

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 619 313**

51 Int. Cl.:

C07K 16/30 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2002** **E 10177880 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2017** **EP 2295064**

54 Título: **Terapia de anticuerpos monoclonales para el cáncer de páncreas**

30 Prioridad:

15.03.2001 US 276284 P

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

26.06.2017

73 Titular/es:

**PRECISION BIOLOGICS, INC. (100.0%)
9700 Great Seneca Highway, Suite 321
Rockville, MD 20850, US**

72 Inventor/es:

**ARLEN, MYRON y
TSANG, KWONG Y.**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 619 313 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

Terapia de anticuerpos monoclonales para el cáncer de páncreas

5 Solicitud de patente

1. Introducción

10 La presente invención se refiere al uso del anticuerpo monoclonal 31.1 y de sus fragmentos de unión al antígeno en el tratamiento del cáncer de páncreas. Se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que el anticuerpo monoclonal 31.1 es reactivo con células de páncreas malignas, pero no con las no malignas. La presente divulgación se refiere además secuencias de polinucleótidos y aminoácidos que comprenden la región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada de Mu-31.1 tal como se expone en la figura 2 y la figura 4, respectivamente. 15 Tales secuencias de polinucleótidos pueden usarse para expresar de manera recombinante anticuerpos equivalentes a 31.1 para su uso en los procedimientos de la invención.

2. Antecedentes de la invención

2.1. CÁNCER DE PÁNCREAS

20 El cáncer de páncreas es la quinta causa principal de muerte por cáncer en los Estados Unidos, esperándose que este año mueran aproximadamente 28000 estadounidenses por la enfermedad (sitio web sobre el cáncer de páncreas, The Johns Hopkins Medical Institutions, http://162.129.03.69:80/PANCREAS_INTRO). En la actualidad, el único tratamiento potencialmente curativo es la extracción quirúrgica del cáncer, en el contexto de un procedimiento extenso y complejo que extrae la cabeza, el cuello y el proceso unciforme del páncreas, así como la mayor parte del duodeno (la "operación Whipple"). Sin el tratamiento, la tasa de supervivencia global a 5 años es solo del 3 por 25 ciento (Id.).

30 La quimioterapia (que usa a menudo gemcitabina (Gemzar®)) y terapia con radiación son los tratamientos principales ofrecidos a los pacientes con tumores no resecables (Id.). Actualmente está estudiándose una inmunoterapia experimental en la que se modifican genéticamente las propias células de un paciente para expresar la proteína inmunoestimuladora, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, se irradian para evitar el crecimiento tumoral, y entonces se introducen de nuevo al paciente, en el que se espera que estas estimulen una respuesta inmunitaria (1997, Cancer Res. 57:1537-1546; sitio web sobre el cáncer de páncreas, The Johns Hopkins 35 Medical Institutions, http://162.129.103.69:80/PANCREAS_MEDICAL_TX)).

2.2. ANTICUERPO MONOCLONAL 31.1

40 El anticuerpo 31.1 representa un anticuerpo monoclonal dirigido a proteínas derivado mediante la inmunización de ratones BALB(c) con una preparación de membrana obtenida de muestras de carcinoma de colon alogénicas (humanas) combinadas. Se fragmentaron las células usadas para preparar el antígeno usando una bomba de nitrógeno (Parr) y entonces se sometieron a ultracentrifugación. Inicialmente se sometió a prueba el material de membrana mediante microscopía electrónica para garantizar la compatibilidad entre lotes, descartando los componentes citoplasmáticos y nucleares. Después, se sonicó y fraccionó con sephadex G200. Se usó 45 electroforesis en gel de poliacrilamida discontinua para la purificación parcial inicial (aproximadamente el 80 %) y se sometieron a prueba 30 µg para detectar hipersensibilidad cutánea retrasada (DHR), (3). Se inmunizaron los ratones BALB mediante inyección intraperitoneal de 50 microgramos de antígeno asociado a carcinoma de colon. Se proporcionó una segunda inyección 10 días después y luego se sacrificaron los ratones para obtener células del bazo para la fusión. Se realizó la fusión incubando 5×10^7 células de bazo de ratón con 10^7 células de mieloma sp2/OAG 14 en PEG al 40 %. Se ha demostrado que el antígeno definido por el anticuerpo monoclonal 31.1 tiene un PM de 72.000. Estudios que usan la inmunoperoxidasa han sugerido que se observa con mayor frecuencia el antígeno reconocido por 31.1 en los tumores de colon de grado superior. La especificidad para el anticuerpo es alta, de modo que en un estudio de colonocitos eliminados en la clínica Mayo, la sensibilidad y especificidad fueron superiores cuando se compararon con anticuerpos anti-CEA, anti-MUC1 y B72.3. 55

Se aislaron varios anticuerpos candidatos y se sometieron a prueba a partir de la primera generación de TAA. Todos demostraron ser derivados proteicos y relativamente específicos para el carcinoma de colon. El anticuerpo 31.1 correspondió a uno de los dos antígenos que se ha demostrado que migran estrechamente en la electroforesis en gel y se relacionan con la glicoproteína inmunogénica que induce DHR. La versión murina es de isotipo IgG2a que se convierte a un isotipo IgG1 en la quimerización. Se encontró que 31.1 tiene fuertes índices de localización. Como 60 tal, este anticuerpo fue el primero que se quimerizó.

Para la quimerización del anticuerpo monoclonal 31.1, el exón codificante de la proteína del gen de la región variable de la cadena pesada 31.1 se cortó y empalmó a los exones codificantes de la proteína de la región constante de la cadena gamma 1 humana. Se empleó PCR. El ADNc de 31.1 VH se amplificó mediante la PCR utilizando los cebadores inversos degenerados sintetizados basados en las secuencias de ADN de la primera región marco 65

conservada (FR1) de consenso y un cebador directo sintetizado de acuerdo con las secuencias de ADN de la región de unión J-C de consenso. El ADN de V_H 31.1 amplificado se clonó en el vector pBluescript y se secuenció. Se produjo 31.1 quimérico transfectando células SP2/0 AG14 con el vector.

5 El anticuerpo monoclonal 31.1 y una versión quimérica (humanizada) de ese anticuerpo se describen en la patente estadounidense n.º 5.688.657 expedida el 18 de noviembre de 1997, en la actualidad objeto de una solicitud de reexpedición. Además, el anticuerpo monoclonal 31.1 se ha depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo ("ATCC"), que tiene una dirección en 10801 University Blvd., Manassas, VA, 20110-2209 y se le asignó el número de registro ATCC PTA-2497 y se ha depositado la versión quimerizada en la ATCC y se le asignó el número de registro
10 12316.

La patente US 5.688.657 muestra la expresión del antígeno 31.1 detectado por el anticuerpo monoclonal 31.1 en diferentes líneas celulares de cáncer, incluyendo dos de tres líneas celulares de carcinoma de páncreas ensayadas, pero no muestra una expresión del antígeno 31.1 en tejido pancreático humano.

15

3. Sumario de la invención

La presente invención se refiere al uso de equivalentes de unión del anticuerpo monoclonal 31.1, incluyendo versiones quimerizadas y/o humanizadas de los mismos, y fragmentos de unión a antígeno de los mismos en el
20 tratamiento de cáncer de páncreas.

Se basa, al menos en parte, en estudios *in vitro* usando tanto versiones murinas como quiméricas de 31.1 que compararon las actividades ADCC de los anticuerpos 31.1 con D6-12 y 17.1a (Panorex). Mientras que la versión murina de 31.1 puede inducir una respuesta de ADCC del 35 %, se ha mostrado que la versión quimérica da como
25 resultado la destrucción del 80 % de células tumorales cada tres horas, usando un ensayo de liberación de cromo. Esto se compara con la tasa del 30 % de destrucción asociada con D6-12 y una tasa del 15 % para Panorex. Usando modelos de xenoinjerto con líneas celulares de cáncer de colon humanas LC-174T y Colo205, se encontró que 31.1 quimérico provocaba la regresión de líneas tumorales establecidas (moléculas bien definidas) tras inocular dos millones de células tumorales en las patas traseras de ratones desnudos y administrar anticuerpo intraperitoneal
30 a los 10 días junto con células efectoras humanas. A los 30 días, el volumen del tumor en los animales tratados en comparación con los controles se redujo en más del 95 %. Pueden esperarse resultados similares cuando se dirige el anticuerpo hacia células cancerosas de páncreas, ya que se ha demostrado que el anticuerpo 31.1 se une al antígeno presente en células cancerosas de páncreas, pero no a tejidos de páncreas no malignos.

35 La presente divulgación se refiere a secuencias de polinucleótidos y aminoácidos que comprenden la región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada de Mu-31.1 que pueden usarse para expresar anticuerpos 31.1 quimerizados. Estas secuencias de nucleótidos incluyen: (a) las secuencias de nucleótidos mostradas en la figura 2 o la figura 4; (b) una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 2 o la figura 4; y (c) cualquier secuencia de nucleótidos que (i) se une a la secuencia de nucleótidos de la
40 figura 2 o la figura 4 en condiciones de hibridación rigurosas, por ejemplo, hibridación a ADN unido a filtro en NaHPO₄ 0,5 M, dodecilsulfato de sodio (SDS) al 7 %, EDTA 1 mM a 65°, y lavado en 0,1xSSC/SDS al 0,1 % a 68° y (ii) codifica una región variable de cadena ligera y pesada que puede unirse con la misma inmunoespecificidad que el anticuerpo monoclonal 31.1 quimérico.

45 La divulgación se refiere además a una nueva construcción de expresión de anticuerpo 31.1 quimerizado, denominado pRc/CMV 31.1 que se ha depositado en la ATCC y se le ha asignado el n.º de registro de ATCC []. Este plásmido lleva una unidad de expresión de dihidrofolato reductasa ("dhfr") activada mediante un promotor temprano de SV40 que carece de promotor que permite la expresión a más de 200 mg/litro en células de ovario de hámster chino que carecen de dihidrofolato reductasa.
50

4. Breve descripción de los dibujos

Figuras 1A-F. Serie de plásmidos usados para construir el vector pRc/CMV 31.1 insertando los genes de cadena ligera y de cadena pesada de Chi31.1-1 en el plásmido pDCM-dhfr (figura 1F).

55 Figura 2. Secuencia de ácido nucleico (bicatenario) y secuencias de aminoácidos posibles (dependiendo del marco de lectura) de la región variable de cadena ligera de 31.1, que muestran los sitios de escisión de enzimas de restricción.

Figura 3. Lista de enzimas que no cortan de la secuencia de ácido nucleico de región variable de cadena ligera mostrada en la figura 2.

60 Figura 4. Secuencia de ácido nucleico (bicatenario) y secuencias de aminoácidos posibles (dependiendo de la fase de lectura) de la región variable de cadena pesada de 31.1, que muestran los sitios de escisión de enzimas de restricción.

Figura 5. Lista de enzimas que no cortan de la secuencia de ácido nucleico de región variable de cadena pesada mostrada en la figura 4.

65 Figuras 6A-B. Se realizó un ensayo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) para someter a prueba la función efectora del anticuerpo chi 31.1 de CHO contra células diana SW1643 y PANC-1. Se produce

lisis celular en presencia de anticuerpo 31.1 (figura 6A) pero no en presencia de anticuerpo de control (figura 6B).

5. Descripción detallada de los dibujos

5 Para fines de claridad de la presentación y no a modo de limitación, la descripción detallada se divide en las dos subsecciones siguientes:

- i) anticuerpo monoclonal 31.1 y sus equivalentes; y
- ii) protocolo de tratamiento.

10

5.1. ANTICUERPO MONOCLONAL 31.1 Y SUS EQUIVALENTES

15 El anticuerpo monoclonal 31.1 es un anticuerpo monoclonal murino (denominado en lo sucesivo en el presente documento Mu-31.1), originariamente generado mediante inmunización con material purificado a partir de membranas celulares de carcinoma de colon. Las células del hibridoma que secretan este anticuerpo se han depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo ("ATCC") y se les asignó el n.º de registro de ATCC PTA 2497.

20 La presente invención proporciona anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que comprenden la región variable de cadena ligera y la región variable de cadena pesada de Mu-31.1. Se divulgan también las secuencias de nucleótidos que incluyen; (a) las secuencias de ADN mostradas en la figura 2 o la figura 4; (b) una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 2 o la figura 4; (c) cualquier secuencia de nucleótidos que (i) se hibrida con la secuencia de nucleótidos expuesta en (a) o (b) en condiciones rigurosas, por ejemplo, hibridación a ADN unido a filtro en NaHPO₄ 0,5 M, dodecilsulfato de sodio (SDS) al 7 %, EDTA 1 mM a 65 °C, y lavado en 0,1xSSC/SDS al 0,1 % a 68 °C (Ausubel F. M. et al., eds., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, Green Publishing Associates, Inc., y John Wiley & sons, Inc., Nueva York, en p.2, 10, 3) y (ii) codifica un producto génico funcionalmente equivalente. Los productos génicos funcionalmente equivalentes incluyen aquellos polipéptidos que compiten con 31.1 para unirse a su antígeno diana. La divulgación también se refiere a secuencias de nucleótidos que codifican fragmentos de péptidos de las regiones variables de cadena pesada y ligera, y proteínas de fusión de las mismas.

35 Los nucleótidos pueden aislarse usando una diversidad de diferentes procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, puede examinarse una biblioteca de ADNc construida usando ARN de células o tejido que se sabe que expresan el anticuerpo monoclonal 31.1 o su equivalente, usando una sonda de ácido nucleico marcada derivada de las secuencias representadas en la figura 2 o la figura 4. Además, pueden derivarse secuencias de ácidos nucleicos que codifican las regiones variables de cadena pesada y ligera realizando PCR que usa dos cebadores oligonucleotídicos diseñados basándose en las secuencias de nucleótidos desveladas en el presente documento. El molde para la reacción puede ser ADNc obtenido mediante transcripción inversa de ARNm preparado a partir de líneas celulares o tejido que se sabe que expresan el anticuerpo monoclonal 31.1.

40 La divulgación también abarca (a) vectores de ADN que contienen cualquiera de las secuencias de región variable de cadena pesada y ligera anteriores y/o sus complementos (es decir, antisentido); (b) vectores de expresión de ADN que contienen cualquiera de las secuencias de región variable de cadena pesada y ligera anteriores asociada operativamente a un elemento regulador que dirige la expresión de las secuencias codificantes de la región variable de cadena pesada y ligera; y (c) células hospedadoras modificadas por ingeniería genética que contienen cualquiera de las secuencias de región variable de cadena pesada y ligera anteriores asociada operativamente a un elemento regulador que dirige la expresión de las secuencias codificantes en la célula hospedadora. Tal como se usa en el presente documento, los elementos reguladores incluyen, pero no se limitan a, promotores inducibles y no inducibles, potenciadores, operadores y otros elementos que los expertos en la técnica saben que activan y regulan la expresión.

45 La figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos deducida de la región variable de cadena ligera de 31.1 y la figura 4 muestra la secuencia de aminoácidos deducida de la región variable de cadena pesada de 31.1. Por tanto, las secuencias de aminoácidos de la invención incluyen la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 2 y la figura 4.

50 La divulgación también abarca proteínas que son funcionalmente equivalentes a proteínas codificadas por las secuencias de nucleótidos descritas anteriormente, tal como se evalúa mediante cualquiera de varios criterios, incluyendo, pero sin limitarse a, la capacidad de unirse al epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal 31.1.

55 Los péptidos que corresponden a uno o más dominios de las regiones variables de cadena pesada y ligera, así como las proteínas de fusión en las que se fusiona la longitud completa o una parte de la región variable de cadena pesada y ligera con una proteína no relacionada pueden diseñarse basándose en las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos divulgadas en el presente documento (véanse la figura 2 y la figura 4).

60

65

- Mientras que las regiones variables de cadena pesada y ligera pueden sintetizarse químicamente (por ejemplo, véase Creighton, 1983, *Proteins: Structures and Molecular Principles*, W. H. Freeman & Co., N. Y.), las regiones pueden producirse ventajosamente mediante tecnología de ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en la técnica para expresar un ácido nucleico que contiene secuencias génicas y/o secuencias codificantes de región variable de cadena pesada y ligera. Tales procedimientos pueden usarse para construir vectores de expresión que contienen las secuencias de nucleótidos descritas anteriormente y señales de control de la transcripción y la traducción apropiadas. Estos procedimientos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. (Véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook et al., 1989, citado anteriormente, y Ausubel et al., 1989, citado anteriormente).
- Puede utilizarse una diversidad de sistemas de hospedador-vector de expresión para expresar las secuencias de nucleótidos.
- Cuando se expresan las regiones variables de cadena pesada y ligera como un derivado soluble y no se secretan, puede recuperarse el péptido o polipéptido de la célula hospedadora. Alternativamente, cuando se secretan las regiones variables de cadena pesada y ligera, pueden recuperarse el péptido o los polipéptidos de los medios de cultivo.
- Los sistemas de expresión que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias transformadas con bacteriófago recombinante, vectores de expresión de ADN de plásmido o de cósmido que contienen secuencias de nucleótidos que codifican las regiones variables de cadena pesada y ligera de 31.1; levadura transformada con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen secuencias de nucleótidos que codifican las regiones variables de cadena pesada y ligera de 31.1 o sistemas de células de mamíferos que albergan construcciones de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamíferos o de virus de mamíferos.
- Pueden elegirse sistemas de expresión apropiados para asegurar que se produzca la correcta modificación, procesamiento y ubicación subcelular de la proteína de región variable de cadena pesada y ligera. Para este fin, se prefieren células hospedadoras que poseen la capacidad de modificar y procesar apropiadamente anticuerpos para su secreción. Para la producción de alto rendimiento, a largo plazo de proteínas recombinantes, tal como la deseada para el desarrollo de líneas celulares para la producción de anticuerpos quiméricos, se prefiere la expresión estable. En vez de usar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación, pueden transformarse las células hospedadoras con ADN controlado por elementos de control de la expresión apropiados y un gen marcador seleccionable, es decir, gen *tk*, *hgpRT*, *dhfr*, *neo* e *hygro*, por mencionar unos pocos. Tras la introducción del ADN foráneo, puede permitirse que las células modificadas por ingeniería genética crezcan durante 1-2 días en medios enriquecidos, y entonces se cambian a un medio selectivo.
- Una versión quimérica de 31.1 murino, denominada en lo sucesivo en el presente documento Chi-31.1-1, que comprende la región variable de Mu-31.1 junto con secuencias de inmunoglobulina de región constante humanas, se produce mediante células de hibridoma depositadas en la ATCC y a las que se les asigna el n.º de registro de ATCC CRL-12316.
- En una realización específica de la invención, puede producirse una segunda versión quimérica de 31.1 murino, denominada en lo sucesivo en el presente documento Chi-31.1-2, que tiene regiones variables de Mu-31.1 y regiones de inmunoglobulina constantes humanas y derivadas de los genes de cadena pesada y ligera de Chi31.1-1, mediante expresión del vector pRc/CMV 31.1, descrito en el presente documento, y tal como se muestra en la figura 1. Este vector tiene la ventaja de producir altos rendimientos de anticuerpo quimérico. Una descripción de la preparación de este vector se proporciona en la sección de ejemplos, a continuación.
- En realizaciones no limitativas específicas de la invención, pueden producirse versiones quiméricas adicionales que comprenden las regiones variables de Mu-31.1. Por ejemplo, pueden generarse la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera usando cebadores de PCR diseñados basándose en las secuencias de región variable expuestas en la figura 2 (región variable de cadena ligera) y la figura 4 (región variable de cadena pesada) o variantes de las mismas para alterar los extremos terminales para facilitar el corte y empalme en un vector de elección y usar, como fuente de ADN molde, ADN recogido de un hibridoma que produce un equivalente de Ab 31.1, tal como uno de los hibridomas expuestos anteriormente que se han depositado en la ATCC. Entonces pueden combinarse las secuencias que codifican regiones variables con secuencias que codifican regiones constantes humanas para producir un anticuerpo "humanizado".
- Como alternativa, el ácido nucleico que codifica las cadenas pesada y ligera de Chi31.1-1 (incluyendo las regiones constantes humanas) puede insertarse en diversos vectores de expresión para facilitar la expresión. Ejemplos no limitativos específicos de tales cebadores de PCR son:
- a) para la inserción de secuencias que codifican la cadena ligera de Chi31.1-1 en un sitio de inserción BamH1/XbaI:

i) Chi31.1-LcBamH1(S):

5'- ATA GGA TCC ATG AAG TCA CAG ACC CAG GTC TTC G-3'

5 ii) Chi31.1-LcXBal (A):

5'-TTT CTA GAC TAA CAC TCT CCC CTG TTG AAG C-3'

10 b) para la inserción de secuencias que codifican la cadena pesada de Chi31.1-1 en un sitio de inserción EcoRI/NotI:

i) Chi31.1-HcEcoRI(S):

5'-ATA GAA TTC ATG GCT TGG GTG TGG ACC TTG CT-3'

15

ii) Chi31.1-HcNotI(A):

5'-TTG CGG CCG CTC ATT TAC CCG GAG-3'. Tales cebadores pueden usarse en reacciones en cadena de la polimerasa usando, como molde, ADN preparado de células de hibridoma depositadas en la ATCC y a las que se les asigna el n.º de registro de ATCC CRL-12316.

20

En la presente divulgación se definen "equivalentes" de Mu-31.1 como moléculas o fragmentos de inmunoglobulina o derivados de los mismos que compiten con Mu-31.1 para la unión a su antígeno diana, tal como se evalúa usando técnicas convencionales. Tales equivalentes pueden incluir moléculas de anticuerpo completas (es decir, que tienen dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras), moléculas de anticuerpo monocatenarias (véase, por ejemplo, Lee et al., 1999, Molec. Immunol. 36: 61-71), fragmentos tales como fragmentos F(ab) y F(ab)₂ de Mu-31.1, Chi-31.1-1, Chi-31.1-2, o moléculas de anticuerpos completos equivalentes, y moléculas derivadas incluyendo, pero sin limitarse a, una o más de las moléculas de inmunoglobulina anteriores o fragmentos conjugados a un agente bioactivo, o modificadas para asemejarse más estrechamente a una molécula de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo; 25 30 Ryu et al., 1996, Human Antibod. Hybridomas 7:113-122). Tales equivalentes, que incluyen Mu-31.1, Chi-31.1-1, Chi-31.1-2, se denominan de manera colectiva "equivalentes de Ab 31.1".

Según la divulgación, también se prevé el uso de anticuerpos coespecíficos y sus equivalentes (teniendo los equivalentes el mismo alcance que el aplicado al anticuerpo 31.1).

35

Un anticuerpo coespecífico frente a Mu-31.1 (denominado "anticuerpos coespecíficos para 31.1") puede, o como alternativa puede no, competir con la unión de Mu-31.1, pero reconoce (es decir, se une a) el mismo antígeno diana, denominado en el presente documento "Ag 31.1". Los anticuerpos coespecíficos para 31.1 y sus equivalentes se denominan en la presente divulgación "equivalentes de anticuerpos coespecíficos para 31.1".

40

Cualquier equivalente de anticuerpo 31.1 o equivalente de anticuerpo coespecífico para 31.1 que va a usarse en seres humanos tiene preferiblemente una estructura que por sí misma no provoca una reacción inmunitaria perjudicial en seres humanos. Por ejemplo, dicho equivalente de anticuerpo de 31.1 o equivalente de anticuerpo coespecífico para 31.1 puede carecer inherentemente de tales estructuras inmunogénicas o puede ser el producto de un proceso de "humanización" mediante técnicas convencionales que minimizan o eliminan estructuras que se reconocerían como no propias por un sujeto (por ejemplo, la quimerización y/o la modificación mediante ingeniería sitio por sitio). Parece que el Ag 31.1 se ubica en la membrana de cánceres de colon y de páncreas. Su presencia aún no se ha detectado en tejido humano normal recién obtenido e inmediatamente congelado (tabla A).

50

Tabla A. Reactividad cruzada frente a tejidos humanos recién congelados normales.

Tejido (número)	Tinción con parafina	Tinción de muestras congeladas
Colon (3)	Negativo (3)	Negativo (2) Traza Positiva (1)
Intestino delgado (3)	Negativo (3)	Negativo (3)
Esófago (3)	Negativo (3)	Negativo (3)
Mucosa ora (2)	Negativo (2)	Negativo (2)
Yeyuno (1)	Negativo (1)	Negativo (1)
Estómago (1)	Negativo (1)	Negativo (1)
Hígado (3)	Negativo (3)	Negativo (3)
Páncreas (3)	Negativo (3)	Negativo (3)

Tejido (número)	Tinción con parafina	Tinción de muestras congeladas
Timo (3)	Negativo (3)	Negativo (3)
Corazón (2)	Negativo (2)	Negativo (2)
Próstata (2)	Negativo (2)	Negativo (2)
Mama (3)	Negativo (3)	Negativo (3)
Testículo (1)	Negativo (1)	Negativo (1)
Ovario (2)	Negativo (2)	Negativo (2)
Glándulas salivales (3)	Negativo (3)	Negativo (3)
Bazo (2)	Negativo (2)	Negativo (2)
Cerebro (3)	Negativo (3)	Negativo (3)
Ganglios linfáticos (2)	Negativo (2)	Negativo (2)
Glándula suprarrenal (1)	Negativo (1)	Negativo (1)
Vagina (1)	Negativo (1)	Negativo (1)
Leucocitos (1)	Negativo (1)	Negativo (1)

Sin embargo, Ag 31.1 se encuentra en la superficie de cánceres de colon y páncreas recién obtenidos en el momento de la cirugía y congelamiento (tabla B).

5

Tabla B. Ubicación de antígeno 31.1 en cánceres de colon y páncreas

Cáncer (número)	Tinción con parafina	Tinción de muestras congeladas
Adenocarcinoma de colon (3)	Positivo (3)	Positivo (3)
Adenocarcinoma de páncreas (3)	Positivo (3)	Positivo (3)

10

Debe observarse que estos resultados difieren de los presentados en la tabla 2 de la patente estadounidense n.º 5.688.657 (en la columna 24, líneas 1-26), que indican que el anticuerpo Mu-31.1 no se unió a ninguna de las dos muestras de tumores de páncreas sometidas a prueba. La tabla 1 de la patente estadounidense n.º 5.688.657 (en la columna 23, líneas 1-38) muestra que Mu-31.1 reaccionó con dos de tres líneas celulares derivadas de cáncer de páncreas. Basándose en la información contenida en la patente estadounidense n.º 5.688.657, puede concluirse que Ag 31.1 solo apareció tras el pase de las células en cultivo, y no estaba presente en el tejido de cáncer de páncreas reciente. Por tanto, no se espera, basándose en la descripción de la patente estadounidense n.º 5.688.657, que el Ag 31.1 estuviera presente en 3/3 muestras de tumor de páncreas, tal como se expone en la tabla B en el presente documento.

15

20

Mu-31.1 se secreta a partir de una línea celular de hibridoma desarrollada mediante fusión con la línea celular SP2 murina. Mu-31.1, Chi-31.1-1 y Chi-31.1-2, equivalentes de Ab 31.1, y anticuerpos coespecíficos para 31.1 pueden prepararse, por ejemplo y no a modo de limitación, para su uso clínico mediante cultivo celular *in vitro* convencional y procedimientos de purificación aguas abajo. Por ejemplo, pueden hacerse crecer células de hibridoma en genética (0,2 mg/ml) dado que se ha observado que la presencia del antibiótico permite que las células de hibridoma crezcan mejor.

25

Preferiblemente, las composiciones que comprenden los equivalentes de Ab 31.1 y anticuerpos coespecíficos para 31.1 anteriores pueden prepararse sin la adición de aditivos humanos. Por ejemplo, las preparaciones pueden filtrarse a través de un filtro de 0,2 micrómetros Millipore para bacterias para eliminar contaminantes y verificarse que son estériles para bacterias y hongos sembrando en estrías controles positivos en placas de agar sangre y medios de cultivo durante 14 días. Puede determinarse que la preparación está libre de micoplasma mediante, por ejemplo, ensayos de PCR para micoplasma y mediante placas de agar para micoplasma (Life Technology n.º de cat. 18042-010) y kit Myco Test (Life Technology n.º de cat. 15672-017) usando células de control 3T6.

30

35

Los medios que contienen uno o más de los equivalentes de Ab 31-1 o anticuerpos coespecíficos para 31.1 anteriores pueden filtrarse a través de un filtro para endotoxina Pall y puede esterilizarse por calor el material de vidrio para eliminar endotoxinas. Convenientemente, pero no a modo de limitación, un nivel de endotoxina apropiado puede ser de 0,125 unidades/ml o menos, tal como se mide mediante el kit de prueba BioWhittaker Pyrogen 03,250.

Puede tratarse una de las preparaciones anteriores de modo que inactiven virus. Por ejemplo, puede inactivarse retrovirus mediante el tratamiento con ácido acético a pH3 durante una hora durante una cromatografía en columna y filtración a través de un filtro de eliminación de virus DV50 de calidad Pall Ultipor de 10-40 nm.

- 5 En una realización no limitativa, específica de la invención, se usan 50 mg de Chi31.1-1 contenido en un vial a una concentración de 2 mg/ml en solución salina tamponada con fosfato ("PBS").

5.2. PROTOCOLOS DE TRATAMIENTO

10 La presente invención proporciona el uso de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se usan individualmente o en combinación como se definen en las reivindicaciones adjuntas, en el tratamiento del cáncer de páncreas en un sujeto que necesite dicho tratamiento. El procedimiento implica administrar, al sujeto, una dosis terapéuticamente eficaz de uno o más equivalentes de Ab 31.1 y/o equivalentes de anticuerpos coespecíficos para 31.1. En el presente documento, se define una dosis terapéuticamente eficaz como una dosis que logra uno o
 15 más de lo siguiente en el sujeto: produce lisis de células de carcinoma de páncreas detectable en el sujeto; provoca una disminución del crecimiento, o capacidad de invasión, o tamaño de un tumor de páncreas; provoca una mejora de los síntomas clínicos; y/o provoca un aumento en el tiempo de supervivencia. Preferiblemente, pero no a modo de limitación, una dosis individual de equivalente de Ab 31.1 y/o equivalente de anticuerpo coespecífico para 31.1 puede oscilar desde aproximadamente 25 mg hasta aproximadamente 1000 mg, y preferiblemente desde
 20 aproximadamente 100 mg hasta 250 mg. La magnitud de la dosis puede ajustarse en cada paciente para evitar efectos secundarios no deseados y/o toxicidad. Se prefiere que se administre el equivalente de Ab 31.1 y/o equivalente de anticuerpo coespecífico para 31.1 como una serie (pluralidad) de dosis individuales, administradas a intervalos de entre aproximadamente 1 y 4 semanas, preferiblemente cada dos semanas, hasta que los efectos secundarios se eleven hasta un nivel no deseable o la enfermedad evolucione hasta un nivel no deseable. El
 25 equivalente de Ab 31.1 y/o equivalente de anticuerpo coespecífico para 31.1 pueden administrarse mediante cualquier vía convencional; preferiblemente, para someter a prueba si un paciente tolera la formulación (es decir, el paciente no manifiesta una reacción alérgica y/u otra reacción tóxica no deseable), en primer lugar, puede administrarse por vía subcutánea, y una vez que se muestra su tolerancia adecuada, puede administrarse por vía intravenosa.

30 En un ejemplo no limitativo, específico, un protocolo según la invención puede ser tal como sigue.

Usando procedimientos asépticos, puede filtrarse un equivalente de Ab 31.1 "humanizado" y/o equivalente de anticuerpo coespecífico para 31.1, producido usando técnicas de biotecnología convencionales, a través de un filtro
 35 de proteínas de bajo peso molecular de 0,22 micrómetros en una botella de infusión de vidrio o una bolsa de infusión que no contiene DEHP que contienen cloruro de sodio al 0,9 % hasta una concentración final de 0,4 mg/ml. Puede mezclarse suavemente lo infundido. Si se observa que la infusión está turbia, esta no debe administrarse.

40 Para determinar si un paciente tolera el tratamiento con el equivalente de Ab 31.1 "humanizado" o equivalente de anticuerpo coespecífico para 31.1, puede medicarse previamente al paciente con difenhidramina 25 mg i.v. y paracetamol 650 mg v.o., y entonces pueden inyectarse por vía subcutánea 30 microgramos de equivalente de Ab 31.1 o equivalente de anticuerpo coespecífico para 31.1. Si no se produce toxicidad alérgica o se produce una toxicidad alérgica de grado 1, se realizará el tratamiento intravenoso. Si se produce una toxicidad alérgica de grado
 45 1, será necesaria la resolución de la toxicidad antes de continuar con la inyección intravenosa.

Si el paciente tolera la dosis de prueba subcutánea descrita en el párrafo anterior, el paciente puede tratarse con una primera infusión de 25 mg del equivalente de Ab 31.1 o equivalente de anticuerpo coespecífico para 31.1 durante 2 horas. Puede proporcionarse medicación previa en forma de difenhidramina 25 mg i.v. y paracetamol 650 mg v.o. Entonces, puede observarse al paciente para detectar cualquier posible efecto secundario durante 6 horas tras la inyección. Pueden monitorizarse los signos vitales del paciente antes de la inyección, y cada 15 minutos durante la primera hora de tratamiento, cada 30 minutos durante dos horas a continuación, y cada hora a continuación hasta 6 horas tras la finalización de la infusión.

50 Si se encuentra que se tolera la primera infusión, tras 2 semanas, entonces el paciente puede recibir una infusión de 50 mg del equivalente de Ab 31.1 o equivalente de anticuerpo coespecífico para 31.1, en un volumen de 100 cm³ de PBS u otro diluyente adecuado, durante 4 horas usando el mismo protocolo clínico tal como se expone en el párrafo anterior. Si también se encuentra que se tolera esta segunda infusión, entonces el paciente puede recibir infusiones de 100 mg del equivalente de Ab 31.1 o equivalente de anticuerpo coespecífico para 31.1 en 100 cm³ de diluyente durante 4 horas cada dos semanas, usando el protocolo descrito anteriormente. Entonces el paciente puede
 60 continuar tal tratamiento hasta que se desarrolle intolerancia o se produzca evolución de la enfermedad, y preferiblemente durante un máximo de 4 meses. Si se produce alguna toxicidad de grado 3 o superior debido al tratamiento, el paciente puede interrumpir el tratamiento de manera permanente. Si se considera que la toxicidad no está relacionada con el tratamiento, el paciente puede reanudar el tratamiento tras la recuperación de la toxicidad. Si se produce alguna toxicidad de grado 2 durante o tras el tratamiento, la infusión puede detenerse convenientemente.
 65 Si se produce recuperación hasta grado 0, entonces puede reanudarse la infusión. Si no se ha producido la recuperación en el momento del siguiente tratamiento planeado, puede retrasarse el tratamiento hasta que se haya

producido recuperación hasta grado 0. Si no se produce la recuperación hasta grado 0 en el plazo de 4 semanas, el tratamiento puede interrumpirse de manera permanente. Si se produce alguna reacción alérgica de grado 2 o superior, puede detenerse el tratamiento y preferiblemente no puede proporcionarse ninguna infusión adicional.

- 5 En realizaciones no limitativas, específicas de la invención, lo siguiente puede servir como criterios para seleccionar pacientes adecuados para el tratamiento:
- a) el paciente puede padecer un adenocarcinoma del páncreas recurrente o metastásico confirmado de manera histológica, en el que el tumor reacciona con un anticuerpo de la invención que se pretende usar;
 - 10 b) puede haber fracasado el tratamiento del paciente mediante un régimen convencional para cáncer de páncreas metastásico;
 - c) la enfermedad en el paciente puede ser medible por uno o más de los siguientes:
 - 15 i) exploración física;
 - ii) tomografía computarizada u otro estudio radiológico;
 - iii) niveles de CEA; y/o
 - iv) niveles de Ca 19-9;
 - d) el paciente puede tener 18 años o más;
 - 20 e) el paciente puede presentar un estado general según la OMS de 0, 1 o 2;
 - f) el pronóstico del paciente puede indicar una esperanza de vida de al menos 12 semanas;
 - g) las pruebas hematológicas del paciente pueden indicar los siguientes valores:
 - 25 i) leucocitos > 3.000;
 - ii) hemoglobina > 10; y
 - iii) plaquetas > 100.000;
 - h) los valores de química clínica pueden ser tal como sigue:
 - 30 Creatinina, bilirrubina, aspartato transaminasa, alanina transaminasa, fosfatasa alcalina y bilirrubina son todos inferiores o iguales a 2 veces el límite superior de lo normal; y/o
 - i) el paciente tiene acceso venoso periférico adecuado para la toma de muestras de sangre repetida.
 - 35 En realizaciones no limitativas específicas de la invención, lo siguiente puede servir como criterios para excluir a pacientes que pueden ser inadecuados para el tratamiento:
 - a) pueden haber transcurrido menos de 4 semanas desde la quimioterapia anterior (o 6 semanas para nitrosoureas o mitomicina C), desde el tratamiento con modificadores de la respuesta biológica o desde la radioterapia;
 - 40 b) actualmente el paciente recibe terapia con esteroides
 - c) la paciente está embarazada (se aconseja a los hombres y las mujeres en el estudio, si son fértiles, que practiquen anticoncepción eficaz);
 - d) el paciente es una mujer en periodo de lactancia;
 - 45 e) el paciente padece un estado comórbido no maligno debilitante, tal como infección activa o una complicación intercurrente aguda de cáncer;
 - f) existe una implicación del sistema nervioso central;
 - g) el paciente ha recibido previamente un trasplante de médula ósea u otro órgano;
 - h) el paciente tiene una historia de otro cáncer, excepto cáncer de la piel distinto de melanoma tratado adecuadamente o cáncer de cuello uterino in situ;
 - 50 i) se ha expuesto previamente al paciente a anticuerpos monoclonales o policlonales murinos; y/o
 - j) se sabe que el paciente es positivo para el VIH.
- 55 Durante el transcurso del estudio, ejemplos no limitativos de reacciones adversas incluyen disnea, hipotensión, cianosis, exantema, broncoespasmo, escalofríos, rigidez, dolor de espalda, fiebre, cianosis, náuseas, vómitos, palpitaciones o cualquier otra reacción adversa.
- En realizaciones no limitativas de la invención, pueden realizarse de manera deseable las siguientes pruebas de laboratorio para evaluar a pacientes que van a tratarse mediante el protocolo. Con respecto a las pruebas de hematología, pueden obtenerse un hemograma completo, fórmula leucocitaria y recuento de plaquetas antes de cada infusión y semanalmente durante el tratamiento hasta cuatro semanas tras la última inyección. Con respecto a las pruebas de química clínica, puede obtenerse semanalmente un panel químico completo que mide glucosa, sodio, potasio, bicarbonato, cloruro, nitrógeno ureico, creatinina, ácido úrico, calcio, fosfato inorgánico, proteína total, albúmina, lactato deshidrogenasa, aspartato transaminasa, alanina transaminasa y fosfatasa alcalina durante el tratamiento y hasta cuatro semanas tras la última inyección. Con respecto a pruebas de laboratorio especiales, pueden recogerse muestras de suero obtenidas de 10 cm³ de sangre antes de y en el plazo de dos minutos tras

- 5 cada inyección, en tiempos de 15 min., 30 min., 60 min., 2, 4, 24 y 72 horas tras la finalización de la primera inyección y cada dos semanas después de eso antes de cada inyección y hasta cuatro semanas tras el último tratamiento y procesarse para la detección de equivalente de Ab 31-1 y/o equivalente de anticuerpo coespecífico para 31.1 administrado. Entonces pueden usarse estas muestras de suero para determinar ADCC, concentración de anticuerpos y la presencia de anticuerpos humanos dirigidos contra el equivalente de anticuerpo administrado. Puede realizarse un análisis de orina en la inclusión y antes de cada inyección, así como cuatro semanas después de la última inyección, realizándose un examen microscópico en cualquier muestra anómala.
- 10 En diversas realizaciones de la invención, pueden realizarse de manera deseable las siguientes evaluaciones de seguridad. Para cada infusión, pueden obtenerse los signos vitales incluyendo la temperatura, el pulso y la tensión arterial del paciente antes y después de cada infusión. Puede registrarse el pulso y la tensión arterial cada quince minutos durante la primera hora de infusión y luego cada media hora durante dos horas, seguido por cada hora hasta 6 horas tras la finalización de la infusión. Puede observarse a los pacientes y monitorizarse los signos vitales hasta seis horas tras la finalización de la infusión o hasta el regreso al nivel inicial de los signos vitales.
- 15 Pueden realizarse una evaluación inicial y evaluaciones posteriores de la respuesta del paciente al tratamiento tal como sigue. Puede realizarse la medición del tumor mediante exploración física y/o estudios radiológicos especiales o convencionales tales como radiografía de tórax, tomografía computarizada, obtención de imágenes por resonancia magnética o ecografía. Si existe más de una lesión medible, deben medirse las lesiones representativas. Pueden registrarse las mediciones perpendiculares más largas de las lesiones representativas antes del tratamiento y cada ocho semanas. Pueden monitorizarse regularmente los niveles de Ca 19.9, por ejemplo, mensualmente.
- 20 Preferiblemente se obtiene el consentimiento informado por escrito para cada paciente que va a tratarse. Debe proporcionársele a cada paciente una descripción verbal del tratamiento, sus riesgos y beneficios potenciales, así como tratamientos alternativos disponibles, antes de firmar el consentimiento por escrito.
- 25 Durante el transcurso del tratamiento, pueden administrarse hemoderivados, antibióticos, antieméticos, analgésicos u otras medicaciones para afecciones médicas coexistentes estables según sea apropiado.
- 30 El tratamiento puede interrumpirse en un paciente si existen pruebas de enfermedad progresiva, si se produce una reacción adversa grave o inesperada, o por otras razones apropiadas desde el punto de vista médico.
- 35 Además de los usos terapéuticos descritos en el presente documento, los anticuerpos 31.1 y equivalentes funcionales de los mismos pueden usarse para diagnosticar carcinoma de páncreas en un sujeto. Los procedimientos de diagnóstico de la invención se basan en el descubrimiento de que el anticuerpo 31.1 se une selectivamente a un antígeno expresado en células de carcinoma de páncreas, pero no en células normales.
- 40 Según la invención, puede usarse la medición de los niveles de reactividad de anticuerpo monoclonal 31.1 en muestras derivadas de un sujeto para el diagnóstico de enfermedades tales como carcinoma de páncreas. La detección de la reactividad del anticuerpo monoclonal 31.1 en una muestra de un sujeto puede llevarse a cabo mediante cualquiera de varios procedimientos. Los procedimientos de diagnóstico preferidos pueden implicar, por ejemplo, inmunoensayos en los que se detecta el antígeno reactivo para 31.1 mediante su interacción con un anticuerpo monoclonal 31.1. Los inmunoensayos útiles en la práctica de la invención incluyen, pero no se limitan a, sistemas de ensayo que usan técnicas tales como transferencias de tipo Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación de complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, inmunoensayos con proteína A, por mencionar unos pocos.
- 45 Se obtiene una muestra biológica, tal como tejido pancreático u otro tejido biológico, a partir de un sujeto que se sospecha que tiene un cáncer particular o riesgo para el cáncer. Se solubilizan alícuotas de tejidos completos, o células, usando uno cualquiera de una diversidad de cócteles de solubilización conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, puede solubilizarse tejido mediante la adición de tampón de lisis que comprende (por litro) urea 8 M, 20 ml de tensioactivo Nonidet P-40, 20 ml de anfolitos (pH 3,5-10), 20 ml de 2-mercaptoetanol, y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0,2 mM en agua desionizada destilada.
- 50 Los inmunoensayos para detectar la expresión del antígeno reactivo para 31.1 comprenden normalmente poner en contacto la muestra biológica, tal como una muestra de tejido derivada de un sujeto, con el anticuerpo monoclonal 31.1 en condiciones tales que puede producirse una reacción de unión antígeno-anticuerpo inmuno-específica, y detectar o medir la cantidad de cualquier unión inmuno-específica mediante el anticuerpo. En un aspecto específico, puede usarse tal unión de anticuerpo, por ejemplo, para detectar la presencia y aumento de la producción del antígeno reactivo para 31.1, en el que la detección del antígeno es una indicación de un estado de enfermedad.
- 60

6. EJEMPLO: PREPARACIÓN DE VECTOR pRc/CMV

Se preparó el vector pRc/CMV usando una serie de plásmidos, tal como se representa en la figura 1A-F. Se clonaron las cadenas pesada y ligera de Chi 31.1-1 en el vector pCR (figura 1A) mediante clonación con TOPO (topoisomerasa I). Las secuencias usadas para insertar las secuencias de cadena pesada y ligera en el vector pCR mediante PCR son tal como sigue:

a) para la inserción de la región que codifica cadena ligera de Chi31.1-1 en un sitio de inserción BamH1/XbaI:

i) Chi31.1-LcBamH1(S):

5'- ATA GGA TCC ATG AAG TCA CAG ACC CAG GTC TTC G-3'

ii) Chi31.1-LcXbaI (A):

5'-TTT CTA GAC TAA CAC TCT CCC CTG TTG AAG C-3'

b) para la inserción de la región que codifica cadena pesada de Chi31.1-1 en un sitio de inserción EcoRI/NotI:

i) Chi31.1-HcEcoRI(S):

5'-ATA GAA TTC ATG GCT TGG GTG TGG ACC TTG CT-3'

ii) Chi31.1-HcNotI(A):

5'-TTG CCG CCG CTC ATT TAC CCG GAG-3'

Entonces, estos se clonaron del vector pCR en el vector pDCM-dhfr, de tal manera que se insertó la región que codifica la cadena ligera en el sitio BamHI/XbaI (bajo el control del promotor de citomegalovirus ("CMV")), y se insertó la región que codifica la cadena pesada en el sitio EcoRI/NotI, bajo el control de un segundo elemento promotor de CMV (figura 1F).

Se preparó el vector pDCM-dhfr usando la serie de etapas expuesta en las figuras 1B-E. Una serie de construcciones de vector usando algunos componentes relacionados se describe en Ryu et al., 1996, Hum. Antibod. Hybridomas 7:113-122 (basado en el vector pRc/CMV (Invitrogen); véanse, por ejemplo, página 115 y figura 4 de Ryu et al.); Jin et al., 1995, Virus Res. 38:269; y Lee et al., 1999, Molec. Immunol. 36:61-71 (véase, por ejemplo, la figura 2 de esta publicación).

Básicamente, se usó el vector pcDNA3 (Invitrogen) (figura 1B) como la base para el vector pDCM (figura 1C), en el que se usó digestión con pares de enzimas de restricción seguido por nuevo ligamiento, en preparaciones paralelas, para destruir determinados sitios de escisión y mantener otros en vector cadena abajo de las secuencias promotoras de CMV. Específicamente, tal como se muestra en la figura 1C, la digestión de pcDNA3 en primer lugar con HindIII y BamHI, seguido por nuevo ligamiento y luego digestión con XhoI y ApaI, seguido por nuevo ligamiento, dio como resultado la conservación de los sitios BstXI, EcoRI, EcoRV, BstXI y NotI cadena abajo del promotor; la posterior escisión con BsmI linealizó la molécula entre los genes de resistencia a ampicilina y neomicina (componente 1). En paralelo, la digestión de pcDNA3 con BstXI y NotI, seguido por la eliminación del fragmento pequeño y nuevo ligamiento, eliminó los sitios BstXI, EcoRI, EcoRV, BstXI y NotI y dejó los sitios HindIII, KpnI, BamHI, XhoI, XbaI y ApaI intactos; la escisión con PvuII y NruI dio lugar a un fragmento que contenía el promotor CMV, los sitios conservados y BGHpA (componente 2). Se insertó el componente 2 entre los extremos del componente 1, lo que dio como resultado pDCM, que tenía dos sitios de inserción diferentes para los genes cadena abajo de dos elementos promotores de CMV respectivos. Tal como se muestra en la figura 1E, entonces puede insertarse un gen de dihidrofolato reductasa ("*dhfr*") de KC-dhfr en pDCM (véase Lee et al., 1999, Molec. Immunol. 36:61-71) para producir pDCM-dhfr. Como alternativa, tal como se muestra en la figura 1D, puede incorporarse el gen *dhfr* de KC-dhfr en pcDNA3, para producir pCdhfr, que entonces puede modificarse por ingeniería genética mediante procedimientos análogos a los mostrados en la figura 1C para producir el casete de promotor CMV/sitio de inserción doble.

Entonces, se clonaron las secuencias que codifican la cadena pesada y ligera de Chi31.1-1 del vector pCR en pDCM-dhfr, formando pRc/CMV, que puede transferirse en las células CHO *dhfr*-, después de lo cual pueden recogerse moléculas de inmunoglobulina quiméricas expresadas según técnicas convencionales.

7. EJEMPLO: RESPUESTA INMUNITARIA HUMANA A Chi31.1-1

Para determinar si los anticuerpos quiméricos de 31.1 pueden inducir una respuesta inmunitaria, se recogió plasma de un sujeto humano a quien se le había administrado anticuerpo monoclonal quimérico Chi31.1-1. Se sometió a prueba la presencia de una reacción inmunitaria en el paciente frente al anticuerpo quimérico usando el siguiente

ensayo.

Se recubrieron placas de microtitulación de 96 pocillos con anticuerpo Chi31.1-1, usando una solución que tenía 10 microgramos por mililitro, con 100 microlitros por pocillo. Se biotiniló una preparación de Chi31.1-1. Entonces, se introdujo o bien el plasma de control o bien el plasma del paciente (50 microlitros) en los pocillos, y se añadieron 50 microlitros del Chi31.1-1 biotinilado. Entonces, se incubaron las placas durante noventa minutos a 37 grados centígrados y luego se lavaron los pocillos y se añadió conjugado de estreptavidina-peroxidasa del rábano rusticano. Entonces, se lavaron tres veces los pocillos. Luego, se añadió sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametil-bencidina), y se incubaron las placas durante 20 minutos. Se añadió disolución de parada y se determinó la cantidad del sustrato que reaccionó.

Los resultados se presentan en la tabla C, y se expresan en nanogramos de Chi31.1-1 unidos por mililitro de plasma. Se consideran positivos los resultados mayores de 2 veces por encima del nivel inicial previo al tratamiento. Se encontró que los valores de unión de nivel inicial no específicos de 3 muestras normales sanas eran de 4 más o menos 2 nanogramos por mililitro. Se determinó el patrón usando pocillos recubiertos con IgG1 anti-humano de cabra con diversas concentraciones de anticuerpo monoclonal Chi31.1-1 biotinilado.

TABLA C.
Respuesta inmunitaria humana frente a anticuerpo monoclonal Chi31.1-1 (HAMA)

Tiempo	ng/ml unido
0 hora (previo al tratamiento)	2
1 hora	3
2 horas	2
3 horas	3
4 horas	3
5 horas	2
6 horas	3
Día siguiente	4
1 semana	3
2 semanas	5

20

8. EJEMPLO: ACTIVIDAD ADCC DE ANTICUERPO CHI 31.1 DE CHO

La siguiente sección describe experimentos que demuestran que el anticuerpo monoclonal Chi 31.1 de CHO tiene actividad biológica asociada con la destrucción de tumores. Específicamente, se demostró que el anticuerpo tiene citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

25

Se usó un ensayo de liberación de ¹¹¹In de cuatro horas para medir la actividad de ADCC. Las células diana fueron la línea celular de tumor de colon SW1643 y la línea celular de cáncer de páncreas PANC-1. Se usó UPC-10 como un anticuerpo de control. Se marcaron las células diana con 50 µCi de ¹¹¹In-oxiquinolina durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron células diana (1 x 10⁴) en 50 µl a placas de 96 pocillos. Se sometieron a ensayo proporciones de células efectoras con respecto a células diana de 100:1, 50:1 y 25:1 en presencia de 31.1 de CHO (1 mg/pocillo). Se incubaron las placas durante cuatro horas a 37° en atmósfera humidificada que contenía CO₂ al 5 %. Se recogió el sobrenadante para el recuento gamma con el uso de marcos de colector de células Skatron. Se llevaron a cabo experimentos por triplicado. Se calculó la lisis específica con el uso de la siguiente fórmula:

30

35

$$\% \text{ lisis} = 100 \times \frac{\text{liberación observada (cpm)} - \text{liberación espontánea (cpm)}}{\text{liberación total (cpm)} - \text{liberación espontánea (cpm)}}$$

Tal como se presenta en la figura 6A y 6B, el anticuerpo 31.1 de CHO, pero no el anticuerpo UPC-10 de control, pudo mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos contra las células diana.

40

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Arlen, Myron
Tsang, Kwong Y.

45

<120> TERAPIA DE ANTICUERPOS MONOCLONALES PARA EL CÁNCER DE PÁNCREAS

<130> 34133-PCT 072771.0111

50

<140> PCT/US02/09193

ES 2 619 313 T3

<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 4

5
 atggccttggg tgtggacctt gctattcctg atggcagctg cccaaagtgc ccaagcacag 60
 atccagttgg tgcagtcctg acctgagctg aagaagcctg gagagacagt caagatctcc 120
 tgcaaggctt ctgggtatac cttcacaac tatggaatga actgggtgaa gcaggctcca 180
 ggaaaggggt taaagtggat gggctggata aacacctaca ctggagagcc aacatatgct 240
 gatgacttca agggacggtt tgccttctct ttggaaacct ctgccagcac tgcctatttg 300
 cagatcaaca acctcaaaa tgaggacacg gatacatatt tctgtgcaag agcctactat 360
 ggtaaatact ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctctc a 411

<210> 5
<211> 411
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 5

10
 15
 tgaggagact gtgagagtgg tgccttggcc ccagtagtca aagtatttac catagtaggc 60
 tcttgcacag aaatatgtag ccgtgtcctc atttttgagg ttgttgatct gcaaataggc 120
 agtgctggca gaggtttcca aagagaaggc aaaccgtccc ttgaagtcac cagcatatgt 180
 tggctctcca gtgtagggtt ttatccagcc catccacttt aaaccctttc ctggagcctg 240
 cttcaccag ttcattccat agtttgtgaa ggtataccca gaagccttgc aggagatctt 300
 gactgtctct ccaggcttct tcagctcagg tccagactgc accaactgga tctgtgcttg 360
 ggcactttgg gcagctgcc a tcaggaatag caaggtccac acccaagcca t 411

<210> 6
<211> 137
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 6

20
 Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
 1 5 10 15
 Ala Gln Ala Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys
 20 25 30
 Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala
 65 70 75 80
 Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr
 100 105 110
 Tyr Phe Cys Ala Arg Ala Tyr Tyr Gly Lys Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 7
<211> 34
<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> cebador oligonucleotídico

<400> 7
 ataggatcca tgaagtcaca gaccaggctc ttcg 34

<210> 8
<211>31

ES 2 619 313 T3

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> cebador oligonucleotídico

<400> 8
ttctagact aacactctcc cctgtgaag c 31

10 <210> 9
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> cebador oligonucleotídico

<400> 9
atagaattca tggctgggt gttgacctg ct 32

20 <210> 10
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> cebador oligonucleotídico

<400> 10
ttgcgccgc tcattaccc ggag 24

30

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo recombinante aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo que es un anticuerpo monocatenario, un fragmento F(ab) o un fragmento F(ab)₂, para su uso en el tratamiento o diagnóstico in vivo del
- 5 cáncer de páncreas en un sujeto, donde el anticuerpo recombinante aislado o un fragmento de unión a antígeno del mismo comprende (1) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; y (2) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o una variante humanizada de dicho anticuerpo recombinante o fragmento de unión a antígeno del mismo.
- 10 2. El anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la cadena ligera de dicho anticuerpo está codificada por ácido nucleico de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1.
3. El anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la cadena pesada de dicho anticuerpo está codificada por ácido nucleico de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 4.
- 15 4. El anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno es un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.
5. El anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 4, donde dicho anticuerpo quimerizado se expresa mediante una línea celular depositada bajo el n.º de registro de ATCC CRL-12316.
- 20 6. El anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 1, dicho anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo está unido a un agente bioactivo.
- 25 7. Una composición terapéutica para uso en el tratamiento de cáncer pancreático que comprende el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 6.
8. Un procedimiento para detectar si un sujeto tiene un carcinoma pancreático que comprende,
- 30 (a) poner en contacto una muestra del sujeto con un anticuerpo recombinante o fragmento de unión a antígeno del mismo que sea un anticuerpo monocatenario, un fragmento F(ab) o un fragmento F(ab)₂, donde el anticuerpo recombinante aislado o un fragmento de unión al antígeno del mismo comprende (1) una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3; y (2) una región variable de
- 35 cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o una variante humanizada de dicho anticuerpo recombinante o fragmento de unión a antígeno del mismo, y
- (b) detectar la presencia del complejo antígeno-anticuerpo,
- donde la presencia de un complejo antígeno-anticuerpo indica la presencia de cáncer pancreático.
- 40 9. El procedimiento de la reivindicación 8, donde dicha muestra es un tejido.
10. El procedimiento de la reivindicación 8, donde la muestra del sujeto se obtiene después de la cirugía de un sujeto que se sospecha que tiene cáncer de páncreas.
- 45 11. El procedimiento de la reivindicación 8, donde dicho anticuerpo o su fragmento de unión al antígeno es un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.
12. El procedimiento de la reivindicación 11, donde dicho anticuerpo quimérico se expresa mediante una línea celular depositada bajo el n.º de registro de ATCC CRL-12316.
- 50 13. El procedimiento de la reivindicación 8, donde la cadena ligera de dicho anticuerpo está codificada por el ácido nucleico de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1.
14. El procedimiento de la reivindicación 8, donde la cadena pesada de dicho anticuerpo está codificada por el ácido nucleico de la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 4.
- 55 15. El procedimiento de la reivindicación 8, donde dicha detección del carcinoma de páncreas en dicho sujeto se lleva a cabo mediante un procedimiento de inmunoensayo seleccionado del grupo que consiste en transferencias de Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitina, reacciones de precipitina de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación de complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes e inmunoensayos con proteína A.
- 60 16. El procedimiento de la reivindicación 15, donde dicho procedimiento de inmunoensayo detecta o mide la cantidad de unión inmunoespecífica de dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo con dicho epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal 31.1, donde la presencia o aumento de la cantidad de dicho epítipo indica
- 65

la presencia de cáncer de páncreas en dicho sujeto.

17. El procedimiento de la reivindicación 8, donde el sujeto tiene cáncer o está en riesgo de cáncer.

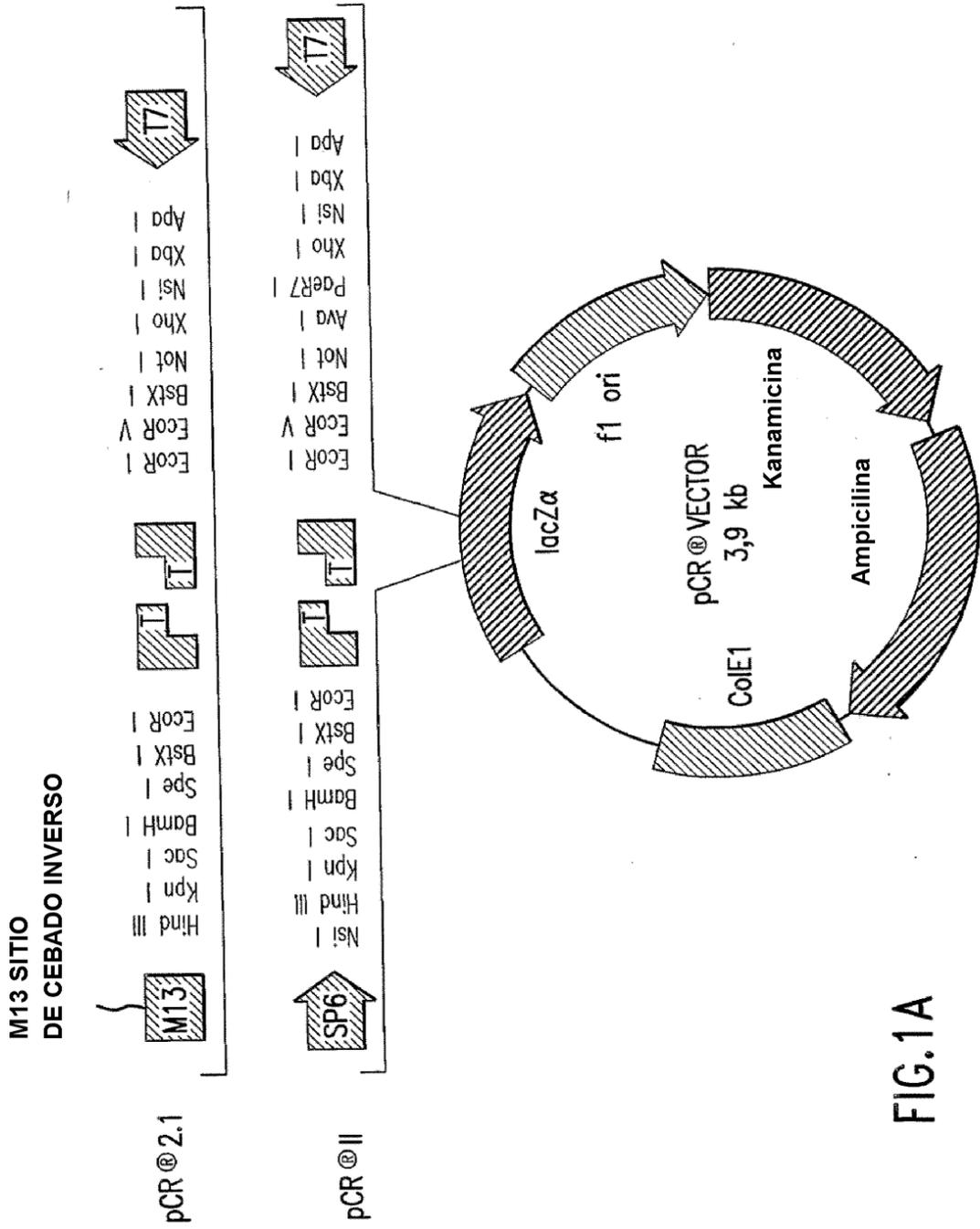
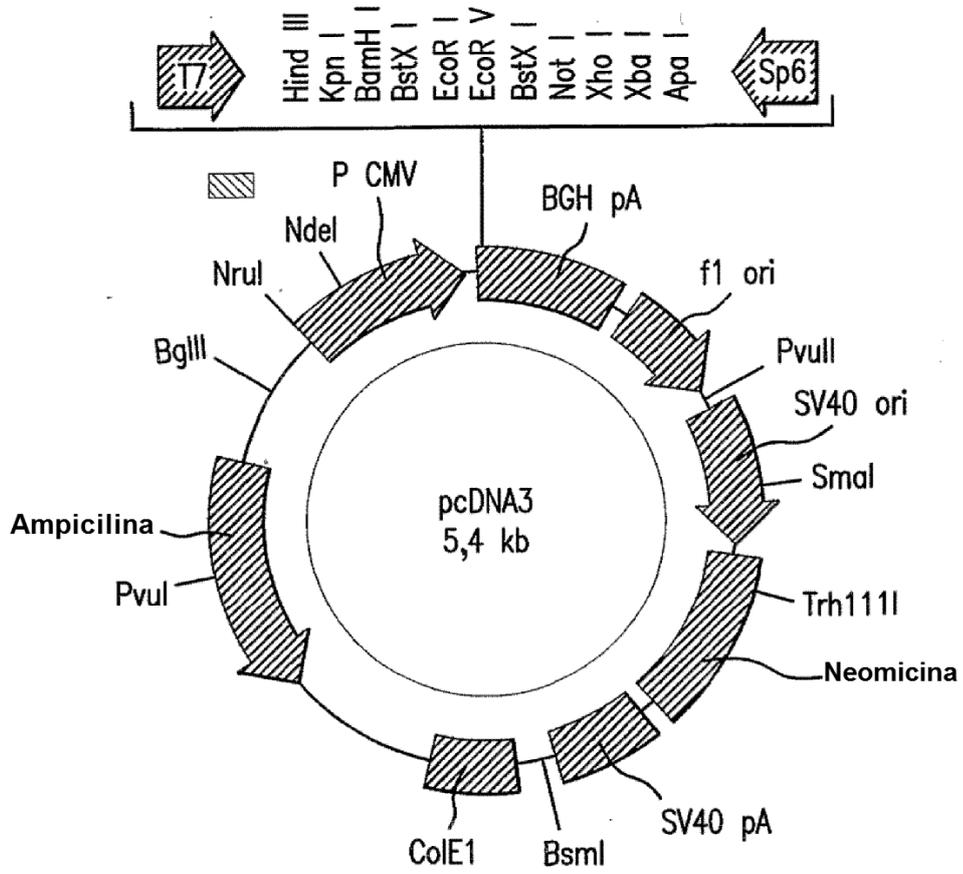


FIG.1A



NruI-PvuII-ligados en BsmI

FIG.1B

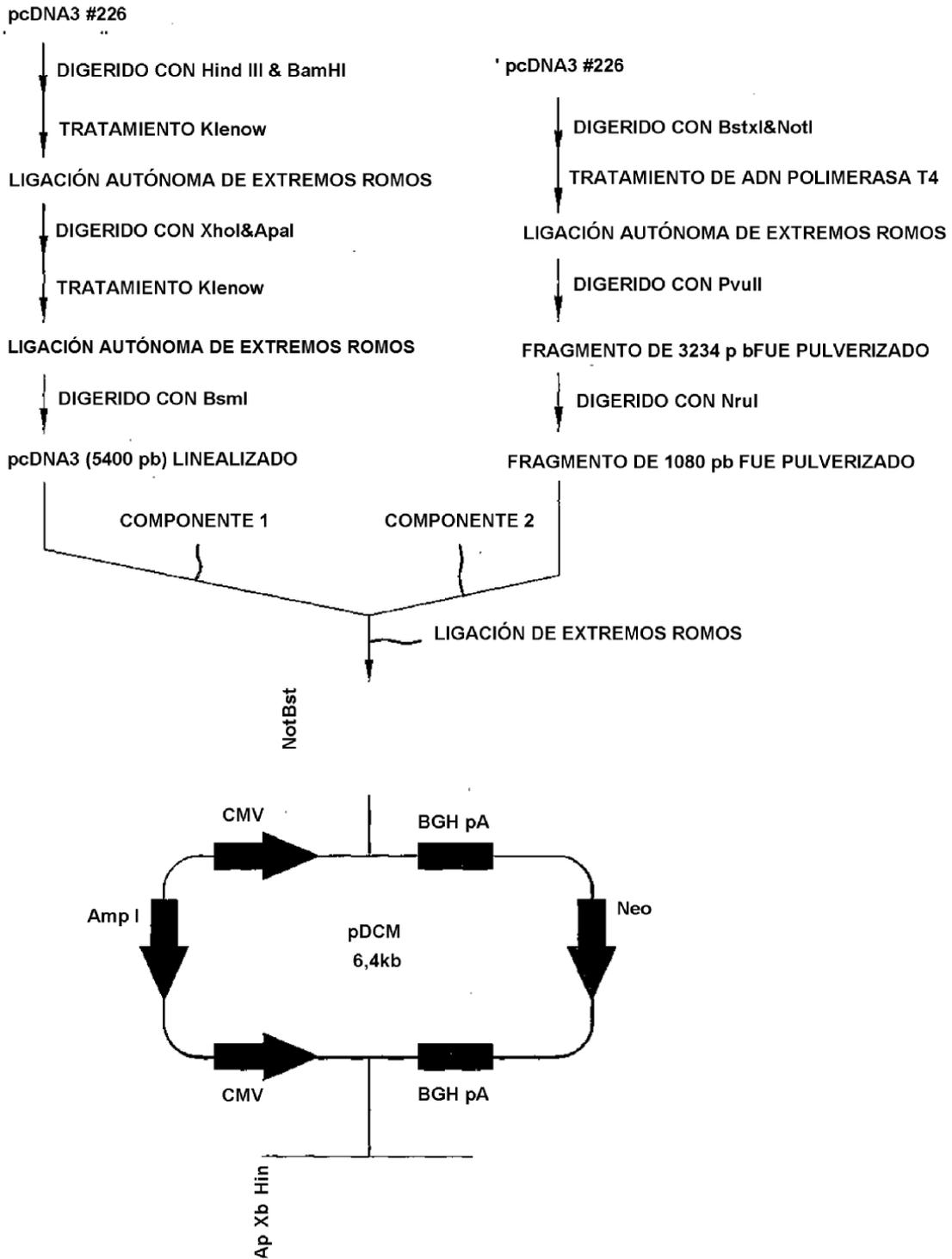


FIG. 1C

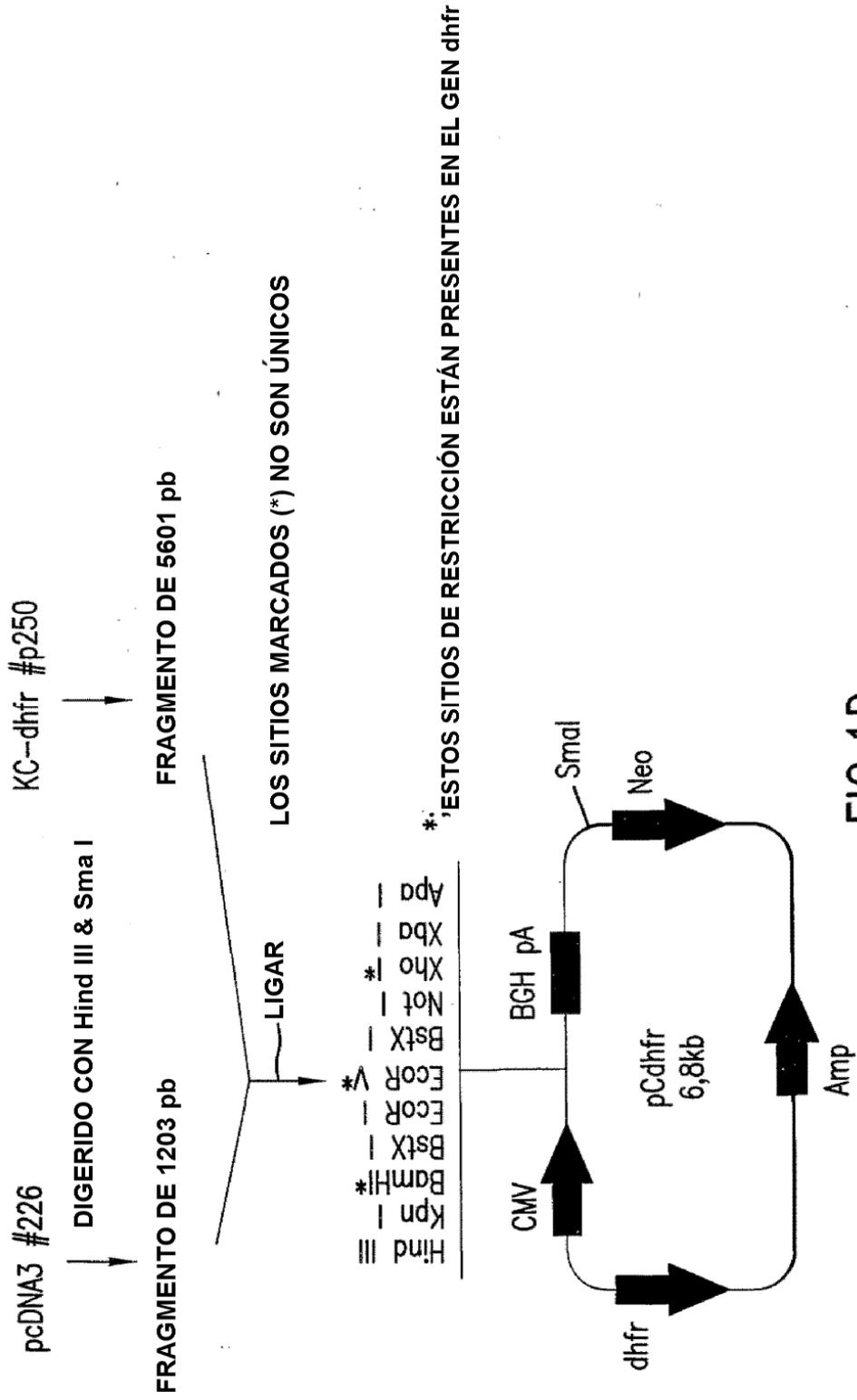


FIG.1D

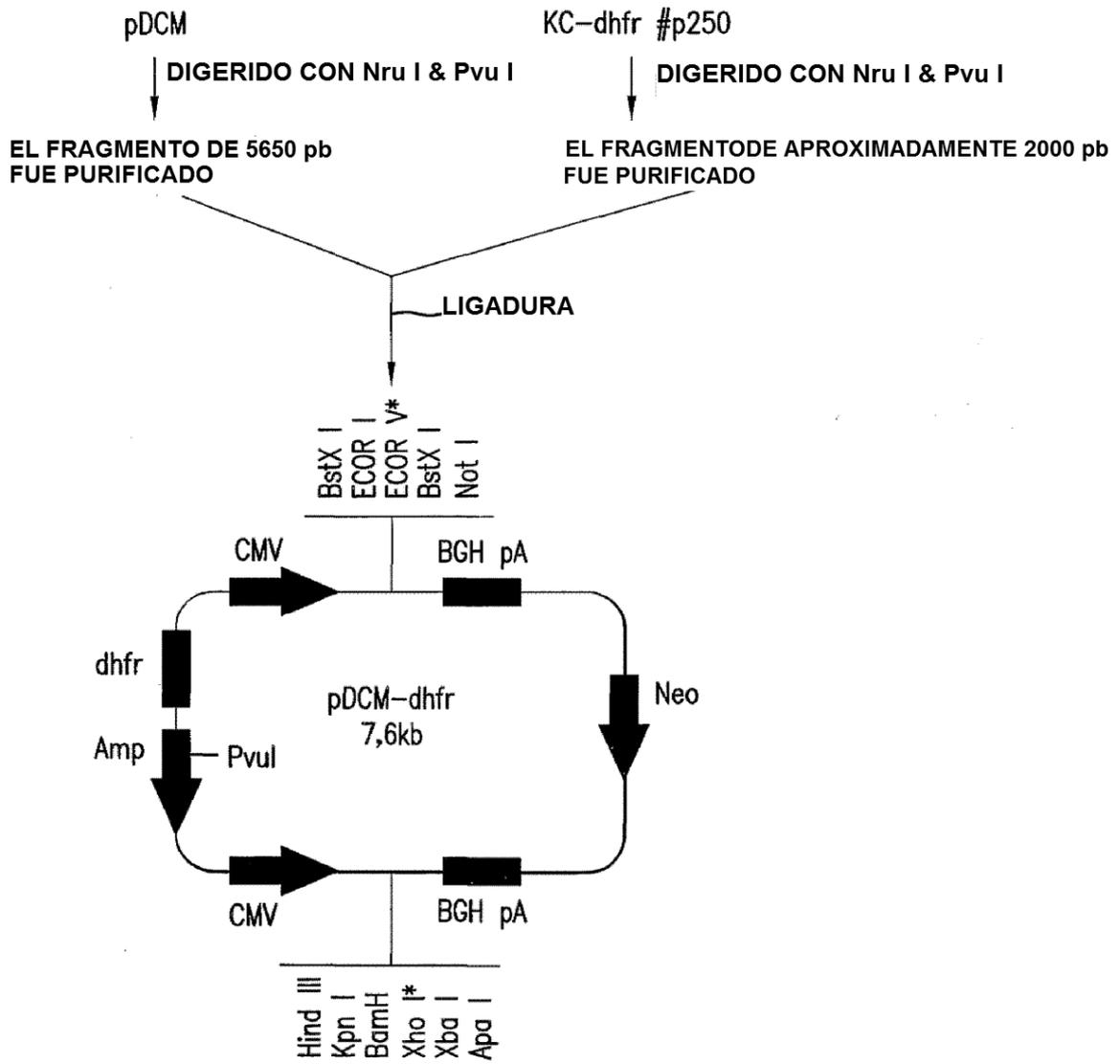


FIG.1E

EL GEN DE LA CADENA LIGERA Chi31.1 HA SIDO INSERTADO EN LOS SITIOS BamHI Y XbaI DEL VECTOR pDCM-dhfr.

EL GEN DE LA CADENA PESADA Chi31.1 HA SIDO INSERTADO EN LOS SITIOS EcoRI Y NotI DEL VECTOR pDCM-dhfr.

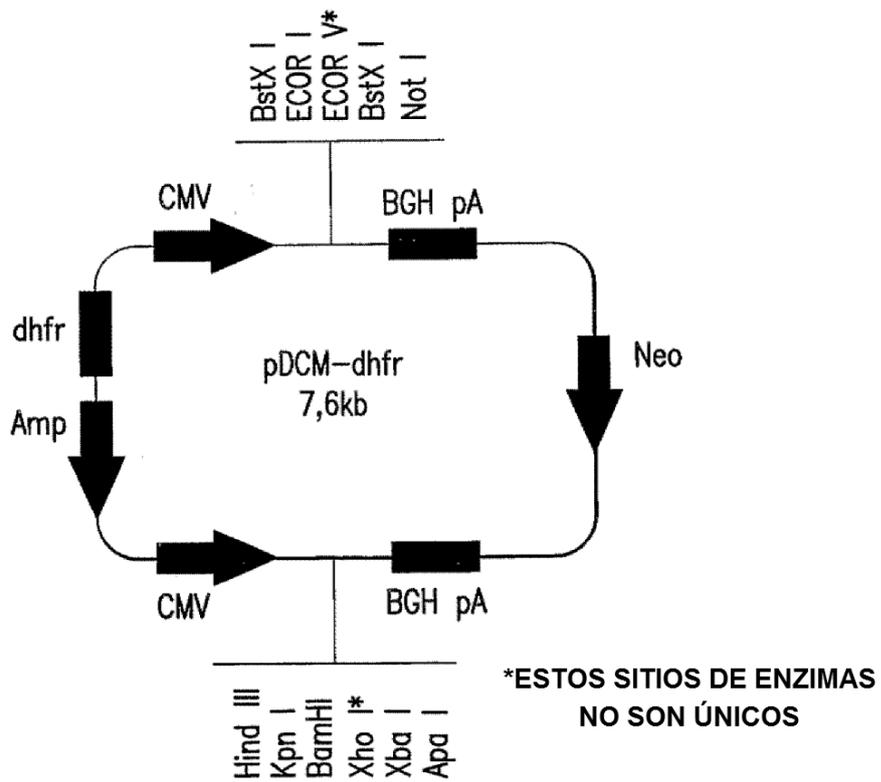


FIG.1F

Secuencia de ADN traducida de la región variable de cadena ligera de Chi31.1.

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120			
* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *			
ATGAAGTCACAGACCCAGGCTTCGTATTTCTACTGCTCTGTGTCTGGTGCATGGGAGTATTGTGATGACCCAGACTCCCAAATTCCTGCTTGTATCAGCAGGAGACAGGGTTACC	TACTTCAGTGTCTGGTCCAGAAGCATAAAGATGACGAGACACAGACCAGAGTACCCCTCATAACTACTGGGCTGAGGGTTAAGGACGAACATAGTCGTCCTGTCCCAATGG	MetLysSerGlnThrGlnValPheValPheLeuLeuLeuCysValSerGlyAlaHisGlySerIleValMetThrGlnThrProLysPheLeuLeuValSerAlaGlyAspArgValThr>	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240
* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	
ATAACCTGCAAGGCCAGTCAGAGTGTGAGTAATGATGTAGCTTGGTACCACAGAAACCAGGGCAGTCTCTAAACTGCTGATATACTATGCTATGCATCCAATCGCTACACTGGAGTCCCTGAT	TATTGGACGTTCCGGTCAGTCTCACACTCATTTACTACATCGAACCATGGTTGCTTTGGTCCCGTCAGAGGATTTGACCGACTATATGATACGTAGGTTAGCGATGTGACCTCAGGGACTA	IleThrCysLysAlaSerGlnSerValSerAsnAspValAlaTrpTyrGlnGlnLysProGlyGlnSerProLysLeuLeuIleTyrTyrAlaSerAsnArgTyrThrGlyValProAsp>	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360
* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	
CGCTTCAC TGGCAGTGGATATGGGACGGATTTACATTTCCACATCAGCACGTGGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTTCTGTCAGCAGGATATAGCTCTCCGCTCACGTTCCGGTCT	GCGAAGTGACCGTCACCTATACCTGCC TAAAGTGAAGTGGTAGTCGTGACACCGTCCGACTTCTGGACCGTCAAATAAAGACAGTGTCTCTTAATATCGAGAGGCGGAGTGC AAGCCACGA	ArgPheThrGlySerGlyTyrGlyThrAspPheThrPheThrIleSerThrValGlnAlaGluAspLeuAlaValTyrPheCysGlnGlnAspTyrSerSerProLeuIleThrPheGlyAla>	370	380	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	
GGGACCAAGCTGGAGCTGAACGTT	CCCTGGTTCGACCTCGACTTTGCA	GlyThrLysLeuGlnLeuLysArg>												

FIG. 2

Eco1831 I
 EcoB I
 Eco0109 I
 Ehe I
 Gdi II
 HinJCI
 Lsp1270 I
 Mme I
 Nae I
 Not I
 PpeI
 Pvu II
 SaulPI
 SgrA I
 Sse8647 I
 StySP I
 Tfi I
 Uba1326 I
 Xho II

 Eco24I
 EcoD I
 EcoR I
 Esp16 I
 Gsp I
 HinP1 I
 M. BbvSI
 MnI I
 Nar I
 Nru I
 Ppu1253 I
 Rhc I
 Sca I
 Sma I
 SsoI
 StySQ
 Tfi I
 Uba1382 I
 Xma I

 Eco311
 EcoD XXI
 EcoR V
 Esp3 I
 Hae II
 Hinc II
 M. CviBIII
 MscI
 Nci I
 Nsp I
 Ppu6 I
 R1eA I
 Scl I
 SmlI
 Ssp I
 Swa I
 Tru9 I
 UbaD I
 Xma III

 Eco47 III
 EcoDR2
 EcoR124 I
 Fau I
 HalI
 Hind III
 M. Phi3TII
 Msl I
 Nco I
 Pac I
 PpuM I
 Rrh4273I
 Sdi I
 Sna I
 SstI
 Syn II
 Tse I
 UbaEI
 Xmn I

 Eco52 I
 EcoDR3
 EcoR124 II
 FblI
 Hga I
 Hinc I
 MfeI
 Msp20 I
 NcrI
 Pau I
 Psp1406 I
 Sac I
 Sel I
 SnaB I
 Stu I
 Taq I
 Tsp32I
 Van91 I

 Eco72 I
 EcoE I
 EcoRD2
 Fru4HI
 HgiE II
 Hpa I
 Mja I
 MspA1 I
 Nde I
 Pfl1108 I
 PspAI
 Sac II
 SexA I
 Spe I
 Sty I
 Taq II
 Tth111 I
 Vsp I

 Eco82 I
 EcoICR I
 EcoRD3
 Fse I
 Hha I
 Hpa II
 Mlu I
 MspI
 NgoM I
 Pfu I
 Pss I
 Sal I
 Sfc I
 Sph I
 StylI III
 Taq II
 Uba1220 I
 Xba I

 Eco88I
 EcoK I
 EcoVIII
 Fsp I
 Hin2 I
 Hsp92 I
 Mlu1106 I
 MthZI
 Nhe I
 PinAI
 Pst I
 SanD I
 Sfi I
 Srf I
 StylJ
 Tat I
 Uba1221 I
 Xcm I

 EcoA I
 EcoN I
 EcoPrr I
 Fsu I
 Hin8 I
 Kas I
 Mtu113 I
 Mun I
 N1i387/7 I
 Pme I
 Pvu I
 Sap I
 Sgf I
 Sse8387 I
 StylKI
 Tau I
 Uba1303 I
 Xho I

FIG.3B

Secuencia de ADN traducida de la región variable de la cadena pesada de Chi31.1.

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120			
* ATGGCTGGGTTGGACCTTGGCTATTCTGATGGCAGCTGCCCAAAGTGCCTCCAGCCAGACAGATCCAGTTGGTGCAGTC TGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTCC	* TACCGAACCCACACCTGGAACGATTAAGGACTACCGTCGACGGGTTTCACGGGTTCTGTGCTAGGTCAGCCAGTCCAGACCTGGACTCGACTTCCTCGGACCTCTCTGTCAGTTCTAGAGG	* MetAlaTrpValTrpThrLeuLeuPheLeuMetAlaAlaAlaGlnSerAlaGlnAlaGlnIleGlnLeuValGlnSerGlyProGluLeuLysLysProGlyGluThrValLysIleSer>	* 130	* 140	* 150	* 160	* 170	* 180	* 190	* 200	* 210	* 220	* 230	* 240
* TGCAAGGCTTCTGGGTATACCTTACAAACTATGGAATGAACCTGGGTGAAGCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAACACCTACACTGGAGAGCCAAACATATGCT	* ACGTTCCGAAGACCCATATGGAAGTGTGGATACCTTACTTGACCCACTTCGTCGAGGTCCTCCCAAATTCACCTACCCGACCTATTTGGATGTGACCTCTCGGTTGTATACGA	* CysLysAlaSerGlyTyrThrPheThrAsnTyrGlyMetAsnTrpValLysGlnAlaProGlyLysGlyLeuLysTrpMetGlyTrpIleAsnThrTyrThrGlyGluProThrTyrAla>	* 250	* 260	* 270	* 280	* 290	* 300	* 310	* 320	* 330	* 340	* 350	* 360
* GATGACTTCAAGGGACGGTTTGCCTTCTCTTGGAAACCTCTGCCAGCCTGCCCTAATTTGCAGATCAACAACCTCAAAAATGAGGACACGGATACATAATTTCTGTGCAAGAGCCACTACTAT	* CTACTGAAGTCCCCTGCCAAACGGGAGAGAAACCTTTGGAGACGGTCGTGACGGATAAAGCTTAGTTGTTGGAGTTTTTACTCCTGTGCCGATGATAAAGACACAGCTTCGGGATGATA	* AspAspPheLysGlyArgPheAlaPheSerLeuGluThrSerAlaSerThrAlaTyrLeuGlnIleAsnAsnLeuLysAsnGluAspThrAlaThrTyrPheCysAlaArgAlaTyrTyr>	* 370	* 380	* 390	* 400	* 410							
* GGTAAACTACTTGGACTACTGGGGCCCAAGCCACCCTCTCACAGTCTCCCTCA	* CCATTTATGAACCTGATGACCCGGTTCGGTGGTGAGAGTGTCAAGAGAGT	* GlyLysTyrPheAspTyrTrpGlyGlnGlyThrThrLeuThrValSerSer>												

FIG.4

Mapa 31.1 Hv (1> 411) 280 Sitios Cortados Resumen del sitio por Enzima

Enzimas no cortantes	
Aac I	Aat II
Act I	Acs1371 I
AhaA I	A1w44I
Ape I	Apu16 I
Asp5H I	Asp78 I
Bae I	BamH I
Bca I	Bcef I
Bco163 I	Bct I
Bgl I	B1p I
Bsa I	BsaA I
Bsb I	Bsce I
BsiHKA I	BsiW I
BsoJI	Bsp117 I
BspH I	BspJ106 I
BsrG I	Bssh II
BstU I	BstX I
Cfr10 I	Cfr14 I
Csp6 I	CviA II
	Aca I
	AcsI
	AlwN I
	AquI
	Ate I
	Ban II
	Bcef I
	BcuI
	Bma I
	BsaB I
	BscG I
	BsaB I
	Bsp19I
	BspLU11 II
	Bst1473 I
	BstZ2 I
	CfrA I
	CviRII
	Aca III
	AdeI
	Ama I
	Asc I
	AtuC I
	Bbe I
	Bcg I
	BepI
	Bme142 I
	BsaF I
	BscJ I
	BsmE I
	Bsp21 I
	BspM I
	Bst29 I
	Bsu36 I
	CfrJ4I
	Dra III
	Acc III
	Afa24R I
	Aos III
	AseI
	Ava I
	BbeA I
	Bcg I
	Bfa I
	BmeII
	BsaG I
	Bse59 I
	BsmG I
	Bsp24 I
	BspST5
	Bst98 I
	BsuEII
	Chu II
	Drd I
	ACC65 I
	Afl III
	Apa I
	AspI I
	Ava III
	Bbf7411 I
	Bcl I
	Bfi89I
	BnaI
	BsaK I
	BseMI
	BsmH I
	Bsp24 I
	BsrB I
	BstAPI
	BsuMI
	Cla I
	Drd II
	AccEBI
	Afl IV
	ApaB I
	Asp16H I
	Avr II
	Bbr I
	BcnI
	Bfm I
	Bpl I
	BsaM I
	BseR I
	BsmN I
	Bsp87 I
	BsrD I
	BstE II
	CciNI
	Csp I
	Dsa I
	Ace II
	Age I
	Apal I
	Asp52 I
	Bae I
	Bbs I
	Bco102 II
	BfrB I
	Bpu1268 I
	BsaW I
	BshL
	BsoD I
	BspDI
	BsrFI
	BstHPI
	CfoI
	Csp45 I
	Eae I

FIG.5A

EcaI
 Eco47 III
 EcoDR2
 EcoR V
 Esp3 I
 Hga I
 Hinc II
 Lsp1270 I
 Mja I
 MspI
 Nla III
 Pfu I
 PshA I
 Rsa I
 SdtI
 Sma I
 SsoI
 Swa I
 TseC I
 Uba1303 I
 Xho I

 Eci I
 Eco52 I
 EcoDR3
 EcoR124 I
 Fau I
 HgiE II
 Hind III
 M. CcrMI
 Mlu I
 MthZI
 Nli387/7 I
 PinAI
 Psp1406 I
 Sac I
 Sel I
 SmI
 Ssp I
 Syn II
 Tsp32I
 Uba1326 I
 Xma I

 Eco72 I
 EcoICR I
 EcoR124 II
 Fse I
 Hha I
 Hinc I
 M. CviBIII
 Mlu1106 I
 Mun I
 Not I
 Ple I
 PspAI
 Sac II
 SexA I
 SnaB I
 SstI
 Tai I
 Tsp45 I
 Uba1382 I
 Xma III

 Eco82 I
 EcoK I
 EcoRD2
 Fsp I
 HhaII
 Hinf I
 M. CviSII
 Mlu113 I
 Nae I
 Nru I
 Pme I
 Pss I
 Sal I
 SfaN I
 Spe I
 Stu I
 Taq I
 Tsp509 I
 UbaD I
 Xmn I

 Eco1137 I
 Eco88I
 EcoN I
 EcoRD3
 Fsu I
 Hin2 I
 Hpa I
 M. Pfl3TII
 Mly I
 Nar I
 Nsi I
 PpeI
 Pst I
 SanD I
 Sfc I
 Sph I
 StylI III
 Taq II
 Tth11I I
 UbaEI

 Eco1831 I
 EcoB I
 EcoP I
 EcoPrr I
 Hae I
 Hin8 II
 Hsp92 I
 Mae III
 MscI
 Nco I
 Pac I
 Ppu1253 I
 Rhc I
 SaulPI
 Sgf I
 Sse8387 I
 StySKI
 Tau I
 Ttm I
 Vsp I

 Eco1HK I
 EcoA I
 Eco0109 I
 EcoVII
 Gdi II
 Hin8 I
 Hpa II
 Mae II
 Mme I
 Nci I
 Nsp I
 Ppu10 I
 Pvu I
 Sap I
 Sfi I
 Srf I
 StySJ
 Tat I
 Tth111 II
 Van9I I

 Eco24I
 EcoD I
 EcoP15 I
 Ehe I
 Hae II
 HinJCI
 Kas I
 MbiI
 Msl I
 NgoM I
 Pau I
 Ppu6 I
 RleA I
 Sca I
 SgrA I
 Sse8647 I
 StySP I
 Tfi I
 Uba1220 I
 Xba I

 Eco31I
 EcoD XXI
 EcoR I
 Esp16 I
 Hali
 HinP1 I
 Kpn I
 MfeI
 Msp20 I
 Nhe I
 Pfl1108 I
 PpuM I
 Rrh4273I
 Sci I
 Sim I
 Sse9I
 StyS0
 Tfl I
 Uba1221
 Xcm I

FIG.5B

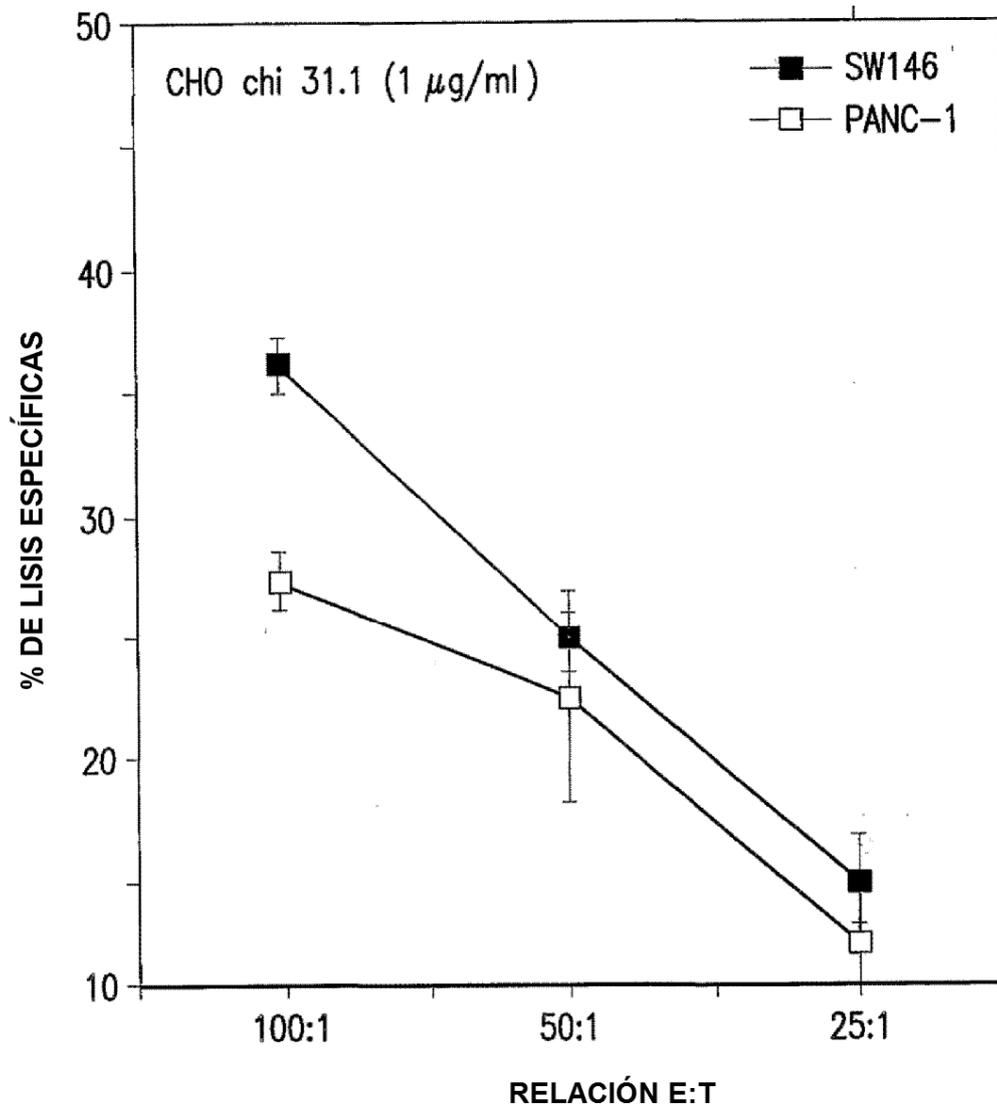


FIG.6A

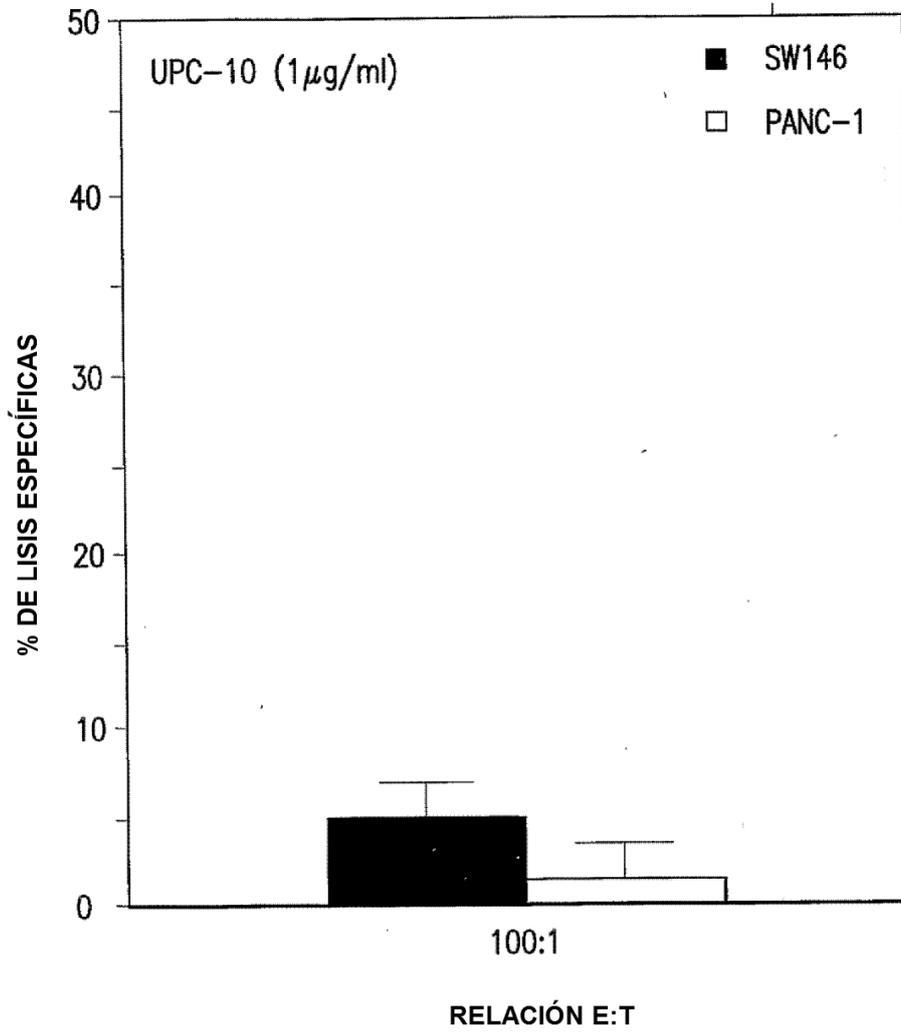


FIG.6B