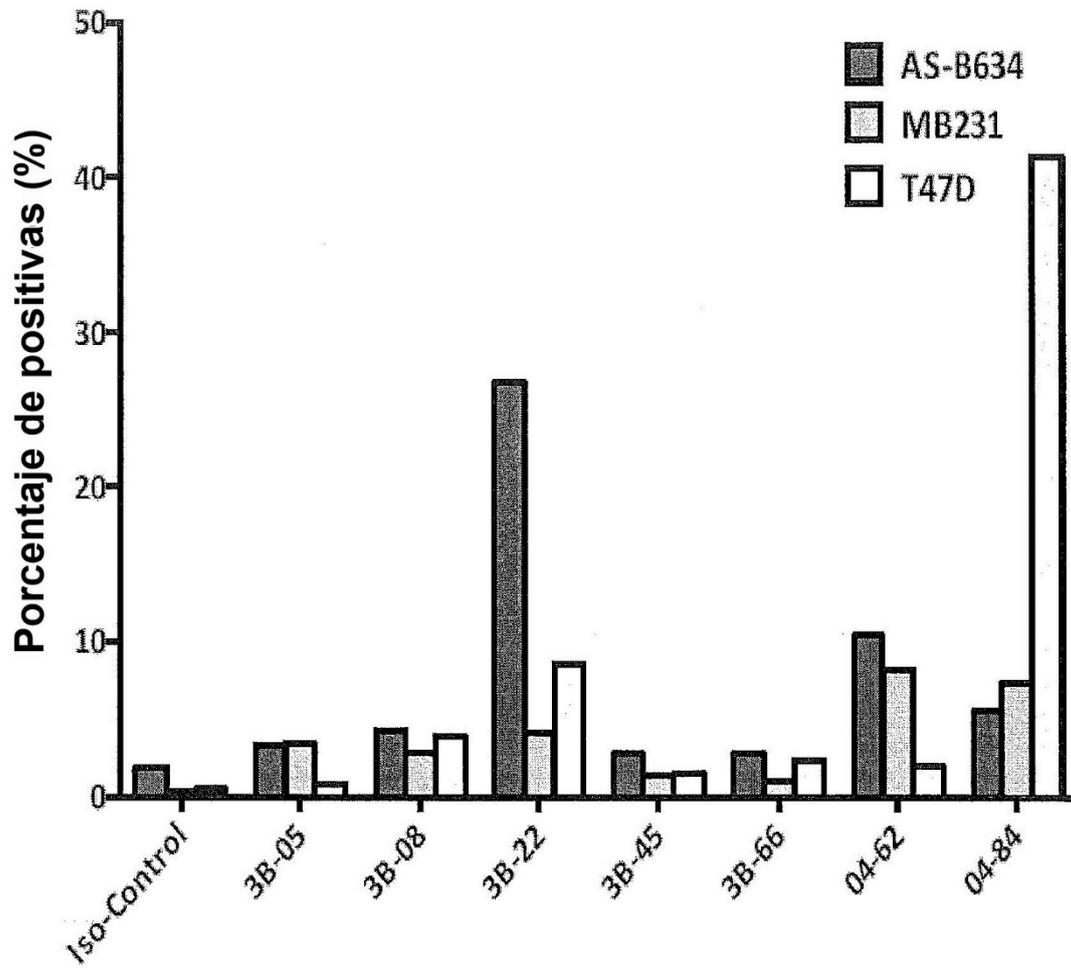


Figura 19

# Línea celular de cáncer de próstata

PC3

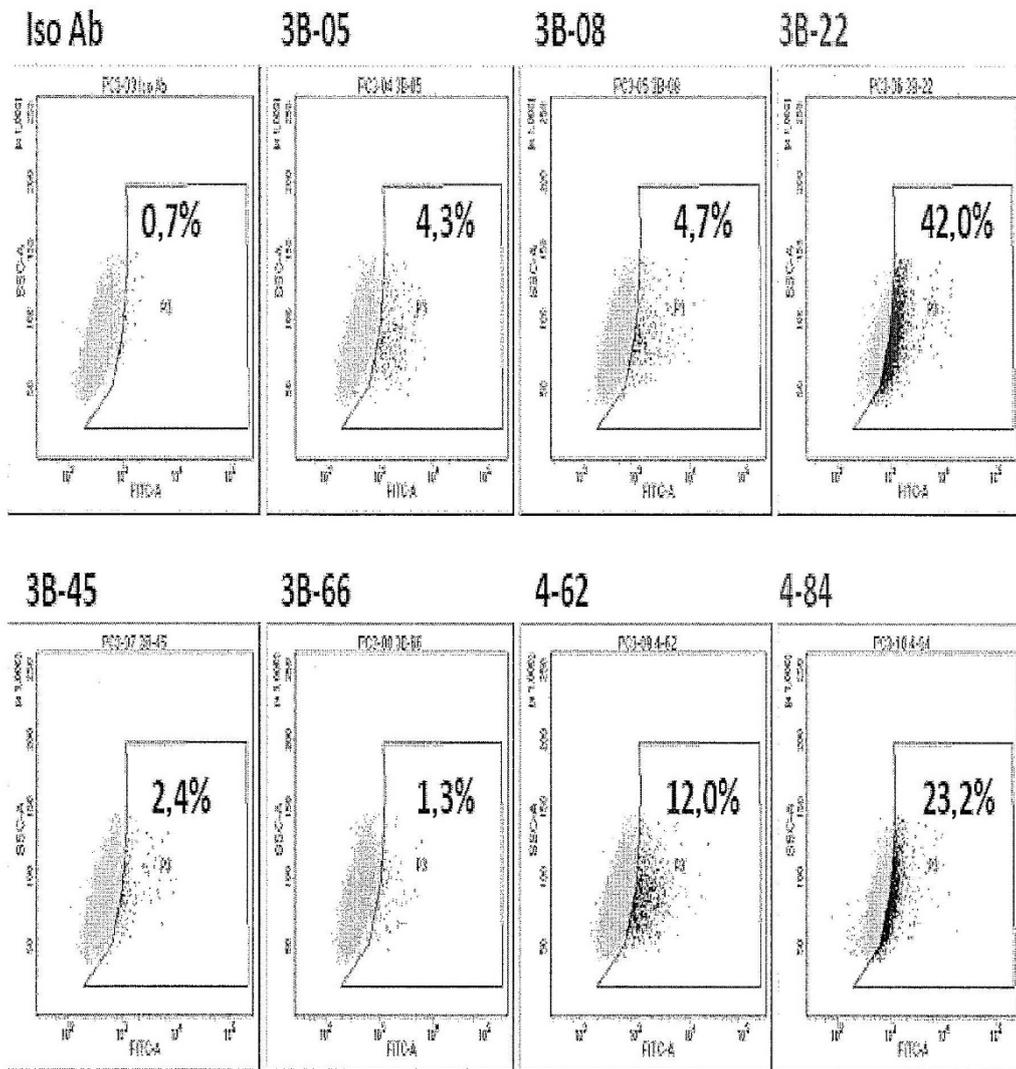


Figura 20

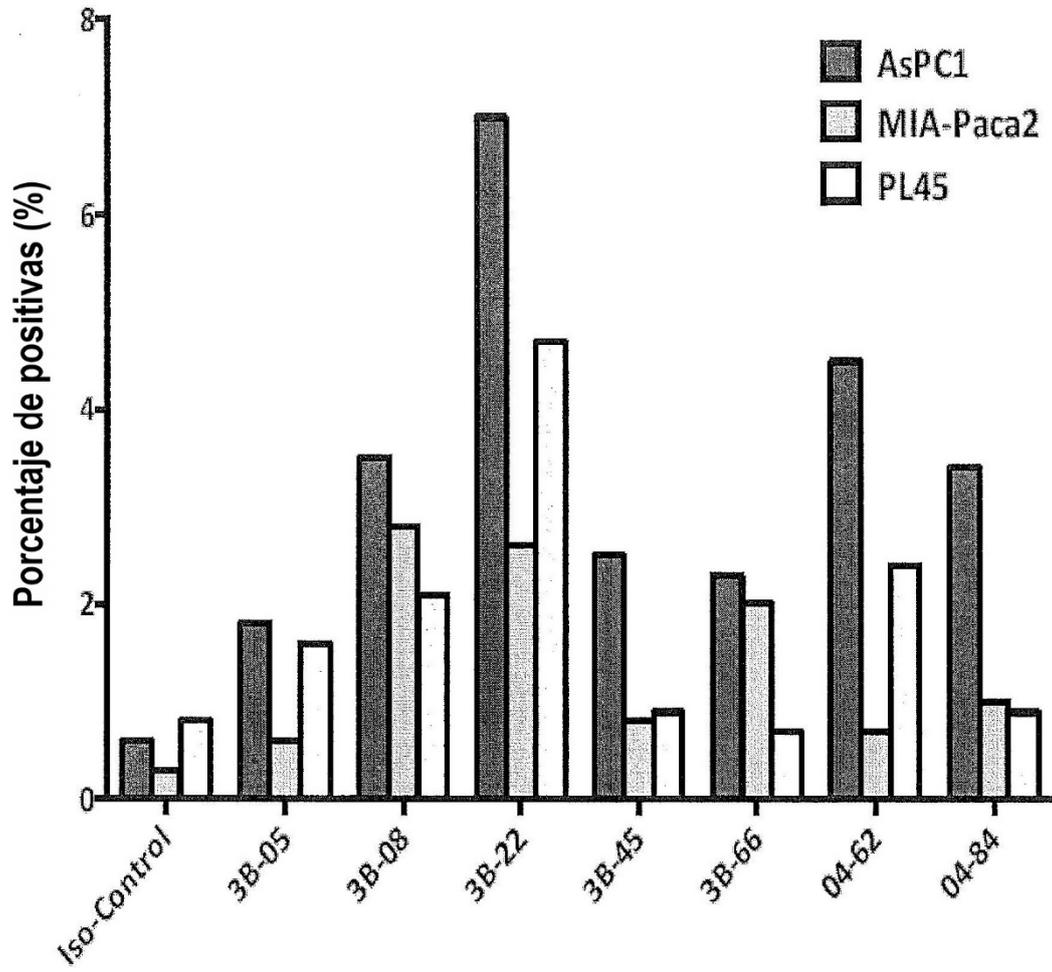


Figura 21

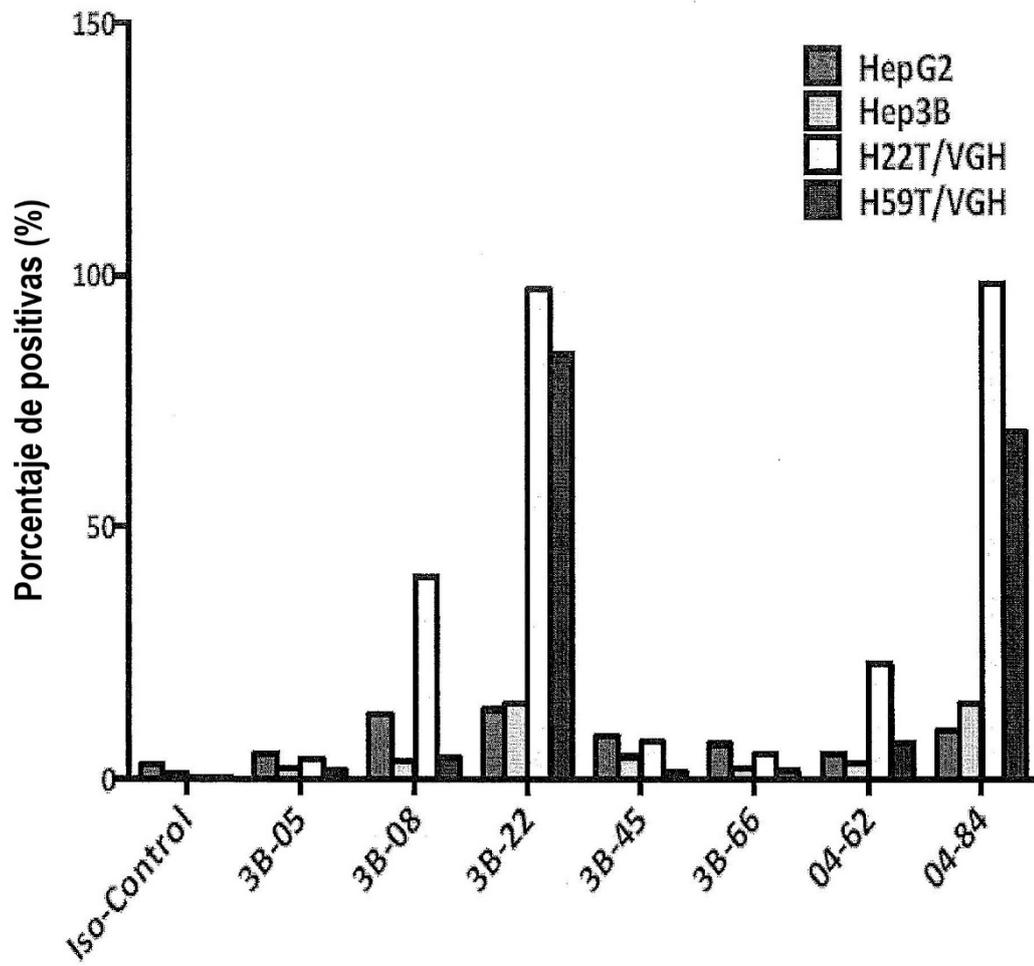


Figura 22

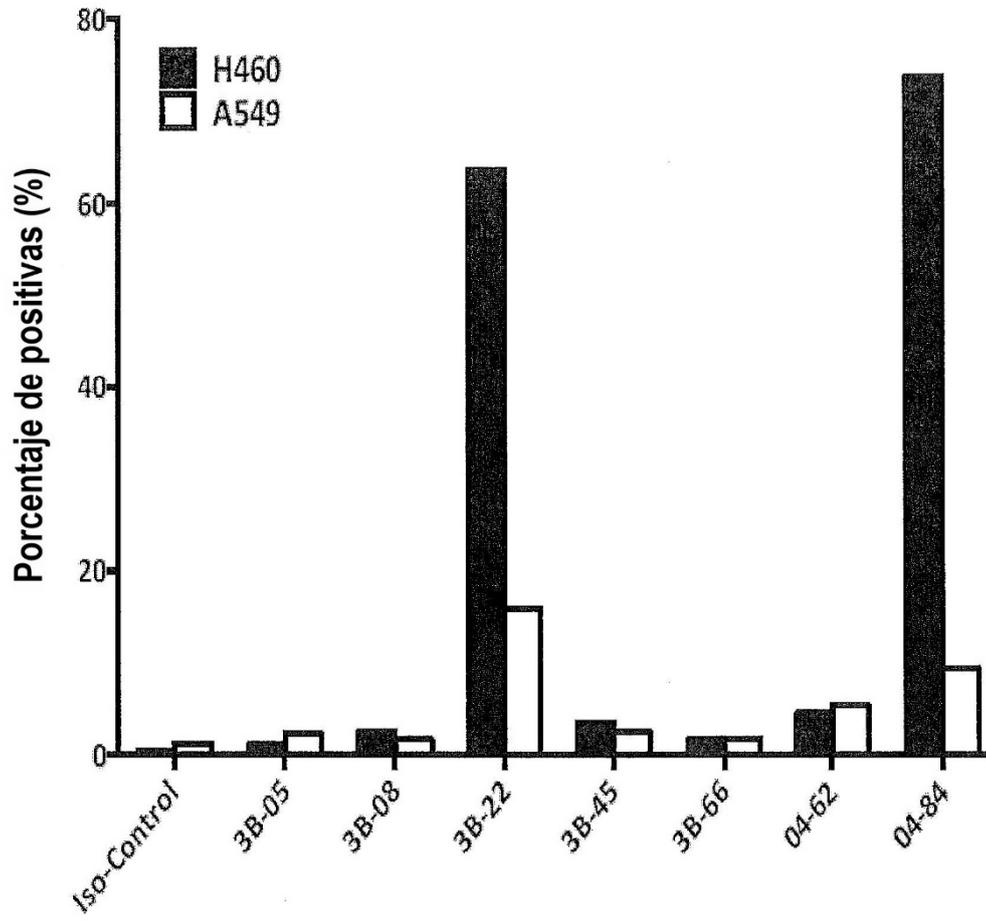


Figura 23

Xenoinjerto tumoral de cáncer de mama (BC0244)

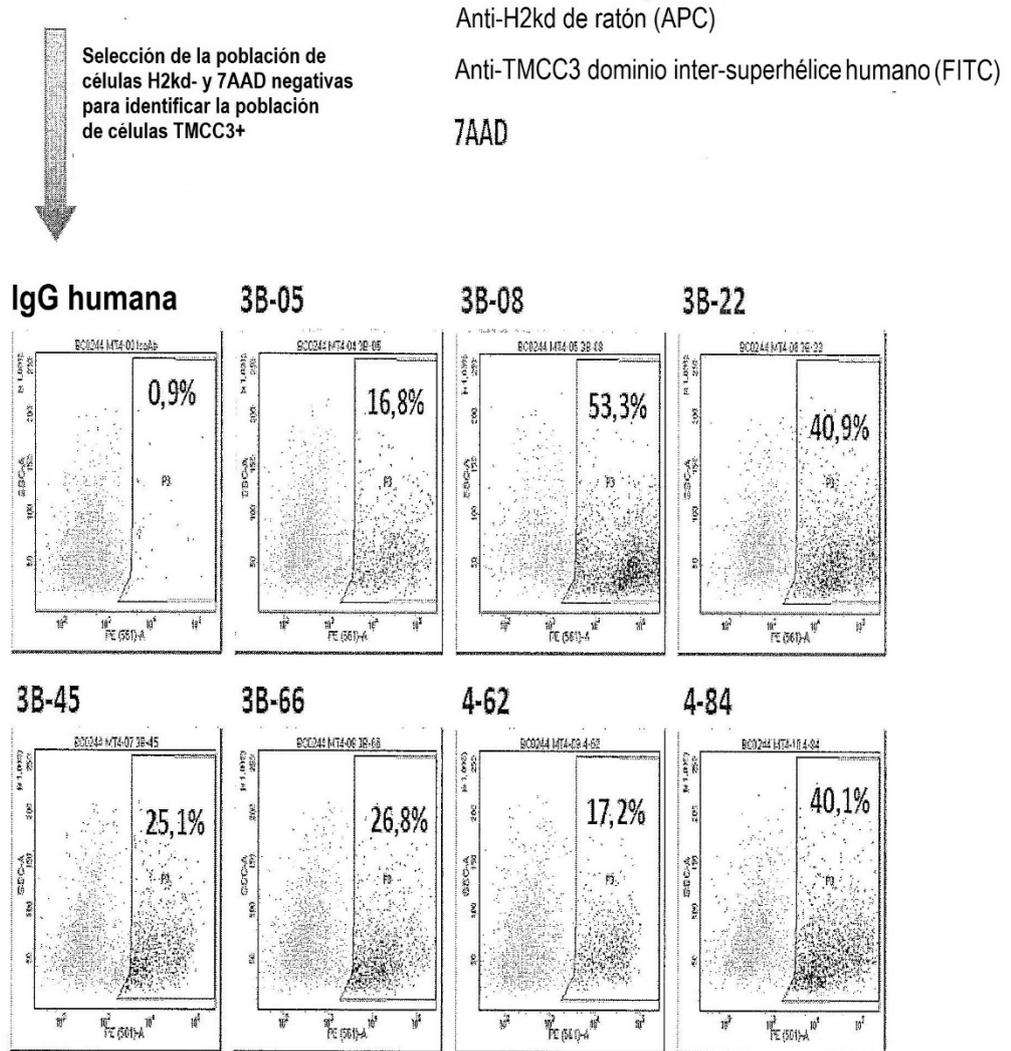


Figura 24

**Xenoinjerto tumoral de cáncer de mama (BC0145)**

anti-H2kd-FITC

anti-CD44-APC

Anti-TMCC3 dominio inter-superhélice humano (PE)



Selección de la población de células H2kd- y 7AAD negativas para identificar la población de células TMCC3+

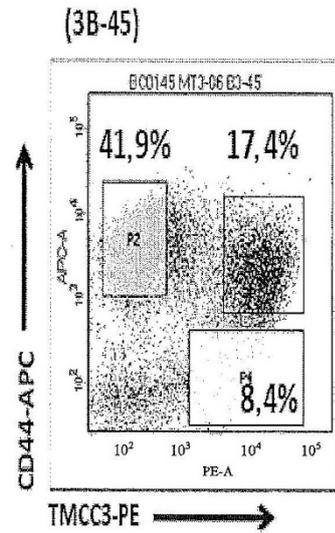
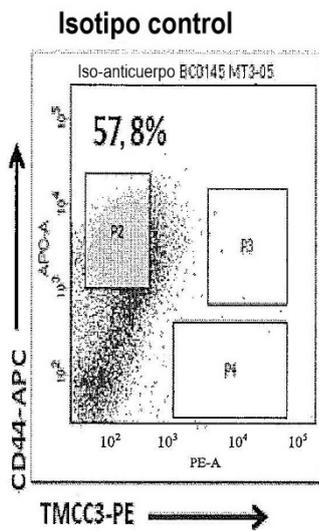


Figura 25

Xenoinjerto tumoral de cáncer pancreático (PC038)

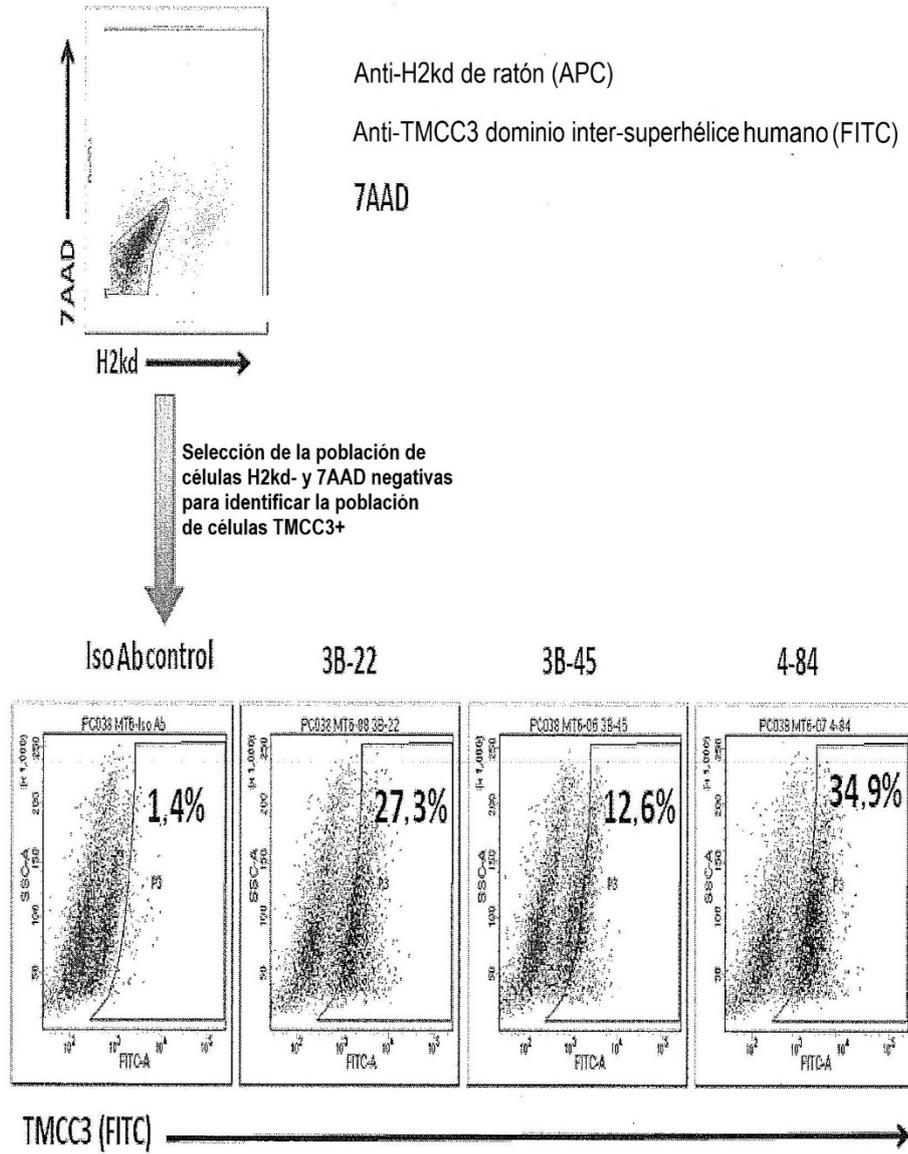
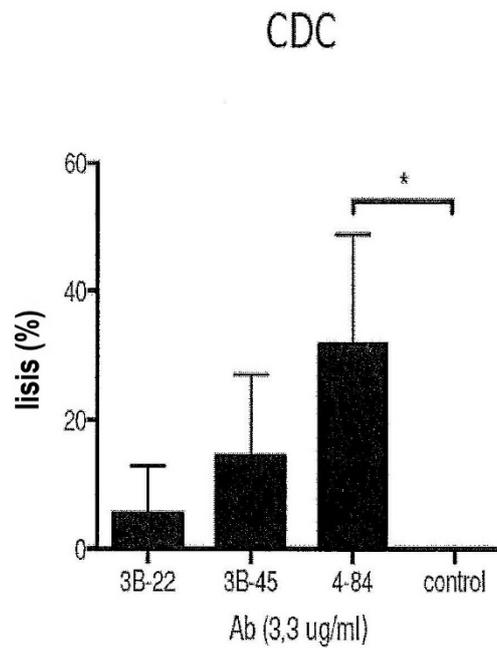


Figura 26

Actividades CDC de anti-TMCC3 en la línea celular de cáncer mama MDA-MB231



\* P = 0,03 por ANOVA unilateral y prueba de comparaciones múltiples de Tukey

Figura 27

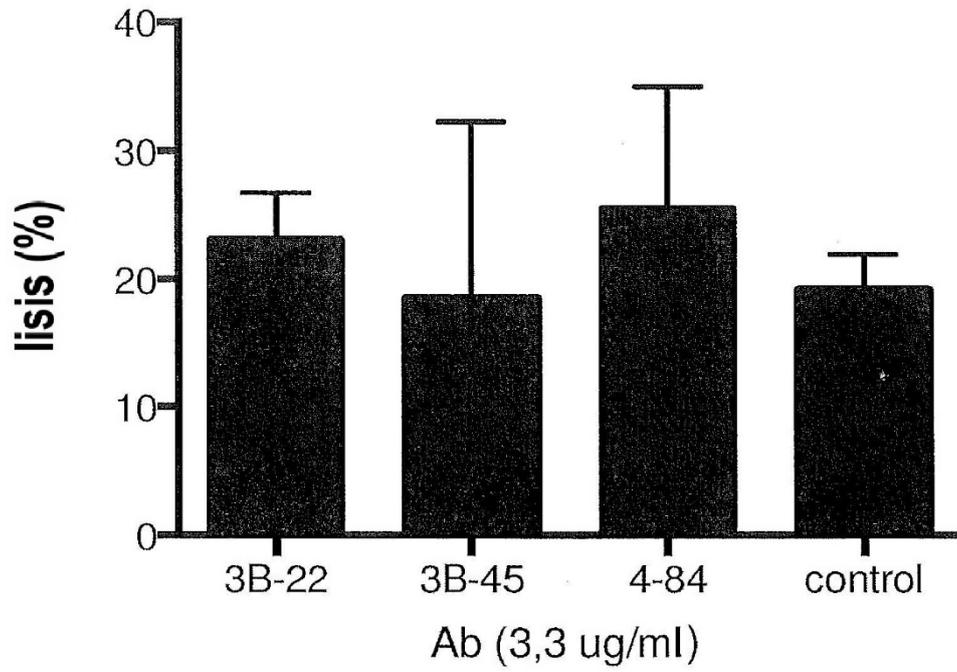


Figura 28

BC0145 MT3

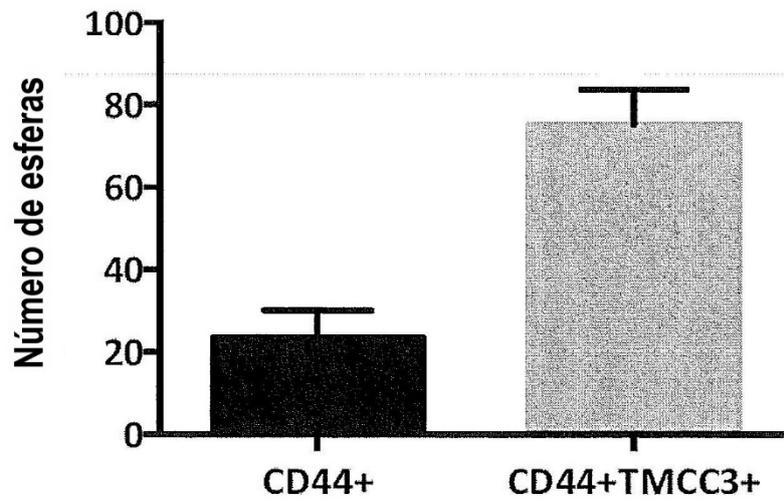


Figura 29

Reconocimiento	nombre del clon	CDRH1	SEQ ID NO	CDRH2	SEQ ID NO	CDRH3	SEQ ID NO	CDRL1	SEQ ID NO	CDRL2	SEQ ID NO	CDRL3	SEQ ID NO
Interhélice	C4F1-27	GFN1KDYMH	20	WIDPENGNTLYDPKFDG	144	AKYDANDY	268	SASSSSISSNYLH	392	RTSNLAS	516	QQGSSIPFT	646
Interhélice	Hy1C-E3	GFN1KDTYMH	21	WIDPENGDTIYAPKFDG	145	AWGEKDY	269	SASSSSISSNYLH	393	RTSNLAS	517	QQWSSYPLT	641
Interhélice	Hy2-F3	GFN1RDYYIH	22	WIDPENGDTIYAPKFDG	146	DDYAMDY	270	RASESVEYGTSLMQ	394	AASNVES	518	QQSRKYPWT	642
Interhélice	Hy1G-G11	GYFSYVYIH	23	RIYPGTGTIYNEKFKG	147	DESGFAY	271	RASESVEYVYV	395	DI SNLAS	519	QQWNYPFT	643
Interhélice	Hy1E-A5	GYFTSYVMH	24	RIYPGTGTIYNEKFKG	148	DESGFTY	272	SASSSYTYVY	396	DI SNLAS	520	QQWNYPFT	644
Interhélice	Hy2-B12	GYFTSYVMH	25	VIDFSDSYTYNGKFKG	149	DGRYAMDY	273	SASSSYTYVY	397	DI SNLAS	521	QQWSSYPT	645
Helice1	N3P5-28	GFTFDDYAMH	26	LISDGGSTIYSDSVKGG	150	DIGSGAYSSGHVLAFDI	274	GGDNIGYGVY	398	DDSRPPS	522	QQWSSSDQVI	646
Helice1	N3-5	GFTFDDYAMH	27	GISWNGSISYADSVG	151	DGSGYYDSGSDY	275	RASQSI SGNLA	399	GASTRAT	523	QQFNNPPT	647
Interhélice	Hy2-D5	GFN1KDYMH	28	WIDPENGDTIYAPKFDG	152	DYAMDY	276	SASSSVSSSYLY	400	DTSNLAS	524	QQWSSNPPT	648
Interhélice	Hy2-A9	GFN1RDYYIH	29	WIDPENGDTIYAPKFDG	153	DYAMDY	277	RASESVEYGTSLMQ	401	AASNVES	525	QQSRKYPWT	649
Interhélice	3B-45	GFN1KDTYMH	30	WIDPENGNTLYDPKFDG	154	EYAMDY	278	RASESVEYGTSLMQ	402	AASNVES	526	QQSRKYPWT	650
Interhélice	Hy2-H3	GFN1KDYMH	31	WIDPENGNTLYDPKFDG	155	EYAMDY	279	RASESVEYGTSLMQ	403	AASNVES	527	QQSRKYPWT	651
Interhélice	Hy1G-B8	GYFSGYVIV	32	EILPSSGRTIYNEKFKG	156	GAARATFYALDY	280	SVSSSI SSSNLH	404	DTSNLAS	528	FOGSGYPLT	652
Interhélice	Hy2-A3	GFN1KDTYMH	33	WIDPENGNTLYDPKFDG	157	GATRAMDY	281	SASSSVSYMY	405	DTSNLAS	529	QQWSSYPLT	653
Interhélice	Hy2-H1	GFN1KDTYMH	34	RI DPANGNTKYDPKFDG	158	GDFYAMDY	282	SASSSVSYMY	406	DTSNLAS	530	QQWSSYPLT	654
Interhélice	4-62	GFN1KDTYMH	35	RI DPANGNTKYDPKFDG	159	GDFYAMDY	283	RASSSVNYMY	407	YTSNAP	531	FOGSGYPT	655
Interhélice	Hy2-E11	GFN1KDTYMH	36	RI DPANGNTKYDPKFDG	160	GDFYAMDY	284	RASSSVNYMY	408	YTSNAP	532	FOGSGYPT	656
Interhélice	Hy2-B9	GFN1KDTYMH	37	RI DPANGNTKYDPKFDG	161	GDFYAMDY	285	SASSSVSYMY	409	YTSNAP	533	QQFTSSPT	657
Interhélice	Hy2-A10	GFN1KDTYMH	38	RI DPANGNTKYDPKFDG	162	GDFYAMDY	286	SASSSVSYMY	410	DTSNLAS	534	QQWSSNPPT	658
Interhélice	Hy1C-D10	GFN1KDTYMH	39	RI DPANGNTKYDPKFDG	163	GDFYAMDY	287	SASSSVYIY	411	DTSNLAS	535	QQWSSYPLT	659
Interhélice	3B-8	GFN1KDTYMH	40	WIDPENGNTLYDPKFDG	164	GDFYAMDY	288	RASSSVSSSYLH	412	DTSNLAS	536	QQYSGYPLT	660
Helice1	N5-2	GFTFSSYAMT	41	AISDSGGRTIYADSVKGG	165	GGMDY	289	RSQSLVFSQGNITYLH	413	KVSTRDS	537	MDALQPPYT	661
Interhélice	3B-5	GFN1KDTYMH	42	WIDPENGNTLYDPKFDG	166	GGYAMDY	290	SASSSVSYMY	414	DTSNLAS	538	QQYSGYPLT	662
Interhélice	Hy2-C12	GFN1KDTYMH	43	WIDPENGNTLYDPKFDG	167	GGYAMDY	291	RASSSVSSSYLH	415	DTSNLAS	539	QQYSGYPLT	663
Interhélice	Hy2-B8	GFN1KDTYMH	44	RI DPANGNTKYDPKFDG	168	GNVYAMDY	292	RASSSVNYMY	416	YTSNAP	540	QQWNYPPLT	664
Interhélice	Hy1A-B10	GFN1KDTYMH	45	RI DPANGNTKYDPKFDG	169	GTAAY	293	RASSSVSYMY	417	DTSNLAS	541	QQWSSYPT	665
Interhélice	Hy1E-E10	GYFSNYVLE	46	EILPSSGRTIYNEKFKG	170	GTAARATFFAIDY	294	TASSSVSSSYLH	418	DTSNLAS	542	HQYHRSPT	666
Interhélice	Hy1-D9	GFN1KDTYMH	47	WIDPENGDTIYAPKFDG	171	GYAMDY	295	SASSSVSYMH	419	DTSNLAS	543	HQYHRSPT	667
Interhélice	Hy2-C2	GYFTSYVIT	48	WIDPENGDTIYAPKFDG	172	LDY	296	SVSSSI SSSNLH	420	DTSNLAS	544	HQYHRSPT	668
Helice1	N3A4-1	GYFTSYVIT	49	WISAYSGNTIYAPKFDG	173	LGEEEDLY	297	SGSSSDIGNNVYS	421	DNDORPS	545	GTWSSSLAVYV	669
Interhélice	Hy1G-D11	GFN1KDTYMH	50	WIDPENGDTIYAPKFDG	174	LSNGSAMIYAF	298	RASSSVSYMH	422	DTSNLAS	546	QQWSSYPLT	670
Interhélice	3B-66	GFN1KDTYMH	51	WIDPENGDTIYAPKFDG	175	LSNGSAMIY	299	SASSSVSYMY	423	DTSNLAS	547	QQWSSYPLT	671
Interhélice	Hy1A-F11	GFN1KDYIYH	52	WIDPENGDTIYAPKFDG	176	LSNGSAMIY	300	SASSSVSYMY	424	DTSNLAS	548	QQWSSYPLT	672
Interhélice	Hy2-H2	GFN1KDTYMH	53	WIDPENGDTIYAPKFDG	177	LSNGSAMIY	301	SASSSVSYMY	425	DTSNLAS	549	QQWSSYPT	673
Interhélice	Hy1C-C8	GMN1KDTYIH	54	WIDPENGDTIYAPKFDG	178	LSNGSAMIY	302	SASSSVSYMY	426	DTSNLAS	550	QQWSSYPLT	674
Interhélice	Hy1E-G1	GFD1RDYYIH	55	WIDPENGDTIYAPKFDG	179	LSNGSAMIY	303	SASSSVSYMY	427	DTSNLAS	551	QQWSSYPLT	675
Interhélice	Hy2-D8	GFN1KDFYIH	56	WIDPENGDTIYAPKFDG	180	LSNGSAMIY	304	SASSSVSYMY	428	DTSNLAS	552	QQYSGYPT	676
Interhélice	Hy2-A6	GFN1KDTYIH	57	WIDPENGDTIYAPKFDG	181	LSNGSAMIY	305	SASSSVSYMH	429	DTSNLAS	553	QQWSSYPT	677
Interhélice	Hy1F-B3	GFN1KDTYMH	58	WIDPENGDTIYAPKFDG	182	LSNGSAMIY	306	SASSSVSYMH	430	DTSNLAS	554	HQWSSYPT	678
Interhélice	Hy1C-A5	GFN1KDTYMH	59	WIDPENGDTIYAPKFDG	183	LSNGSAMIY	307	RASSSVNYMY	431	DTSNLAS	555	QQFTSSPFT	679

Figura 29 (Continuación)

Interhélico	Hy2-D4	GfNlKdTYMH	60	WlDPENGDTEYAPKfQG	184	LsNGSsAWlSY	308	SASSsVSYMY	432	DTSNLAS	556	QqWSSYPfT	680
Interhélico	Hy1E-G7	GfNlKdTYMH	61	WlDPENGDTEYAPKfQG	185	LsNGSsAWlSY	309	SASSsVSYMY	433	DTSNLAS	557	QqWSSNPfT	681
Interhélico	Hy1E-D3	GfNlKdTYMH	62	WlDPENGDTEYAPKfQG	186	LsNGSsAWlSY	310	SASSsVSYMY	434	DTSNLAS	558	QqWSSYPfT	682
Interhélico	Hy2-D1	GfNlKdTYMH	63	WlDPENGDTEYAPKfQG	187	LsNGSsAWlSY	311	SASSsVSYMY	435	DTSNLAS	559	QqWSSYPfT	683
Interhélico	Hy2-G12	GfNlKdTYMH	64	WlDPENGDTEYAPKfQG	188	LsNGSsAWlSY	312	SASSsVSYMY	436	DTSNLAS	560	QqWSSYPfT	684
Interhélico	Hy1C-H5	GfNlKdTYMH	65	WlDPENGDTEYAPKfQG	189	LsNGSsAWlSY	313	SASSsVlSYMY	437	DTSNLAS	561	QqWSSYPfT	685
Interhélico	Hy2-B1	GfNlKdTYMH	66	WlDPENGDTEYAPKfQG	190	LsNGSsAWlSY	314	SASSsVSYMY	438	DTSNLAS	562	QqWSSYPfT	686
Interhélico	Hy2-C7	GfNlKdTYMH	67	WlDPENGDTEYAPKfQG	191	LsNGSsAWlSY	315	SASSsVSYMY	439	DTSNLAS	563	QqWSSYPfT	687
Interhélico	Hy2-C11	GfNlKdTYMH	68	WlDPENGDTEYAPKfQG	192	LsNGSsAWlSY	316	SASSsVSYMY	440	DTSNLAS	564	QqWSSYPfT	688
Interhélico	Hy2-H10	GfNlKdTYMH	69	WlDPENGDTEYAPKfQG	193	LsNGSsAWlSY	317	SASSsVSYMY	441	DTSNLAS	565	QqWSSYPfT	689
Interhélico	Hy1A-E2	GfNlKdTYMH	70	WlDPENGDTEYAPKfQG	194	LsNGSsAWlSY	318	SASSsVSYMY	442	DTSNLAS	566	QqWSSYPfT	690
Interhélico	Hy1A-B2	GfNlKdTYMH	71	WlDPENGDTEYAPKfQG	195	LsNGSsAWlSY	319	SASSsVSYMY	443	STSNLAS	567	QqWSSYPfT	691
Interhélico	Hy1D-E11	GfNlKdTYMH	72	WlDPENGDTEYAPKfQG	196	LsNGSsAWlSY	320	SASSsVSYMY	444	STSNLAS	568	QqWSSYPfT	692
Interhélico	Hy1A-D7	GfNlKdTYMH	73	WlDPENGDTEYAPKfQG	197	LsNGSsAWlSY	321	SASSsVSYMY	445	STSNLAS	569	QqWSSYPfT	693
Interhélico	Hy2-C3	GfNlKdTYMH	74	WlDPENGDTEYAPKfQG	198	LsNGSsAWlSY	322	SASSsVSYMY	446	DTSNLAS	570	QqWSTYpLT	694
Interhélico	Hy1A-D10	GfNlKdTYMH	75	WlDPENGDTEYAPKfQG	199	LsNGSsAWlSY	323	SASSsVSYMY	447	STSNLAS	571	HqWSSYPfT	695
Interhélico	Hy1-A11	GfNlKdTYMH	76	WlDPENGDTEYAPKfQG	200	LsNGSsAWlSY	324	RASEsVEYGTSLMQ	448	AASNVES	572	QqSRKVPfT	696
Interhélico	Hy1F-G9	GfNlKdTYMH	77	WlDPENGDTEYAPKfQG	201	LsNGSsAWlSY	325	SASSsVSYMY	449	DTSNLAS	573	QqWSSYPfT	697
Interhélico	Hy1B-E12	GfNlKdTYMH	78	WlDPENGDTEYAPKfQG	202	LsNGSsAWlSY	326	SASSsVSYMY	450	DTSNLAS	574	QqWSSYPfT	698
Interhélico	Hy2-D3	GfNlKdTYMH	79	WlDPENGDTEYAPKfQG	203	LsNGSsAWlSY	327	SASSsVSYMY	451	DTSNLAS	575	QqWSSYPfT	699
Interhélico	Hy1F-E8	GfNlKdTYMH	80	WlDPENGDTEYAPKfQG	204	LsNGSsAWlSY	328	SASSsVSYMY	452	DTSNLAS	576	QqWSSYPfT	700
Interhélico	Hy2-C4	GfNlKdTYMH	81	WlDPENGDTEYAPKfQG	205	LsNGSsAWlSY	329	SASSsVSYMY	453	STSNLAS	577	QqWSSYPfT	701
Interhélico	Hy1D-H4	GfNlKdTYMH	82	WlDPENGDTEYAPKfQG	206	LsNGSsAWlSY	330	SASSsVSYMY	454	DTSNLAS	578	QqWNTYpLT	702
Interhélico	Hy2-C5	GfNlKdTYMH	83	WlDPENGDTEYAPKfQG	207	LsNGSsAWlSY	331	RASEsVSYMY	455	STSNLAS	579	QqYSGYPfT	703
Interhélico	Hy1D-F12	GfNlKdTYMH	84	WlDPENGDTEYAPKfQG	208	LsNGSsAWlSY	332	RASEsVEYGTSLMQ	456	AASNVES	580	QqSRKVPfT	704
Interhélico	Hy1A-G1	GfNlKdTYMH	85	WlDPENGDTEYAPKfQG	209	LsNGSsAWlSY	333	SASSsVSYMY	457	DTSNLAS	581	QqWSSYPfT	705
Interhélico	Hy1A-H12	GfNlKdTYMH	86	WlDPENGDTEYAPKfQG	210	LsNGSsAWlSY	334	SASSsVSYMY	458	DTSNLAS	582	QqWSSYPfT	706
Interhélico	Hy1C-A7	GfNlKdTYMH	87	WlDPENGDTEYAPKfQG	211	LsNGSsAWlSY	335	SASSsVSYMY	459	DTSNLAS	583	QqWSSYPfT	707
Interhélico	Hy1F-H3	GfNlKdTYMH	88	WlDPENGDTEYAPKfQG	212	LsNGSsAWlSY	336	SASSsVSYMY	460	DTSNLAS	584	QqWSSYPfT	708
Interhélico	Hy1B-G8	GfNlKdTYMH	89	WlDPENGDTEYAPKfQG	213	LsNGSsAWlSY	337	SASSsVSYLH	461	STSNLAS	585	QqWSSYPfT	709
Interhélico	Hy2-E3	GfNlKdTYMH	90	WlDPENGDTEYAPKfQG	214	LsNGSsAWlSY	338	SASSsVSYMY	462	STSNLAS	586	QqWSSYPfT	710
Interhélico	Hy1-D8	GfNlKdTYMH	91	WlDPENGDTEYAPKfQG	215	LsNGSsAWlSY	339	SASSsVSYMY	463	DTSNLAS	587	QqWSSYPfT	711
Interhélico	Hy1E-C6	GfNlKdTYMH	92	WlDPENGDTEYAPKfQG	216	LsNGSsAWlSY	340	SASSsVSYMY	464	STSNLAS	588	QqWSSYPfT	712
Interhélico	Hy1G-G8	GfNlKdTYMH	93	WlDPENGDTEYAPKfQG	217	LsNGSsAWlSY	341	SASSsVSYMY	465	DTSNLAS	589	QqWSSYPfT	713
Interhélico	Hy1G-E11	GfNlKdTYMH	94	WlDPENGDTEYAPKfQG	218	LsNGSsAWlSY	342	RASEsVSYMY	466	DTSNLAS	590	QqWSSYPfT	714
Interhélico	Hy2-E2	GfNlKdTYMH	95	WlDPENGDTEYAPKfQG	219	LsNGSsAWlSY	343	SASSsVSYMY	467	DTSNLAS	591	QqWSSYPfT	715
Interhélico	Hy1-H4	GfNlKdTYMH	96	WlDPENGDTEYAPKfQG	220	LsNGSsAWlSY	344	SASSsVSYMY	468	DTSNLAS	592	QqWSSYPfT	716
Interhélico	Hy1A-C10	GfNlKdTYMH	97	WlDPENGDTEYAPKfQG	221	LsNGSsAWlSY	345	SASSsVSYMY	469	DTSNLAS	593	QqWSSYPfT	717
Interhélico	Hy2-G11	GfNlKdTYMH	98	WlDPENGDTEYAPKfQG	222	LsNGSsAWlSY	346	SASSsVSYMY	470	DTSNLAS	594	QqWSSYPfT	718
Interhélico	Hy1C-D5	GfNlKdTYMH	99	WlDPENGDTEYAPKfQG	223	LsNGSsAWlSY	347	RASEsVSYMY	471	DTSNLAS	595	QqWNTYpLT	719
Interhélico	Hy2-F6	GfNlKdTYMH	100	WlDPENGDTEYAPKfQG	224	NfAY	348	SASSsVSYMY	472	DTSNLAS	596	QqYSGYPfT	720
Interhélico	3B-2-2	GfNlKdTYMH	101	WlDPENGDTEYAPKfQG	225	NfDY	349	SASSsVSYMY	473	DTSNLAS	597	QqYSGYPfT	721
Interhélico	4-B4	GfNlKdTYMH	102	WlDPENGDTEYAPKfQG	226	NfDY	350	SASSsVSYMY	474	DTSNLAS	598	QqYSGYPfT	722

Figura 29 (Continuación)

Interhelico	3B-65	GFNIKDTYMH	103	RIDPANGNTKYDPKFG	227	NFGSSYDAMDY	351	SVSSSISSNLH	475	DTSKLAS	599	QWSSSYPLIT	723
Interhelico	Hy1F-E5	GYAFTRYLE	104	VJNPGSGTINNEKFKG	228	NGYYFYDY	352	FASESVEYGTSLMO	476	AASNLDS	600	QGSNEDPWT	724
Interhelico	Hy2-C1	GFNIKDTYMH	105	WIDPENGDTEYAPKFG	229	NVYD	353	SASSSVSYMY	477	DTSNLAS	601	QQYSGYPLT	725
Interhelico	Hy1F-H4	GFNIKDTYMH	106	RIDPANGNTKYDPKFG	230	NFGSSYDAMDY	354	SASSSVSYMH	478	DTSKLAS	602	HQSSSYGT	726
Interhelico	Hy1F-G12	GYSTSYMH	107	MIDPSOGETRLNOKFKD	231	PDHGSYAWFAY	355	SASSSVSYMH	479	DTSNLAS	603	QGRSSYPPT	727
Interhelico	Hy1F-G4	GYSTSYMH	108	MIDPESODTRLNOKFKD	232	PDHGSYAWFAY	356	SASSSVSYMH	480	DTSNLAS	604	QGRSSYPPT	728
Interhelico	Hy2-F12	GFNIKDTYMH	109	WIDPENGDTEYAPKFG	233	PTFYFYDY	357	SASSSVSYMH	481	DTSNLAS	605	QWSSSYPLT	729
Interhelico	Hy2-D2	GFNIKDTYMH	110	WIDPENGDTEYAPKFG	234	PYYGGAMDY	358	SASSSVSYMH	482	DTSNLAS	606	HQSSSYPLT	730
Interhelico	Hy1B-G1	GFNIKDTYMH	111	MIDPANGNTKYDPKFG	235	RYYVYD	359	SASSSVSYMH	483	DTSNLAS	607	QGRSSYPPT	731
Interhelico	Hy1G-E10	GFNIKDTYMH	112	MIAPAHNTKYDPKFG	236	RYYAMDY	360	SASSSVSYMH	484	DTSNLAS	608	QGRSSYPPT	732
Interhelico	Hy1E-F4	GFNIKDTYMH	113	MIAPAHNTKYDPKFG	237	RYYAMDY	361	SASSSVSYMH	485	DTSNLAS	609	QGRSSYPPT	733
Interhelico	Hy1E-F5	GFNIKDTYMH	114	MIAPANGNTKYDPKFG	238	RYYAMDY	362	SASSSVSYMH	486	DTSNLAS	610	HQSSSYPLT	734
Interhelico	Hy1E-F6	GFNIKDTYMH	115	MIAPANGNTKYDPKFG	239	RYYAMDY	363	SASSSVSYMH	487	DTSNLAS	611	HQSSSYPLT	735
Interhelico	Hy1G-G1	GFNIKDTYMH	116	MIAPANGNTKYDPKFG	240	RYYAMDY	364	SASSSVSYMH	488	DTSNLAS	612	QGRSSYPPT	736
Interhelico	Hy1E-H12	GFNIKDTYMH	117	MIAPANGNTKYDPKFG	241	RYYAMDY	365	SASSSVSYMH	489	DTSNLAS	613	HQSSSYPLT	737
Interhelico	Hy1C-D1	GFNIKDTYMH	118	MIAPANGNTKYDPKFG	242	RYYAMDY	366	SASSSVSYMH	490	DTSNLAS	614	QGRSSYPPT	738
Interhelico	Hy1E-F12	GFNIKDTYMH	119	MIDPANVNTKYDPKFG	243	RYYAMDY	367	SASSSVSYMH	491	DTSNLAS	615	QGRSSYPPT	739
Interhelico	Hy1F-F10	GFNIKDTYMH	120	MIDPANVNTKYDPKFG	244	RYYAMDY	368	SASSSVSYMH	492	DTSNLAS	616	QGRSSYPPT	740
Interhelico	Hy1G-H1	GFNIKDTYMH	121	MIDPANVNTKYDPKFG	245	RYYAMDY	369	SASSSVSYMH	493	DTSNLAS	617	QGRSSYPPT	741
Interhelico	Hy1G-G6	GFNIKDTYMH	122	MIDPANVNTKYDPKFG	246	RYYAMDY	370	SASSSVSYMH	494	DTSNLAS	618	HQSSSYPLT	742
Interhelico	Hy1A-A10	GFNIKDTYMH	123	MIDPANVNTKYDPKFG	247	RYYAMDY	371	SASSSVSYMH	495	DTSNLAS	619	HQSSSYPLT	743
Interhelico	Hy1F-C2	GFNIKDTYMH	124	MIDPANVNTKYDPKFG	248	RYYAMDY	372	SASSSVSYMH	496	DTSNLAS	620	HQSSSYPLT	744
Interhelico	Hy1A-D6	GFNIKDTYMH	125	MIDPANVNTKYDPKFG	249	RYYAMDY	373	SASSSVSYMH	497	DTSNLAS	621	QGRSSYPPT	745
Interhelico	Hy1F-B6	GFNIKDTYMH	126	MIDPANVNTKYDPKFG	250	RYYAMDY	374	SASSSVSYMH	498	DTSNLAS	622	QGRSSYPPT	746
Interhelico	Hy1F-B1	GFNIKDTYMH	127	MIDPANVNTKYDPKFG	251	RYYAMDY	375	SASSSVSYMH	499	DTSNLAS	623	HQSSSYPLT	747
Interhelico	Hy1G-E12	GFNIKDTYMH	128	MIDPANVNTKYDPKFG	252	RYYAMDY	376	SASSSVSYMH	500	DTSNLAS	624	QGRSSYPPT	748
Interhelico	Hy1G-F2	GFNIKDTYMH	129	RIDPANGNTKYDPKFG	253	RYYAMDY	377	SASSSVSYMH	501	DTSNLAS	625	HQSSSYPLT	749
Interhelico	Hy1E-B7	GFNIKDTYMH	130	RIDPANGNTKYDPKFG	254	RYYAMDY	378	SASSSVSYMH	502	DTSNLAS	626	HQSSSYPLT	750
Interhelico	Hy1D-E3	GFNIKDTYMH	131	RIDPANGNTKYDPKFG	255	RYYAMDY	379	SASSSVSYMH	503	DTSNLAS	627	HQSSSYPLT	751
Interhelico	Hy1G-D12	GFNIKDTYMH	132	MIDPANVNTKYDPKFG	256	RYYAMDY	380	SASSSVSYMH	504	DTSNLAS	628	HQSSSYPLT	752
Interhelico	Hy1E-E6	GFNIKDTYMH	133	MIDPANVNTKYDPKFG	257	RYYAMDY	381	SASSSVSYMH	505	DTSNLAS	629	QGRSSYPPT	753
Interhelico	Hy1E-G8	GFNIKDTYMH	134	RIDPANGNTKYDPKFG	258	RYYAMDY	382	SASSSVSYMH	506	DTSNLAS	630	HQSSSYPLT	754
Interhelico	Hy1E-A1	GFNIKDTYMH	135	RIDPANGNTKYDPKFG	259	RYYAMDY	383	SASSSVSYMH	507	DTSNLAS	631	HQSSSYPLT	755
Interhelico	Hy1G-B2	GFNIKDTYMH	136	RIDPANGNTKYDPKFG	260	RYYAMDY	384	SASSSVSYMH	508	DTSNLAS	632	HQSSSYPLT	756
Interhelico	Hy1G-A5	GFNIKDTYMH	137	RIDPANGNTKYDPKFG	261	RYYAMDY	385	SASSSVSYMH	509	DTSNLAS	633	HQSSSYPLT	757
Interhelico	Hy1B-A5	GFNIKDTYMH	138	MIAPANGNTKYDPKFG	262	RYYAMDY	386	SASSSVSYMH	510	DTSNLAS	634	HQSSSYPLT	758
Interhelico	Hy1D-G9	GFNIKDTYMH	139	RIDPANGNTKYDPKFG	263	RYYAMDY	387	SASSSVSYMH	511	DTSNLAS	635	HQSSSYPLT	759
Interhelico	C4P1-F18	GFNIKDTYMH	140	RIDPANGNTKYDPKFG	264	RYYAMDY	388	SASSSVSYMH	512	DTSNLAS	636	HQSSSYPLT	760
Interhelico	Hy1A-H3	GYAFSSYMH	141	QIYDGDSTYNEKFKG	265	QIYDGDSTYNEKFKG	389	RASESVEYGTSLMO	513	RASLES	637	GGIEDPPT	761
Interhelico	Hy2-B5	GFNIKDTYMH	142	WIDPENGDTEYAPKFG	266	WIDPENGDTEYAPKFG	390	SASSSVSYMH	514	DTSNLAS	638	QWSSSYPLT	762
Interhelico			143	WIDPENGDTEYAPKFG	267	WIDPENGDTEYAPKFG	391	SASSSVSYMH	515	DTSNLAS	639	QWSSSYPLT	763